



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Análisis de la Respuesta de Macrófagos ante
la Infección de dos cepas de *Trypanosoma
cruzi* con Distinta Virulencia

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
B I O L O G A
P R E S E N T A:
ANDREA RUBÍ JIMÉNEZ MARÍN



FACULTAD DE CIENCIAS
UNAM

DIRECTORA DE TESIS:
DRA. BERTHA ESPINOZA GUTIERREZ



FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR

0350264



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:

"Análisis de la Respuesta de Macrófagos ante la Infección de dos cepas de Trypanosoma cruzi con Distinta Virulencia"

realizado por **Jiménez Marín Andrea Rubí**

con número de cuenta **09637406-3**, 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 **M. en. C. Cristina Cañeda Guzmán**

Propietario **Dr. Guillermo Salgado Maldonado**

Suplente **Dra. Laila Gutiérrez Kobeh**

Suplente **M. en C. Carlos Ruiz Jiménez**

[Firma]

Cañeda

Guillermo Salgado Maldonado

Laila Gutiérrez Kobeh

Ruiz Jimenez Carlos

Consejo Departamental de Biología

[Firma]

M. en C. Juan Manuel Rodríguez Chávez

FACULTAD DE CIENCIAS



UNIDAD DE ENSEÑANZA
DE BIOLOGÍA

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Bertha Espinoza Gutiérrez por su apoyo y orientación en la realización de este trabajo y por haber tenido confianza en mí para realizarlo.

Al Biol. Edgar Oaxaca Hernández por su invaluable colaboración, tanto teórica como práctica en la realización de los ensayos de RT-PCR y por ser uno de mis grandes amigos.

A la técnico QFB. Esther Pacheco por haberme enseñado algunas de las técnicas necesarias para la elaboración de este trabajo.

Al técnico del laboratorio Biol. Ignacio Martínez, por haberme proporcionado parte del material biológico utilizado en este trabajo.

DEDICATORIAS

A mis padres, Doña Martita y Don Fili, por haberme dado la vida, el apoyo y los recursos necesarios para que yo pudiera hacer lo que me gusta en la vida y por ser una de mis mas grandes fuentes de inspiración.

A mis hermanos Allan y Marisol por haberme criado, formado y por ser un gran ejemplo para mí.

Al Ing. Sergio Díaz Nila: Porque sin ti demasiado grande seria el bosque

A mis amigos de toda la vida Erika Sacrovich González, Sergio Bautista, Alejandra Becerril, Edna Flores y Enrique Peñaflores por ser básicos en mi vida y por haber sido mi familia durante mi infancia.

A David Trejo y Tristán Gómez: Gracias a los dos por todos los años que han estado conmigo apoyándome, por creer en mi y por considerarme parte importante en su vida

A mis amigos y compañeros de laboratorio Ivone Pérez, Edgar Oaxaca, Fernando Martínez, Guiehdani Villalobos, Maria Luisa Martínez, Rosalía Lira, Oralia Sánchez, Andrea Vizcaíno, Teresa Rico, Sandro Sosa, Elsa Ugalde y Bertha Espinoza. Gracias a todos por los ratos de plática, los grandes consejos y por su valiosísima amistad.

LOS QUIERO A TODOS

INDICE

I. Resumen	1
II. Introducción	2
II.i. Generalidades de la Enfermedad de Chagas	2
II.ii. Distribución	2
II.iii. Formas de Transmisión	3
II.iv. Manifestaciones Clínicas de la Enfermedad	4
II.iv.a. Fase Aguda	4
II.iv.b. Fase Crónica	5
II.v. El Agente Etiológico	6
II.v.a. Clasificación Taxonómica de <i>Trypanosoma cruzi</i>	6
II.v.b. Morfología	6
II.v.c. Ciclo de Vida	9
II.vi. Variabilidad Genética de <i>Trypanosoma cruzi</i>	11
II.vii. Relación Hospedero-Parásito	13
II.viii. Respuesta Inmune en la Enfermedad de Chagas	15
II.ix. Macrófagos	18
II.x. Papel de los Macrófagos en la Enfermedad de Chagas	21
III. Justificación	22
IV. Hipótesis	23
V. Objetivos	24
V.i. Objetivo General	24
V.ii. Objetivos Particulares	24
VI. Metodología	25
VI.i. Parásitos	25
VI.ii. Macrófagos	25

VI.iii. Ensayo de Infección	25
VI.iv. Ensayo de Cuantificación de Óxido Nítrico	26
VI.v. Cuantificación de Citocinas	26
VI.vi. Extracción de RNA Total	27
VI.vii. Detección de mRNA de Quimiocinas por RT-PCR	28
VI.viii. Análisis Estadístico	29
VII. Resultados	30
VII.i. Infectividad y Replicación Intracelular	30
VII.ii. Producción de Citocinas TNF- α , IL-12 e IL-10	35
VII.iii. Expresión de Mensajeros RANTES Y MCP-1	37
VII.iv. Producción de Óxido Nítrico	39
VIII. Discusión	40
IX. Conclusiones	46
X. Bibliografía	47
XI. Anexo 1	58
XII. Anexo 2	59
XIII. Anexo 3	60
XIV. Anexo 4	62

I. Resumen

En este trabajo se evaluó la respuesta de macrófagos de la línea J774 activados con IFN- γ a la infección de dos cepas mexicanas de *Trypanosoma cruzi* que presentan diferentes grados de virulencia y patogenicidad en el modelo murino *in vivo*. El interferón gamma (IFN- γ) es un factor de activación clave para los macrófagos que, una vez activados, eliminan los parásitos intracelulares por medio de un mecanismo dependiente de la biosíntesis de óxido nítrico. Por otro lado, se ha demostrado que existen otros mediadores de la respuesta inmune, como las citocinas TNF- α , IL-12 y quimiocinas como MCP-1 y RANTES, que están involucradas en la regulación de la producción de óxido nítrico en macrófagos murinos. Los resultados obtenidos a partir de ensayos de infección revelaron que existen marcadas diferencias en la capacidad de invasión de ambas cepas, siendo la infección de la cepa virulenta más del doble que la de la cepa no virulenta. En lo referente a la respuesta tripanocida de los macrófagos, evaluada por medio de la cuantificación de óxido nítrico por el método de Griess, los resultados obtenidos sugieren que la cepa no virulenta tiene la característica de inducir la producción de óxido nítrico 15 veces más que la cepa virulenta. No se encontraron diferencias en la producción de la citocina IL-12, IL-10 ni en la expresión de las quimiocinas RANTES y MCP-1. Sin embargo, la producción de TNF- α se vio aumentada en las células infectadas con la cepa virulenta sin activar y activadas con IFN- γ con respecto a las células infectadas con la cepa no virulenta. Estos resultados sugieren que las cepas de *T. cruzi* analizadas establecen interacciones diferentes con los macrófagos a nivel de superficie durante las primeras etapas de la infección.

II. Introducción

II.i. Generalidades de la Enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis Americana es una enfermedad parasitaria crónica causada por el protozoo flagelado *Trypanosoma cruzi*. La transmisión de esta enfermedad se da habitualmente por la contaminación de la piel y mucosas con las deyecciones del insecto vector, generalmente del género *Triatoma* o por transfusiones sanguíneas provenientes de individuos infectados con *T. cruzi* (OMS, 1991).

II.ii. Distribución

La distribución geográfica de esta enfermedad está limitada principalmente al continente americano (Fig. 1) debido, entre otras cosas, a que es en esta región donde se encuentra el insecto vector. Los vectores, los cuales son insectos hematófagos de la familia Reduviidae, se encuentran desde el sur de los Estados Unidos hasta el sur de Argentina.

La enfermedad de Chagas representa un problema de salud pública en 17 países de Latinoamérica, con una estimación de 100 millones de personas expuestas a la enfermedad y de 16 a 18 millones de personas infectadas en toda América Latina (OMS, 1991).

En México el vector y los mamíferos infectados se han reportado en los estados de Chiapas, Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Edo. de México, Michoacán, Morelos, Nayarit, Oaxaca, Puebla, Sonora, Yucatán y Zacatecas (Trujillo *et. al.*, 1993; Velasco-Castrejón *et. al.*, 1992). La prevalencia de la enfermedad es alta en los estados costeros del Pacífico, de Chiapas a Nayarit, en la península de Yucatán y algunas áreas que rodean el Altiplano (Rangel-Flores *et al.*, 2001). La mayoría de los casos de humanos infectados en México son considerados como leves, aunque recientemente se han tenido reportes de casos que presentan mega víscera y alrededor del 13% de los individuos seropositivos presentan cambios electrocardiográficos (OMS, 1991). Encuestas serológicas hechas en bancos de sangre de la República Mexicana indican que más del 1.5% de la sangre para transfusión está contaminada con *T. cruzi* (Guzmán-Bracho, 2001).



Figura. 1. Distribución geográfica de la Enfermedad de Chagas en el continente americano

II.iii. Formas de Transmisión

La principal forma de transmisión de esta enfermedad es por medio de la contaminación de mucosa y piel con las deyecciones del insecto vector; esta forma representa del 80 al 90% de los casos registrados (OMS, 1991). La segunda forma de transmisión en importancia es la transfusión sanguínea con sangre contaminada, que representan entre el 5 y el 20% de los casos de la enfermedad. Los casos de infección por ruta congénita tienen entre 0.5 y 8% de incidencia (Brener, 1973) y con una mucho menor proporción encontramos los casos debidos a accidentes de laboratorio (Macedo et al., 2004), manipulación de animales infectados (Tay, et al., 1996) y los casos de infección oral (Coura et al., 2002).

II.iv. Manifestaciones Clínicas de la Enfermedad

Las manifestaciones clínicas se pueden agrupar en dos fases:

II.iv.a. Fase Aguda

Existe un periodo de incubación que generalmente es asintomático y oscila de 4 a 10 días. Algunas veces, cuando la transmisión se hizo a través de la conjuntiva ocular, aparece una manifestación de puerta de entrada conocida como Signo de Romaña (complejo oftalmoganglionar) que consiste en una inflamación del los párpados inferior y superior (blefaritis bpalpebral) indolora, unilateral, con reacción conjuntiva y ganglionar. O bien, un chagoma, cuando la inoculación se dio en otra parte del cuerpo. Al chagoma se define como una nodulación dura, eritemo-papulosa que puede presentar pequeñas vesículas y la cual no supura, teniendo una evolución lenta de entre 2 a 4 semanas (OMS, 1991).

El crecimiento de los ganglios linfáticos satélites es otro signo importante. En el caso del Signo de Romaña, son palpables los ganglios preauriculares y los de las cadenas cervicales. Cuando la puerta de entrada ocurrió en otra parte del cuerpo, los ganglios vecinos son los que reaccionan. La adenopatía puede persistir durante meses (Velasco-Castrejón, 1991). La fiebre es el signo más importante de esta etapa observándose en el 95% de los casos agudos. La temperatura se eleva precozmente oscilando entre 37° y 38° C con un perfil intermitente, irregular y con picos vespertinos. Generalmente la fiebre se acompaña de cefalea, debilidad, malestar general, dolores musculares y articulares (mialgia y artralgia) y pérdida del apetito. En niños frecuentemente se presenta irritabilidad, observándose gran postración en los casos más graves. La duración del periodo febril guarda relación con la parasitemia (OMS, 1991). La hepatoesplenomegalia se presenta en alrededor del 30 al 40% de los casos con repercusiones clínicas (OMS, 1991).

La meningoencefalitis es rara y de progresión no muy clara. Se presenta principalmente en lactantes en los que son comunes los fenómenos convulsivos generalizados, con crisis frecuentes o espaciadas. En casos menos graves en los que se

compromete el sistema nervioso central las molestias se limitan a una irritación meníngea pasajera (OMS, 1991).

La cardiopatía es común en la enfermedad de Chagas aguda y parece ser la lesión anatomopatológica más constante. El electrocardiograma suele ser normal en la mitad de los casos agudos, presentándose apenas taquicardia sinusal. Los casos graves de miocardiopatía chagásica aguda pueden evolucionar hacia la insuficiencia cardíaca congestiva, a veces de instalación súbita y curso violento con pronóstico fatal (OMS, 1991). Sin embargo, el pronóstico en la fase aguda generalmente es bueno y el cuadro remite espontáneamente entre los 30 y 90 días posteriores a su instalación (OMS, 1991).

II.iv.b. Fase Crónica

Fase indeterminada

Durante esta etapa de la enfermedad desaparece la sintomatología y los individuos se consideran curados. Sin embargo, la serología es positiva y si se le estudia adecuadamente con frecuencia se les encontrará datos electrocardiográficos y ecocardiográficos sugestivos de miocarditis (Velasco-Castrejón, 1991).

Esta forma es la más frecuente y más importante desde el punto de vista epidemiológico. Se le denomina "forma subclínica" o simplemente "infección chagásica" y se caracteriza por la positividad serológica de un individuo asintomático con electrocardiograma y radiografía normales para corazón, esófago y colon.

Fase crónica sintomática

Es la forma que hace trascender a la enfermedad de Chagas, ya que, además de incapacitar al hombre, con frecuencia lo lleva a la muerte (Velasco-Castrejón, 1991).

La miocardiopatía chagásica crónica instalada en su evolución natural avanza insidiosamente hacia la insuficiencia cardíaca, a pesar que en la áreas endémicas frecuentemente se ve interrumpida por la muerte súbita, alrededor del 40% de los casos muestra una evolución benigna permitiendo una sobrevida del enfermo hasta los 60 o más años de edad, cuando otras patologías como la cardiopatía isquémica y la cardioesclerosis

se suman y se confunden. Los casos graves de cardiopatía chagásica ocurren más comúnmente en la tercera y cuarta década de vida, lo que es un importante factor de mortalidad en esas edades (Velasco-Castrejón, 1991). El cuadro clínico varía considerablemente de acuerdo al grado de insuficiencia cardíaca o al tipo de alteración del ritmo (Velasco-Castrejón, 1991).

II.v. El Agente Etiológico

II.v.a. Clasificación Taxonómica de *Trypanosoma cruzi*

Trypanosoma cruzi es un protozooario hemoflagelado con la siguiente clasificación taxonómica (Leedale y Vickerman, 2000):

REINO: Protista

PHYLUM: Euglenozoa (Cavalier-Smith, 1981)

CLASE: Diplonemea (Cavalier-Smith, 1993)

ORDEN: Kinetoplastida (Honingberg, 1963)

FAMILIA: Trypanosomatidae (Duflein, 1901)

GENERO: *Trypanosoma* (Gruby, 1843)

ESPECIE: *cruzi* (Chagas, 1909)

II.v.b. Morfología

Como miembro del Phylum Euglenozoa, *T. cruzi* posee un flagelo, el cual está involucrado con dos procesos biológicamente importantes: el movimiento y el anclaje del protozooario a la superficie celular del hospedero vertebrado y a la membrana perimicrovililar del intestino del hospedero invertebrado. El flagelo emerge de la célula a través de una estructura denominada bolsa flagelar, la cual también está relacionada con un gran número de macromoléculas por parte del parásito.

Como todos los miembros del orden Kinetoplastida, *T. cruzi* tiene una estructura llamada cinetoplasto, el cual, corresponde a una condensación extracelular de DNA dentro

de una región bien definida de la mitocondria, formando una estructura redondeada muy próxima a la base del flagelo. El DNA del cinetoplasto (KDNA) puede contener alrededor del 30% del DNA total de la célula. La estructura del cinetoplasto ha sido bien estudiada y se ha observado que está formado por una red de alrededor de 20,000 a 30,000 minicirculos asociados estrechamente. Además de los minicirculos, el KDNA también presenta maxicirculos, los cuales corresponden al bien conocido DNA mitocondrial presente en eucariontes.

Por otro lado, el núcleo de *T. cruzi* no ha sido investigado a detalle, aunque se ha observado que la membrana nuclear permanece intacta durante los procesos de división celular.

El citoesqueleto de *T. cruzi* está formado básicamente de placas de microtúbulos localizados unidos a la membrana plasmática.

La identificación de los estadios de desarrollo de *T. cruzi* está basado en criterios morfológicos como la forma de la célula, la posición del cinetoplasto con respecto al núcleo, y la región en donde el flagelo emerge de la bolsa flagelar. De acuerdo con esto, hay tres estadios identificados los cuales presentan propiedades biológicas características:

Tripomastigote

En este estadio el parásito tiene el cinetoplasto posterior al núcleo y un tamaño de aproximadamente 20 μm de largo y 2 μm de ancho (Fig. 2A). En el hospedero mamífero el tripomastigote puede ser encontrado intracelularmente en los tejidos y extracelularmente en circulación. En el hospedero invertebrado (Triatómino), éstos se encuentran siempre de manera extracelular en la parte posterior del intestino del insecto. Cuando el tripomastigote se encuentra dentro del hospedero mamífero se le llama tripomastigote sanguíneo. Por otro lado, debido a que se asume que la infección empieza en el hospedero mamífero y termina en el insecto, el tripomastigote encontrado en el intestino del insecto es llamado tripomastigote metacíclico (De Souza, 2002).

Amastigote

También llamado esferomastigote, es el estadio del parásito redondeado y de 3-5 μm de diámetro (Fig. 2B). Es la forma replicativa intracelular de *T. cruzi* dentro del hospedero vertebrado, en donde se dividirá por fisión binaria dentro de una gran variedad de tipos celulares con un tiempo de duplicación de entre 7 a 14 horas. Este tiempo de duplicación fue determinado en cultivos celulares y se encontró que depende de algunos parámetros como la cepa de parásito y la temperatura del cultivo; además, se le ha atribuido la capacidad de infectar células hospederas por si mismo (De Souza, 2002).

Epimastigote

Este estadio presenta el cinetoplasto en posición anterior al núcleo, tiene forma de huso de entre 20-40 μm (Fig. 2C). Es la forma replicativa del parásito que se encuentra en el insecto vector. Se encuentran localizados en el intestino medio del insecto, donde se multiplican y mantienen la infección a lo largo de toda la vida del insecto (De Souza, 2002).

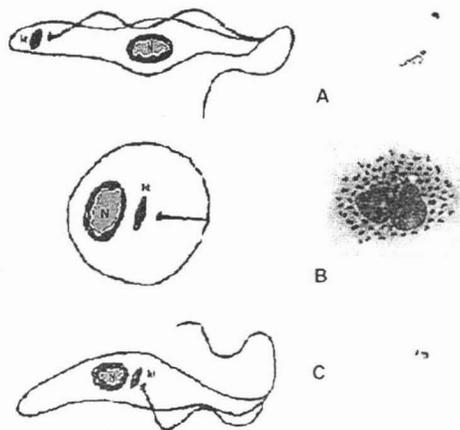


Figura. 2. Derecha: Microfotografías de los distintos estadios de *T. cruzi*. A, Tripomastigote, B, Amastigote y C epimastigote. Izquierda: Esquemas de los estadios de *T. cruzi* (N, núcleo, K, cinetoplasto)

II.v.c. Ciclo de Vida

En la sangre periférica del hospedero mamífero los tripomastigotes de *T. cruzi* son una población pleomórfica constituida por una mezcla de dos morfologías básicas que generalmente son descritas como alargadas o anchas. Consecuentemente, el insecto vector al alimentarse de sangre de un vertebrado infectado, toma una población de tripomastigotes sanguíneos en donde irán mezclados alrededor de un 10% de amastigotes (Andrews *et. al.*, 1987; Ley *et. al.*, 1988). Una vez dentro del insecto vector, en la porción del intestino medio, los tripomastigotes se transforman en amastigotes pasando por un gran número de formas intermedias (Tyler y Engman., 2001). El amastigote mide generalmente de entre 3-5 μm de diámetro, replicativo y en el ambiente del intestino medio del insecto, se transformará en epimastigote el cual también es replicativo. Inicialmente, el amastigote se hincha y extiende su flagelo, el cual comienza a ser visible. A este estado se le conoce generalmente con el nombre de esferomastigote. El cuerpo celular y el flagelo de los esferomastigotes se elonga conforme va incrementándose la densidad celular dando lugar a la clásica forma de epimastigote (Fig. 2). En estudios *in vitro*, la transformación de amastigote a la forma de epimastigote parece ser reversible y es dependiente de la concentración de glucosa en el medio (Tyler y Engman., 2000).

Posteriormente, el epimastigote se une hidrofólicamente a la cutícula cerosa de la pared en la porción posterior del intestino del insecto para diferenciarse a la forma metacíclica (Kleffmann *et. al.* 1998). Este proceso, llamado metaciclogénesis, puede ser disparado por la interacción hidrofóbica entre el flagelo y el sustrato al que se ancla y es un proceso mediado por AMP cíclico (Tyler y Engman., 2001).

Una vez formado el tripomastigote metacíclico se desprende de la cutícula serosa y es excretado y como ya se ha dicho con anterioridad, la contaminación de piel y mucosas con las heces que excreta el redívulo al momento de alimentarse, permite la entrada del parásito dentro del hospedero mamífero y conduce a la infección.

Los tripomastigotes metacíclicos son capaces de parasitar una gran variedad de células nucleadas en el mamífero. Una vez en el citoplasma celular, el tripomastigote se

transforma en amastigote. El amastigote prolifera por medio de fisiones binarias y da lugar a un nido de amastigotes o pseudoquiste (Andrews, 1993). Cuando la cantidad de parásitos dentro de la célula es elevada, los amastigotes darán lugar a los tripomastigotes sanguíneos, los cuales escaparán del pseudoquiste hacia el torrente sanguíneo y a linfa en su típica forma alargada e invadirán nuevas células. Las células que son lisadas prematuramente pueden liberar amastigotes, los cuales han sido observados durante la fase aguda de la infección en el torrente sanguíneo. Estos amastigotes sirven para propagar la infección ya que también son capaces de infectar células, particularmente células fagocíticas (Ley *et. al.*, 1988). Finalmente, la mezcla de tripomastigotes y amastigotes presentes en la sangre de un mamífero infectado servirán para completar el ciclo de vida cuando sean tomados por el triatomino al momento de alimentarse (Fig. 3).

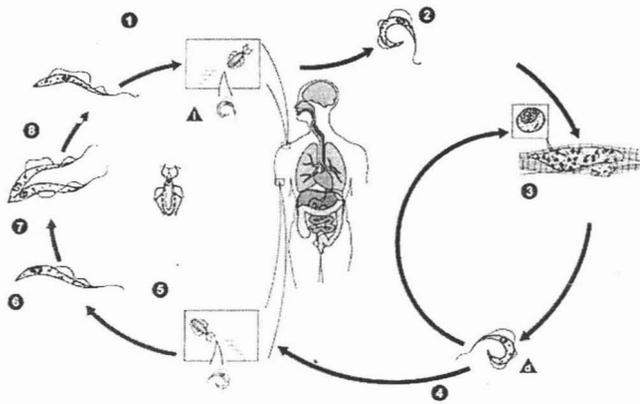


Figura 3. Ciclo de vida de *T. cruzi*: 1 Una chinche infectada toma sangre de un individuo sano y en sus heces, deposita los tripomastigotes que entrarán al hospedero mamífero; 2 Los tripomastigotes metacíclicos entran a varios tipos celulares para transformarse en amastigotes; 3 Los amastigotes se dividen por fisión binaria dentro de las células infectadas; 4 Los amastigotes intracelulares se transforman en tripomastigotes los cuales lisan las células y se depositan en el torrente sanguíneo en donde podrán infectar nuevas células; 5 Al alimentarse de sangre, una chinche toma los tripomastigotes sanguíneos; 6 Los tripomastigotes se transforman en epimastigotes en la porción media del intestino de la chinche, 7 se dividen y 8 pasan a la porción posterior del intestino de la chinche para transformarse en tripomastigotes metacíclicos cerrando así el ciclo al ser depositados en las heces del insecto vector.

▲ Estado infeccioso ▲ Diagnóstico. Tomado de: CDC. www.dpd.cdc.gov/dpdx

II.vi. Variabilidad Genética de *Trypanosoma cruzi*

Las poblaciones de *T. cruzi* son poblaciones heterogéneas, compuestas por un conjunto de cepas que circulan dentro de los ciclos doméstico y selvático e incluyen al humano, al insecto vector y a los animales reservorios. El aislamiento y el estudio de poblaciones de *T. cruzi* de diferentes orígenes han demostrado la presencia de un amplio rango de cepas con diferencias biológicas, inmunológicas, bioquímicas y farmacológicas. Estudios realizados en los que han utilizado poblaciones aisladas o clonas de *T. cruzi*, refuerzan la teoría de la heterogeneidad y demostrado que las cepas están compuestas de subpoblaciones con características diferentes (Postan *et. al.*, 1986; Finley y Dvorak, 1987).

Los estudios de isoenzimas por medio de electroforesis y geles de acrilamida fueron los primeros en demostrar las distintas poblaciones de *T. cruzi* llamados zymodemas, los cuales proporcionaron un buen marcador genético para el parásito que produce la enfermedad de Chagas. Miles y colaboradores, en estudios hechos en 1977 y 1978, estudiando cepas aisladas en Brasil, describieron la presencia de tres zymodemas: Z1, Z2 y Z3. Los parásitos pertenecientes a los zymodemas Z1 y Z3 fueron encontrados en el ciclo selvático y en unos pocos casos agudos en humano, mientras que los parásitos pertenecientes a Z2 fueron asociados a la transmisión dentro del ciclo doméstico (Fonseca y Romanha, 1999). Después de esto, se hicieron varios estudios isoenzimáticos a un gran número de aislados de diferentes orígenes geográficos y provenientes de humano, vector y reservorio. Estos estudios demostraron la presencia de mas zymodemas comenzando por 4 (zymodemas ZA, ZB, ZC y ZD) (Romanha, 1982; Carneiro *et. al.*, 1990). Posteriormente, se hizo un gran estudio que comprendía 645 muestras aisladas de *T. cruzi* provenientes de una amplia variedad de hospederos vertebrados e invertebrados, en el que se analizaron 15 sistemas isoenzimáticos. En este estudio se observó una gran variabilidad genética. Fueron identificados al menos 43 zymodemas naturales distintos (Tibayrenc *et al.*, 1986). Debido a esta gran variabilidad genética y al hallazgo de que muchos de estos zymodemas se encontraban distantes geográficamente, los autores de este estudio propusieron una

estructura poblacional multiclonal para *T. cruzi* (Tybayrenc y Ayala, 1988; Zhang *et. al.*, 1988).

Actualmente se han usado características fenotípicas y genotípicas para dividir las cepas de *T. cruzi* en dos grandes grupos genéticos. De acuerdo a un consenso internacional estas divisiones han sido llamadas *T. cruzi* I y *T. cruzi* II (Anonymous, 1999).

El linaje *T. cruzi* II se divide a su vez en 5 subgrupos que van de *T. cruzi* IIa al *T. cruzi* IIe basados en el análisis de secuencias de ADN. El grupo *T. cruzi* I consiste de un solo clado relativamente homogéneo, mientras que *T. cruzi* II emerge como dos o tres clados diferentes filogenéticamente (Brisse *et. al.*, 2001; Machado y Ayala, 2001; Gaunt *et. al.*, 2003).

T. cruzi I fue originalmente descrito como proveniente del ciclo selvático en Brasil. *T. cruzi* I predomina en el norte del Amazonas donde es la principal causa de la enfermedad de Chagas, así como en otras áreas endémicas como el caso de Venezuela (Miles *et al.*, 1981). En contraste, *T. cruzi* II predomina en la transmisión del ciclo doméstico en los países de Sudamérica (Argentina, Brasil, Bolivia, Chile, Paraguay y Uruguay). Las diferencias en cuanto a la patología causada por *T. cruzi* I y *T. cruzi* II todavía no son muy claras. En la región del cono sur, en donde circula *T. cruzi* II, los megasíndromes chagásicos son muy comunes, mientras que en el norte del Amazonas, donde circula *T. cruzi* I, estas dolencias se consideran virtualmente ausentes (Miles *et al.*, 1981). Se sugiere que *T. cruzi* II es más patogénico que *T. cruzi* I. Comparaciones hechas en ratones C3H/HeN sustentan la noción de que ciertas cepas de *T. cruzi* II, pueden inducir más lesiones en el timo y producir mortalidades más altas que las producidas por *T. cruzi* I. (Di Noia *et al.*, 2002)

En lo referente a las cepas mexicanas de *T. cruzi* se han realizado análisis de la diversidad genética de las poblaciones *T. cruzi* en México por isoenzimas y por la técnica de amplificación al azar de ADN polimórfico (RAPD); encontrando que cerca del 98% de las cepas mexicanas pertenecen al grupo genético *T. cruzi* I y solo un 2% pertenecen al grupo *T. cruzi* II (López-Olmos *et al.*, 1998; Bosseno *et al.*, 2002). Estos resultados contrastan con la situación de los países de Sudamérica en donde los parásitos que circulan son una mezcla

de ambos linajes (Bosseno et al., 2000; Brisse et al., 2000; Coura et al., 2002). Estudios hechos a 5 aislados provenientes de pacientes mexicanos demostraron que, a pesar de que en México predominantemente circula el grupo *T. cruzi* I, existen diferencias importantes en cuanto a patogenicidad y virulencia dentro de este grupo en los aislados mexicanos (Espinoza et al., 1998).

II.vii. Relación Hospedero-Parásito

La enfermedad de Chagas se caracteriza por la prolongada persistencia del parásito en el hospedero, quien permanece infectado de por vida, en muchos casos sin presentar signos ni síntomas que pongan al parásito de manifiesto. Tanto la persistencia del parásito, como el hecho de que algunos hospederos humanos enferman y otros no, dependerá de la relación entre el parásito y su hospedero. Esta relación será determinada en primer lugar, por la capacidad del parásito para reconocer, instalarse y reproducirse en diferentes células. En segundo lugar por la capacidad antigénica del parásito para estimular una respuesta inmune y la capacidad individual del hospedero para montar esta respuesta y finalmente, por la habilidad del parásito para evadirla (Carvalho, et al., 1985).

Las evidencias acumuladas en los últimos años han demostrado que la interacción de los tripomastigotes de *T. cruzi* con la célula hospedera es mediada por reconocimientos moleculares específicos. El tratamiento del parásito o de la célula hospedera con agentes oxidantes, lectinas o enzimas como proteasas, glicosidasas y fosfolipasas pueden alterar la asociación parásito-célula hospedera y sugieren un papel importante de los ligandos de superficie en esta asociación (De Souza, 1984).

Diferentes moléculas de superficie se han asociado con la invasión celular. Como por ejemplo, proteoglicanos del tipo del heparan sulfato, algunos miembros de la superfamilia gp85/trans-sialidasa, gp83 trans-sialidasa, Tc85 y gp82, han sido clasificados como antígenos o proteínas asociadas a la penetración, que se unen a receptores de fibronectina y colágena y son responsables del reconocimiento celular (Burleigh y Andrews, 1995; Silber et al., 2002; Cortez et al., 2003; Calvet et al., 2003).

Como ya se mencionó con anterioridad, *T. cruzi* puede entrar a una gran variedad de tipos celulares dentro del hospedero mamífero y la invasión ocurre por medio de un mecanismo único en el cual los microtúbulos del citoesqueleto de la célula infectada son movilizados para el reclutamiento de lisosomas en el punto de anclaje del parásito (Tardieux *et. al.*, 1992; Rodríguez *et. al.*, 1996). Estos lisosomas se fusionan con la membrana plasmática, primero formando una conjunción con el parásito y después un compartimento vacuolar que le permite la entrada al parásito (Rodríguez *et. al.*, 1997). La acidificación de la vacuola parasitófora, resultante de la fusión lisosomal, también sirve para activar la secreción por parte del parásito de una molécula parecida a porina llamada Tc-Tox, la cual facilita la salida del parásito de la vacuola (Andrews, 1993) (Fig. 4).

Un mecanismo conocido por el cual *T. cruzi* evade la respuesta inmune del hospedero es debida a la inhibición del sistema del complemento por medio de la expresión, por parte de los tripomastigotes, de una glicoproteína de 160kD (gp160), la cual es un homólogo de la proteína reguladora del complemento DAF (Norris *et. al.*, 1991). Al igual que DAF, la gp160 puede unirse a las subunidades C3b y C4b lo cual inhibe su acción e impide el subsecuente reclutamiento de los demás miembros de la cascada del complemento y así, impide la formación de convertasa y la lisis del parásito (Norris, 1998).

Por otro lado, numerosos estudios han demostrado que la infección con *T. cruzi* estimula una inmunosupresión no específica. En la enfermedad de Chagas esta inmunosupresión puede ser un mecanismo usado por el parásito para establecer una infección inicial y se han propuesto varios mecanismos por los cuales *T. cruzi* induce inmunosupresión. Esta supresión puede también estar asociada con la autoinmunidad que caracteriza a la fase crónica de esta enfermedad, ya que la supresión de células T CD4+ y CD8+ parece estar involucrada en ambos procesos (Takle y Snary, 1993).

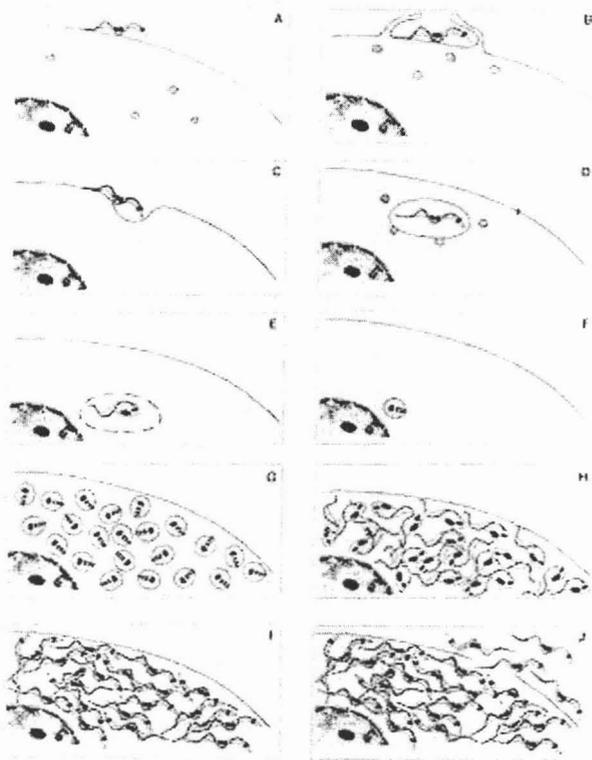


Figura 4. Esquema de los pasos de la entrada de *T. cruzi* a la célula hospedera: Reconocimiento del parásito y la célula hospedera (A). Fagocitosis del parásito (B y C) y formación del fagolisosoma al que se reclutarán lisosomas (D) para formar un fagolisosoma (E), dentro del cual el parásito se transformará en amastigote (F) y será liberado al citoplasma para dividirse por fisión binaria (G). Posteriormente, el amastigote se transformará en tripomastigote, pasando por varias formas intermedias (H e I), hasta lisar la célula y ser liberados al torrente sanguíneo (J). Tomado de: De Souza 2002.

II.viii. Respuesta Inmune en la Enfermedad de Chagas

La resistencia del hospedero a la infección con *T. cruzi* es dependiente tanto de la inmunidad innata como de la inmunidad adquirida.

Dentro de la inmunidad innata mediada por células se ha demostrado que la citocina IFN- γ activa a macrófagos infectados para inhibir la replicación intracelular de *T. cruzi* por un mecanismo que involucra la producción de óxido nítrico (NO) (Gazzinelli *et. al.*, 1992). Como otros parásitos intracelulares, los tripomastigotes infectivos son capaces de inducir la rápida

secreción de IL-12 por parte de macrófagos y de células adherentes de bazo. Otro tipo celular importante en esta primera respuesta son los neutrófilos. Se ha demostrado la importancia de estas células en estudios en donde se depletan estas células y el resultado es la exacerbación de la enfermedad en ratones BALB/c (Chen *et. al.*, 2001).

Las células NK son otro tipo celular importante en la respuesta inmune innata contra este parásito. Se ha demostrado que la depleción de células NK *in vivo* resulta en la casi completa eliminación de la producción de IFN- γ y en un incremento de la parasitemia y mortalidad en ratones C57/BL con resistencia parcial. Estos resultados indican que la producción temprana de IFN- γ , independiente de células T, por parte de las células NK, es un importante elemento innato en la resistencia del hospedero en contra de la infección con *T. cruzi*, disparada por IL-12 que secretan los macrófagos (Dos Reis, 1997).

En cuanto a la respuesta inmune adquirida se sabe que los linfocitos T juegan un papel importante en esta patología. Las células T CD4⁺ pueden diferenciarse funcionalmente en dos subgrupos de células T colaboradoras denominadas TH1 y TH2, basándose en el distinto perfil de citocinas que liberan, polarizando así su respuesta. Se le ha conferido un papel protector a las citocinas de perfil Th1 como IFN- γ , IL-12, IL-2, TNF- α en la infección con *T. cruzi*. En contraste, las citocinas de perfil Th2 (IL-4, IL-10, TGF- β), han sido consideradas como un perfil que favorece la susceptibilidad para esta enfermedad. Actualmente también se postula que una respuesta de tipo Th1 exacerbada puede conducir a la severidad de la patología y que las citocinas del perfil Th2 funcionan como reguladoras de esta respuesta al tener la capacidad de contrarrestar la respuesta Th1.

Una población relativamente pequeña de linfocitos de bazo que se expande en etapa temprana de la infección son las células T $\gamma\delta$, una línea de defensa que se encuentra entre la inmunidad innata y la adquirida (Minoprio, 1989). La relevancia de este grupo celular en la protección del hospedero todavía no se entiende completamente, pero se ha visto que las células T $\gamma\delta$ son capaces de modular la intensidad de la parasitemia, la mortalidad y la

inflamación en el tejido de una manera en la que está involucrada la edad del hospedero (Cardillo, 1993).

En lo referente a la respuesta adquirida se puede destacar la participación de los linfocitos T CD4+ y CD8+ en el control de la parasitemia y la sobrevivencia en la fase aguda de la infección (Tarleton, 1995). Se ha demostrado que los linfocitos CD4+ Th1 que producen las citocinas IL-2 e IFN- γ , son importantes en la protección sistémica contra *T. cruzi*. La eliminación de la participación de células T CD4+ en ratones knockout para la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (MHC II) resulta en un marcado incremento en la susceptibilidad a *T. cruzi*. La importancia de las células T CD4+ ha sido atribuida a que inducen la producción de anticuerpos líticos y a la producción de citocinas que estimulan a los macrófagos a eliminar a los parásitos intracelulares (Dos Reis, 1997).

La importancia de las células T CD8+ reside en el hecho de que *T. cruzi* es capaz de invadir y replicarse en una gran variedad de tipos celulares que no expresan antígenos en el contexto MHC II y, por lo tanto, escapan a la detección de los linfocitos T CD4+ (DosReis, 1997).

Durante la etapa aguda, el hospedero puede presentar niveles altos de anticuerpos del tipo IgM, posteriormente se incrementan en forma significativa los de las clases IgG e IgA, los que se consideran más importantes. Después de la fase aguda el individuo puede permanecer en la fase indeterminada por varios años y finalmente entrar a la fase crónica de la enfermedad, donde los problemas de tipo cardíaco y megavisceral son comúnmente encontrados. La predominancia de anticuerpos de la clase IgG2a en ratones durante esta fase ha sido asociada a su participación en la protección contra la infección (Tackle y Snary, 1993)

Por otro lado, se ha sabido por años que los anticuerpos son muy importantes en el control de la fase crónica de la infección. Algunas investigaciones han mostrado que la inducción de protección por transferencia adoptiva de células de bazo de ratones crónicamente infectados es inhibida por la depleción de células B y que la transferencia

pasiva de suero o anticuerpos de isotipo IgG obtenidos de ratones infectados y en fase crónica protege a los ratones sanos receptores contra posteriores infecciones (Brener, 1980; Tarleton, 1997; Brener y Krettlí 1990).

II.ix. Macrófagos

Los macrófagos tienen su origen en las células germinales pluripotenciales granulomonocíticas (CGp-GM) de la médula ósea. Por acción de los factores de estimulación colonial, de naturaleza glucoprotéica, las CGp-GM se diferencian en células germinales monopotenciales monocíticas, las cuales se diferencian en monoblastos y estos, a su vez, en promonocitos, la primera célula morfológicamente identificable como precursora del macrófago y que ya posee algunas de sus características. Por división del promonocito y posterior diferenciación aparecen los monocitos, que abandonan la médula ósea pasando por la sangre. Los monocitos circulantes pasan por diapédesis a través del endotelio vascular, emigrando hacia los tejidos en los que se diferenciarán en macrófagos. (Roitt y Delves, 2003)

Existen diferentes fases en la respuesta inmune en las que participan los macrófagos:

1. En la defensa inicial frente al patógeno: el macrófago sin activar tiene capacidad fagocítica basal. Al mismo tiempo secreta citocinas que ayudan a otras células.
2. En la presentación del antígeno: actúan como células presentadoras para linfocitos T, que a su vez se activan secretando citocinas.
3. En la fase efectora el macrófago se activa por citocinas como el IFN- γ , lo cual va a potenciar su actividad antimicrobiana, antitumoral y de secreción de citocinas.

Los macrófagos fagocitan partículas grandes (virus, bacterias, parásitos, etc.) que les son extrañas. El reconocimiento de estas partículas extrañas puede implicar a receptores como el receptor para lipopolisacárido CD14, receptores C11b/CD18, receptores para manosas, y receptor para glúcidos entre otros. Los Toll Like Receptors (TLR's), están dentro de los más importantes receptores de reconocimiento de patrones (PRR's) y reconocen una

gran variedad de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP's). Los TLR's y las vías de señalización relacionadas con éstos juegan un papel muy importante en la síntesis de citocinas inducida por parásitos (Fig. 5) (Ropert and Gazzinelli, 2004).

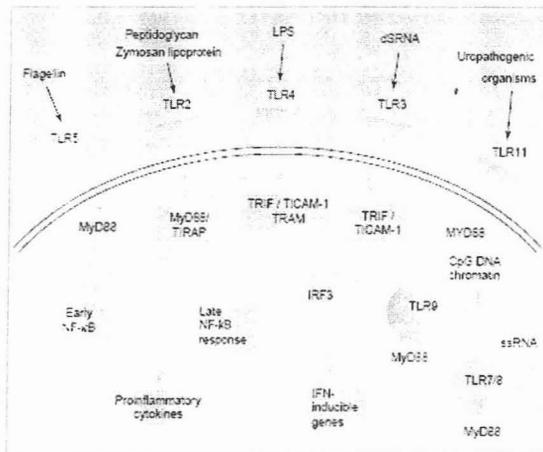


Figura 5. Señalización a través de receptores tipo Toll (TLRs). Varios motivos patogénicos pueden señalar vía TLRs. Algunos TLRs como TLR7 y TLR9 lo hacen a través de compartimentos intracelulares. Todos los TLRs pueden señalar a través del adaptador MyD88, conduciendo a la translocación al núcleo del factor de transcripción NFκB y la producción de citocinas proinflamatorias. Tomado de (Pasare y Medzhitov, 2005).

Las capacidades microbicidas de los macrófagos pueden aumentar al activarse. Esta activación puede ser inducida por:

1. Productos microbianos que causan:
 - a. Activación directa de monocitos y macrófagos
 - b. Activación indirecta: los macrófagos sin activar y las células NK liberan citocinas que a su vez activan a los macrófagos.
2. Ulterior activación por citocinas producidas por linfocitos T_H , sobre todo por $IFN-\gamma$.
Provocan atracción quimiotáctica de fagocitos y/o activación de los mecanismos dependientes de oxígeno y nitrógeno.

Entre los mecanismos dependientes de oxígeno se incluyen una serie de compuestos derivados del consumo de O_2 , como O_2^- , H_2O_2 , y radical hidroxilo, muy reactivos

y que son muy importantes en la destrucción de patógenos intracelulares. Por otro lado, se ha descrito un mecanismo que implica la síntesis de intermediarios reactivos de nitrógeno, como el NO, a partir del metabolismo de la L-arginina mediado por una enzima denominada NO sintetasa (iNOS). La síntesis de esta enzima es inducida en macrófagos por citocinas como IFN- γ , que al unirse a su receptor activa la vía de señalización JAK-STAT1 y la transcripción de este gen (Fig. 6), o por endotoxinas bacterianas como LPS siendo éste, el mecanismo mas importante en la destrucción de patógenos intracelulares.

Las citocinas secretadas por macrófagos en respuesta a componentes microbianos cumplen importantes papeles: la IL-12 y el TNF- α , en sinergia con otros mediadores, mejorando la actividad antimicrobiana inespecífica. Además, los macrófagos secretan quimiocinas, las cuales son moléculas quimiotácticas que reclutan células inflamatorias al lugar de una infección dirigiendo la respuesta adaptativa en las fases iniciales (Roitt y Delves, 2003).

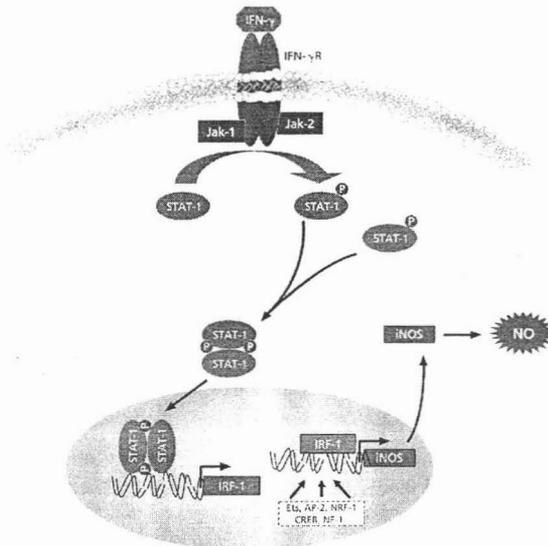


Figura 6. El señalamiento a través de la unión del IFN- γ con su receptor activará a las cinasas de la familia Janus (JAK-1 y JAK-2). Esta activación inducirá el reclutamiento de el factor de transcripción STAT-1 que al fosforilarse se dimerizará y se translocará al núcleo es donde inducirá la transcripción del gen de la iNOS. Tomado de: http://www.sigmaaldrich.com/Area_of_Interest/Life_Science/Cell_Signaling/Scientific_Resources/Pathway_Slides_Charts/Inducible_Nitric_Oxide_Synthase_iNOS_.html

II.x. Papel de los Macrófagos en la Enfermedad de Chagas

La primera célula con que interacciona el tripomastigote inmediatamente después de haber franqueado la barrera cutánea es el macrófago (Carvalho, et al., 1985). Los macrófagos juegan dos papeles muy distintos en la infección con *T. cruzi*; por un lado, al ser *T. cruzi* un parásito intracelular obligado (Kuhn 1994), los macrófagos fungen como células hospedera del parásito y por el otro como célula efectora en la respuesta inmune en contra de éste. Para este último cometido, el macrófago requiere de la correcta estimulación por parte de las citocinas, lo que le permitirá participar en la destrucción fagocítica del parásito y como célula presentadora de antígeno en la inducción de la respuesta inmune adquirida (Kuhn 1994)

El IFN- γ ha sido bien caracterizado como un potente activador de macrófagos. Como se ha mencionado anteriormente, el IFN- γ es una importante citocina involucrada en la respuesta inmune anti-*T. cruzi*. Los macrófagos provenientes de ratones tratados con IFN- γ recombinante inhiben el desarrollo intracelular de *T. cruzi* in vitro. (Reed, 1988)

El efecto tripanocida del macrófago mediado por la producción de óxido nítrico (NO) es uno de los mecanismos efectores más importantes en la eliminación *T. cruzi* (Rodrigues et. al. 2000). En los macrófagos, el NO es generado a partir de L-arginina por inducción de una enzima dependiente de NADPH: la iNOS que es inducida por citocinas como el IFN- γ y el TNF- α (Aliberti, et al., 1999). Se ha demostrado que el IFN- γ en combinación con otras citocinas como el TNF- α es más efectivo en la inducción de la actividad tripanocida por parte del macrófago (Golden y Tarleton 1991).

Además de las citocinas, las quimiocinas, en especial de la familia Cisteina-Cisteina (CC), juegan un papel importante en la inmunopatogénesis al seleccionar y reclutar células en los sitios con retos antigénicos (Aliberti, et al., 1999), además de haberse demostrado en estudios anteriores que los niveles de NO, producidos por macrófagos expuestos a quimiocinas de la familia CC como RANTES, MCP-1, MIP-1 α y MIP-1 β , son comparables a los niveles de NO inducidos por IFN- γ (Villalta, et. al., 1998).

III. Justificación

Se han identificado cepas del linaje *T. cruzi* I que presentan una alta heterogeneidad, mostrando diferencias biológicas tanto en virulencia como en patogenicidad. En cepas mexicanas se ha estudiado poco este comportamiento y no se han hecho estudios con estos parásitos en células hospederas como el macrófago. Sería importante comparar la respuesta de este tipo celular a la infección de dos cepas que presentan diferencias biológicas como virulencia y patogenicidad.

IV. Hipótesis

Se ha demostrado que las cepas mexicanas de *T. cruzi*, Ninoa y Querétaro, presentan diferentes características biológicas, entre éstas, su grado de virulencia en el modelo murino *in vivo*. Por lo tanto, es probable que interactúen de manera diferente con macrófagos durante el proceso de invasión, así como que induzcan una respuesta diferente en éstas células en un modelo *in vitro*.

V. Objetivos

V.i. Objetivo General

Analizar la respuesta de macrófagos *in vitro* a la infección con una cepa virulenta (Querétaro) y una no virulenta (Ninoa) de *Trypanosoma cruzi*.

V.ii. Objetivos Particulares

- Analizar el porcentaje de infección en macrófagos no activados y activados con IFN- γ infectados con una cepa virulenta y una no virulenta de *T. cruzi*
- Determinar en estas mismas poblaciones de macrófagos la producción de Oxido Nítrico y de las citocinas IL-4, IL-12 y TNF- α en respuesta a la infección con cepas de *T. cruzi* con diferente grado de virulencia.
- Analizar la expresión de las quimiocinas RANTES y MCP-1 en macrófagos activados y sin activar con IFN- γ , en respuesta a la infección de las cepas de *T. cruzi* antes mencionadas.

VI. Metodología

VI.i. Parásitos.

Se utilizaron tripomastigotes de las cepas Ninoa y Querétaro (avirulenta y virulenta respectivamente) pertenecientes al genotipo 1 (Lopez Olmos et al., 1998; Bosseno et al., 2002), obtenidos de ratones infectados y mantenidos en cultivos de células Vero en medio D-MEM (GIBCO, No. Cat. 12100-046) suplementado al 10% de SFB e incubados a 37° C, 95% de humedad relativa y 5% de CO₂. Los tripomastigotes para la infección se obtuvieron por medio de centrifugación de los sobrenadantes de los cultivos celulares infectados a 800g por 10 min. Luego de esto, el pellet obtenido se deja reposar por un lapso de 30 min a 37° C, pasado este tiempo se separó el sobrenadante del pellet y se centrifugaron nuevamente a 2,000g por 10 min. Esto se hace con el fin de dar tiempo a los tripomastigotes que estén vivos de nadar en el sobrenadante y así eliminar el mayor número que sea posible de restos celulares.

VI.ii. Macrófagos.

Macrófagos de la línea de ratón J-774 (ATCC TIB 64), se cultivaron en medio D-MEM suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino (SFB) e incubados a 37°C, 95% de humedad relativa y 5% de CO₂ hasta realizar los ensayos de infección.

VI.iii. Ensayo de Infección.

Macrófagos J774 fueron sembrados a razón de 3,000 células en 30 µl por pozo en laminillas de 18 pozos con teflón estériles (Cell-line No. Cat. 10-476) preparadas con anterioridad como se muestra en el anexo 1, en medio D-MEM suplementado con 10% de SFB por un lapso de 4 horas en incubación a 37° C, 5% de CO₂ y 90% de humedad relativa para permitir la adhesión celular. Posteriormente, las células fueron puestas en contacto con los tripomastigotes obtenidos de cultivo en una relación de parásito-célula 10:1 para ambas cepas por lapsos de 3, 6, 12, 24 y 36 horas post infección en incubación a 37° C, 5% de CO₂ y 90% de humedad relativa. Una vez transcurridos los tiempos indicados, las laminillas fueron lavadas, sumergiéndolas en una caja de Coplin con PBS tres veces y posteriormente,

sumergidas en 50 ml de metanol absoluto durante 5 minutos. Finalmente, fueron teñidas con 30 μ l por pozo de la solución de trabajo de Giemsa (Anexo 2), por un lapso de 15 minutos para su posterior análisis microscópico el cual consistió en contar 300 células por punto experimental de tres ensayos independientes.

VI.iv. Ensayo de Cuantificación de Óxido Nítrico.

Los macrófagos J774 fueron cultivados en cajas de cultivo de 25cm² en una proporción de 2x10⁶ células por caja con 100U/ml de IFN- γ recombinante y como control el mismo número de células sin IFN- γ , fueron puestas en contacto con tripomastigotes de *T. cruzi* en una proporción de 7:1 para la cepa Querétaro (virulenta) y de 15:1 en el caso de la cepa Ninoa (no virulenta), por un lapso de 24 horas. La producción de óxido nítrico fue medida directamente en el sobrenadante usando el reactivo de Griess (Vespa et al., 1994) mezclando el reactivo A (0.1% de naftilendiamina dihidroclorada en ddH₂O) con el reactivo B (1.0% de sulfanilamida en H₃PO₄ al 2.5%) en una relación 1:1 y posteriormente en volúmenes iguales de sobrenadante y reactivo. La concentración de nitrito en la muestra se midió por medio de la comparación de los valores obtenidos de densidad óptica a 550nm con una curva estándar hecha con nitrito de sodio como referencia (Anexo 3).

VI.v. Cuantificación de Citocinas.

Para hacer la cuantificación de las citocinas IL-10, IL-12 y TNF- α se tomaron los sobrenadantes de tres ensayos de infección hechos independientemente y se les hizo el análisis por duplicado con la técnica de ELISA de tipo sandwich por medio de kits (IL-10 Mouse ELISA Kit, ENDOGEN No. Cat. 1857290; IL-12 Mouse ELISA Kit, ENDOGEN No. Cat. 14252; TNF- α Mouse ELISA Kit, ENDOGEN No. Cat. 9036) para cada citocinas, siguiendo las especificaciones del proveedor.

VI.vi. Extracción de RNA Total

La extracción de RNA total se realizó por el método de TRIZOL™ (Invitrogen Cat. No. 15596-026) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, para este ensayo se hicieron infecciones de macrófagos J774 en cajas de 25 cm². En cada caja se sembraron 2X10⁶ células las cuales fueron puestas en contacto con los parásitos en una proporción parásito-célula de 7:1 para la cepa Querétaro y de 15:1 para la cepa Ninoa. Se utilizaron tres grupos experimentales que fueron las células infectadas con la cepa Querétaro, las infectadas con la cepa Ninoa y el grupo control sin infectar. Para los tres grupos fueron hechos los ensayos en macrófagos activados y no activados con IFN- γ . Las células fueron incubadas con los parásitos por un lapso de 24 horas. Una vez transcurrido este tiempo, se recogió el sobrenadante y se agregó un mililitro de TRIZOL directamente en las cajas que contenían las células infectadas.

Posteriormente, el homogenado del TRIZOL junto con las células lisadas se colectó en tubos eppendorf libres de RNasas. Se mezcló con vortex y se procedió a incubar cada muestra durante 10 minutos en hielo y 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se adicionaron 200 μ l de cloroformo y se mezcló por inversión, para incubarse después, durante 3 minutos a temperatura ambiente, enseguida se centrifugó a 12000 g durante 15 minutos a 4° C. Se recuperó la fase acuosa en un tubo limpio vacío y se adicionaron 500 μ l de alcohol isopropílico, se mezcló por inversión e incubó por 10 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 12000 g durante 10 minutos a 4° C. Se decantó el sobrenadante y se lavó la pastilla con 1 ml. de etanol al 75% y se centrifugó a 7500 g durante 5 minutos a 4° C. Finalmente, se decantó el sobrenadante y la pastilla fue secada al aire durante 15 minutos y resuspendida con 50 μ l de H₂O tratada con DEPC 0.1%. La cantidad de RNA se determinó por medio de espectrofotometría a 260 nm y 280 nm en una dilución 1:1000 del material obtenido en H₂O tratada con DEPC 0.1%. Posteriormente, se procedió a analizar la integridad de la muestra por medio de geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio (Sambrook et al., 1989).

VI.vii. Detección de mRNA de Quimiocinas por RT-PCR.

Antes de realizar la reacción de RT-PCR se trató 1 µg de RNA de cada muestra con Deoxyribonucleasa I Amplification Grade (DNasa I), (Invitrogen Cat. No. 18068-015) para eliminar posibles contaminaciones con DNA. Se siguieron las recomendaciones del fabricante, que fueron adicionar en tubos eppendorf en hielo 1 µg de RNA, 1 µl de buffer de reacción DNasa I 10X, 1 µl de DNasa I grado de amplificación (1U/µl) y agua tratada con DEPC para completar un volumen de 10 µl. Se mezcló por inversión e incubó por 15 minutos a temperatura ambiente. Para inactivar la DNasa se agregó 1 µl de EDTA 25 mM, seguido de una incubación a 65° C durante 10 minutos.

La expresión de mensajeros de las quimiocinas MCP-1 y RANTES fue analizadas por RT-PCR y como control endógeno se empleo la amplificación de β-actina. Las secuencias de los iniciadores y tamaño de los productos de PCR para los genes ya han sido publicados previamente; así como también su validación usando plasmidos que contengan los genes para cada quimiocina (Aliberti et al., 1999; Machado et al., 2000) (Tabla 1).

GEN	Secuencias	Tamaño del Amplificado
β-Actina	TGG AAT CCT GTG GCA TCC ATG AAA C TAA AAC GCA GCT CAG TAA CAG TCC G	349
MCP-1	CCG GAA TTC CAC TCA CCT GCT GCT ACT CAT TCA C CCG GAA TTC GGA TTC ACA GAG AGG GAA AAA TGG	505
RANTES	CGC GGA TCC CCA CGT CAA GGA GTA TTT CTA CAC C CGC GGA TCC CTG GTT TCT TGG GTT TGC TGT G	356

Tabla 1. Secuencia de iniciadores de quimiocinas

La reacción de RT-PCR se realizó con el método de SuperScript™ One-step RT-PCR con Taq platinum^R (Invitrogen Cat. No. 10928-042). La mezcla de RT-PCR consistió en 1 µg de RNA tratado con DNasas, 25 µg de Buffer de reacción 2X (que contiene 0.4 mM de cada dNTP. 2.4 mM MgSO₄), 1 µl de RT/Platinum Taq Mix, 10 µM primer directo y 10 µM del primer reverso, la reacción se completo con agua libre de RNasas a un volumen de 50 µl. Se

empleo un termociclador PTC-100 (MJ Research. Inc.) y se usaron las siguientes condiciones de reacción del RT-PCR en un solo paso. Para la síntesis de cDNA 55°C durante 30 minutos; 94° C, 2 minutos para inactivar la transcriptasa reversa y activación de platinum Taq. La amplificación de PCR se realizo con 35 ciclos de 94°C, 15 segundos, 60°C, 30 segundos; 72°C, 1 minuto. Con una extensión final de 72°C, 7 minutos. Para todos los grupo de iniciadores se corrió un control negativo (sin templado) en paralelo. El producto de los amplificados fue corrido en un gel de agarosa al 2% para su posterior análisis densitométrico.

VI.viii Análisis estadístico

Los resultados son expresados como la media aritmética del análisis de 3 ensayos independientes con su desviación estándar. Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas si $P < 0.05$ por una prueba t-Student.

VII. Resultados

VII.i. Infectividad y Replicación Intracelular

Se analizó la infección de la cepa Querétaro y Ninoa en macrófagos J-774 por microscopía de luz (Fig. 7 A-J). Al evaluar la infección con la cepa Querétaro después de 3 horas post-infección se obtuvo un porcentaje de infección del 32%. Por otro lado, las células incubadas por un lapso de 6 horas tuvieron un porcentaje de infección del 54%. Los tiempos de 12, 24 y 36 hrs. post-infección (p.i.) tuvieron un porcentaje del 75, 76 y 82 % respectivamente, sugiriendo que la infección con la cepa Querétaro va en aumento dependiendo del tiempo post-infección (Fig. 8 A).

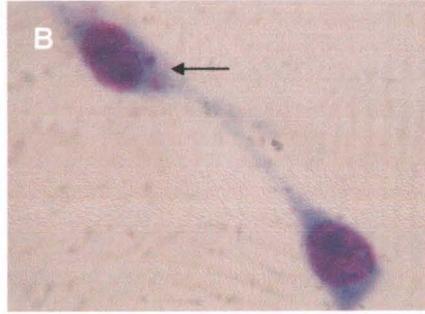
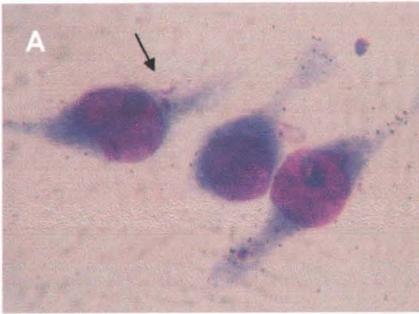
Por otro lado, la infección de los macrófagos de la línea J-774 con la cepa Ninoa tuvo un porcentaje de infección del 18% a las 3 horas de infección, de 28% a las 6 horas y de 39, 45 y 46 a las 12, 24 y 36 horas post-infección respectivamente. (Fig. 8A).

Ambas cepas tuvieron un comportamiento similar de aumento de la infección con respecto al tiempo, pero fue evidente desde los primeros tiempos de la infección que las células infectadas con la cepa Querétaro tuvieron un porcentaje de infección significativamente mayor que las células infectadas con la cepa Ninoa.

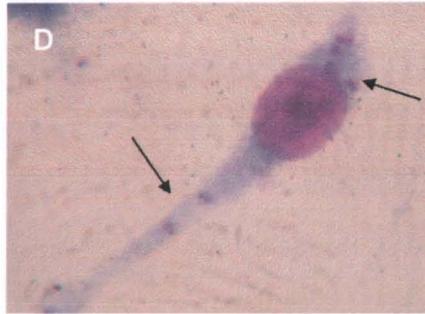
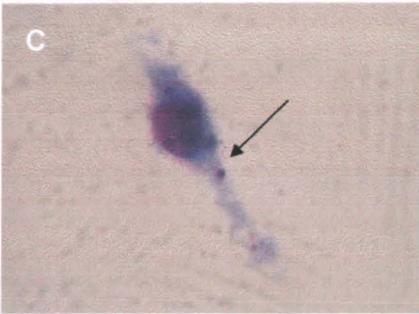
El número de amastigotes por célula también fue dependiente del tiempo, aumentado la cantidad de amastigotes por célula conforme aumentaba el tiempo de infección en ambas cepas (Fig. 7, Fig. 8 B). También el número de amastigotes por célula fue significativamente mayor en las células infectadas con la cepa Querétaro en comparación con las células infectadas con la cepa Ninoa sugiriendo una mayor capacidad infectiva por parte de la cepa Querétaro.

NINOA

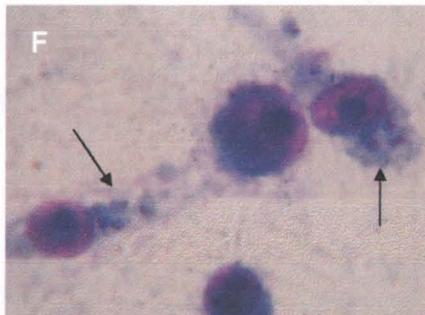
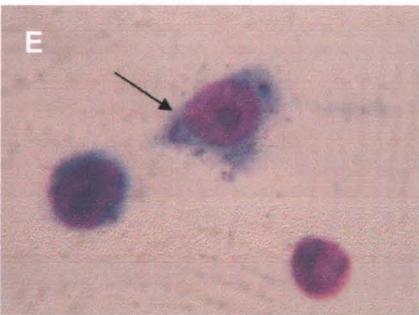
QUERETARO



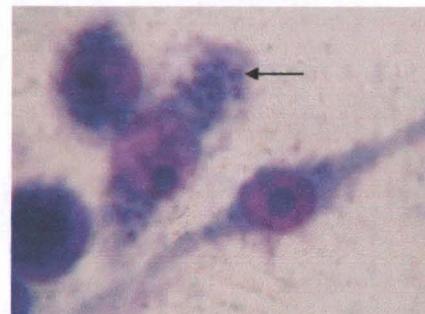
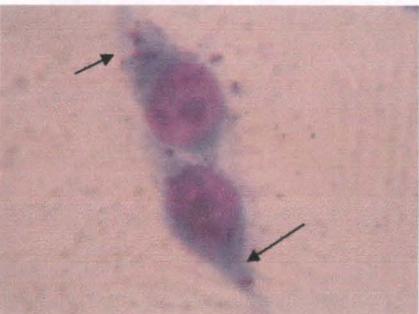
3 hrs.



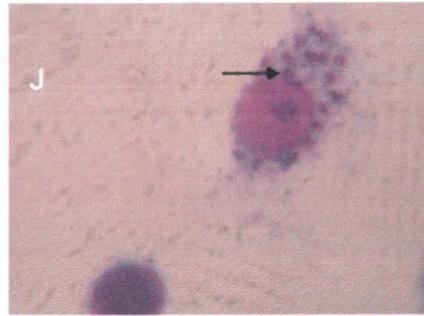
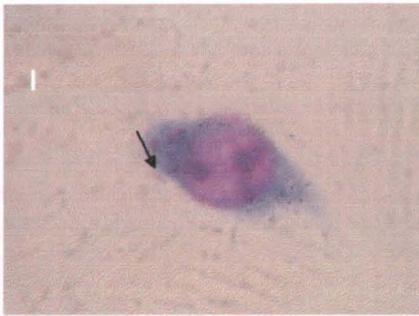
6 hrs.



12 hrs.



24 hrs.



36 hrs.

Figura 7. Microfotografías de la infección de Células J774 con las cepas Ninoa y Querétaro de *T. cruzi*. Macrófagos de la línea J774 fueron puestos en laminillas de teflón con 18 pozos a razón de 3,000 células por pozo, posteriormente fueron infectadas con las cepas Ninoa y Querétaro en tiempos de 3, 6, 12, 24 y 36 horas. Transcurridos estos tiempos, las laminillas fueron teñidas por medio del método de Giemsa A. macrófagos infectados con la cepa Ninoa 3hrs p.i., B. Macrófagos infectados con la cepa Querétaro 3hrs p.i., C. macrófagos infectados con la cepa Ninoa 6hrs p.i., D. Macrófagos infectados con la cepa Querétaro 6hrs p.i., E. Macrófagos infectados con la cepa Ninoa 12 hrs. P.i., F. Macrófagos infectados con la cepa Querétaro 12 hrs. p.i. G. Macrófagos infectados con la cepa Ninoa 24hrs post-infección, H. Macrófagos infectados con la cepa Querétaro 24hrs post - infección, I. Macrófagos infectados con la cepa Ninoa 36hrs post-infección, J. Macrófagos infectados con la cepa Querétaro 36 hrs post-infección. Las flechas indican los lugares donde se observan amastigotes intracelulares.

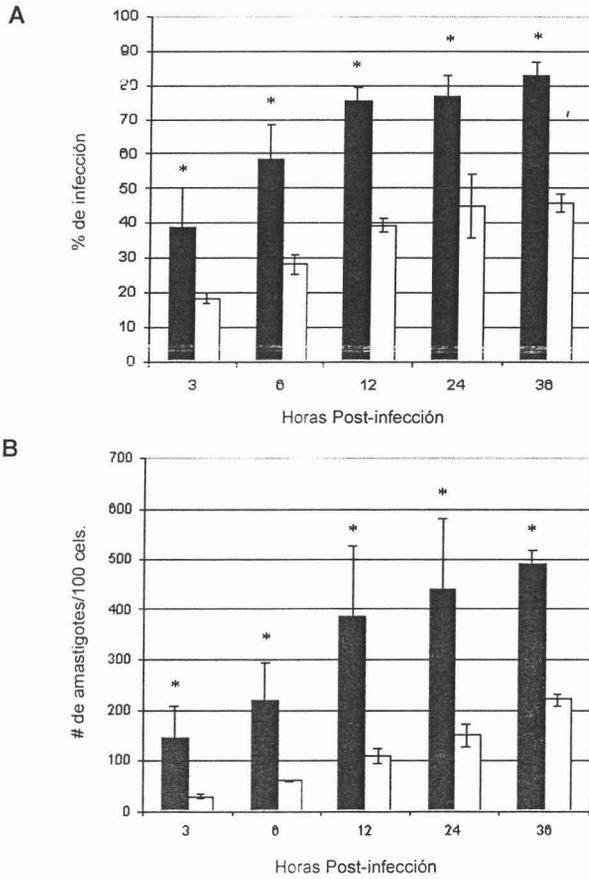


Figura 8. Ensayos de infección de macrófago de la línea J774 infectados con la cepas Querétaro (barras negras) y Ninoa (barras blancas). Tres mil células fueron infectados con los parásitos en una relación 10:1 parásito-célula. A) Porcentaje de infección, B) Número de amastigotes en 100 células. * diferencia significativa en la infección entre cepas con una $p=0.05$.

Para tratar de conocer si la cepa virulenta (Querétaro) entraba activamente más rápido dentro de la célula hospedera o se replicaba con mayor velocidad; se procedió a realizar ensayos de infección en tiempos cortos (15, 30, 60 y 120 min.), donde se sabe, el parásito aún no se ha replicado. Como se muestra en la figura 7A, se observó desde los 15 minutos un número mayor de células infectadas con la cepa Querétaro, esta diferencia fue significativa desde los 30 minutos post-infección (Fig. 9A). Así mismo, el número de amastigotes de dentro de las células fue mayor en los macrófagos infectados con la cepa Querétaro. Esta diferencia fue también significativa desde los 30 minutos posteriores a la infección (Fig. 9B).

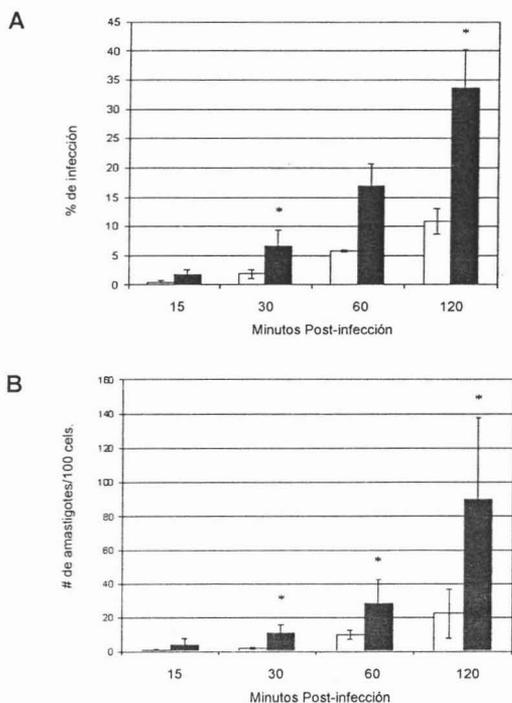


Figura 9. Ensayos de infección de macrófago de la línea J774 infectados con la cepas Querétaro (barras negras) y Ninoa (barras blancas) en tiempos cortos (15, 30, 1 y 2 horas). Tres mil células fueron infectados con los parásitos en una relación 10:1 parásito-célula. A) Porcentaje de infección, B) Número de amastigotes en 100 células. * Diferencia significativa en la infección entre cepas con una $p=0.05$.

VII.ii. Producción de Citocinas TNF- α , IL-12 e IL-10

Se analizó, en macrófagos de la línea J774 activados con 100 U/ml. de IFN- γ y no activados si había una producción diferencial de las citocinas TNF- α , IL-12 como parte de la respuesta proinflamatoria, y la citocina IL-10 como parte de la respuesta antiinflamatoria, en respuesta de la infección con las cepas Ninoa y Querétaro de *T. cruzi*. Como se puede apreciar en la figura 10A, la producción de la citocina TNF- α se ve significativamente incrementada en el grupo de células J774 que no fueron activadas con IFN- γ e infectadas con la cepa Querétaro. Este incremento fue alrededor de 9 veces más que lo producido por las células infectadas con la cepa Ninoa. Por otro lado, en el grupo experimental que fue activado con IFN- γ , se observó una diferencia significativa en las concentraciones de TNF- α obtenidas en los sobrenadantes de las células infectadas con la cepa Querétaro con respecto a las concentraciones obtenidas con la cepa Ninoa pero sin ser de la magnitud que se observó en el grupo experimental que no fue activado con IFN- γ .

Por su parte, la producción de la citocina IL-12, en las células infectadas con la cepa Ninoa, tuvo diferencias en ambos grupos, activados y sin activar con IFN- γ , con respecto al control. También en las células sin activar infectadas con la cepa Querétaro se observó un aumento con respecto al control pero no se observaron diferencias entre cepas (Fig. 10B).

Por último, en cuanto a la producción de la citocina IL-10, esta se vió incrementada en las células infectadas con ambas cepas sin activar así como en las células activadas e infectadas con la cepa Ninoa donde si hubo diferencias significativas con respecto al control, pero no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las cepas (Fig. 10C).

En las células activadas con IFN- γ , infectadas con la cepa Querétaro las variaciones obtenidas en la cuantificación de las citocinas IL-12 e IL-10 fueron tan amplias que no se pudo sacar una conclusión clara.

Los valores de densidad óptica obtenidos en la cuantificación de las tres citocinas por medio del método de ELISA se muestran en el anexo 4.

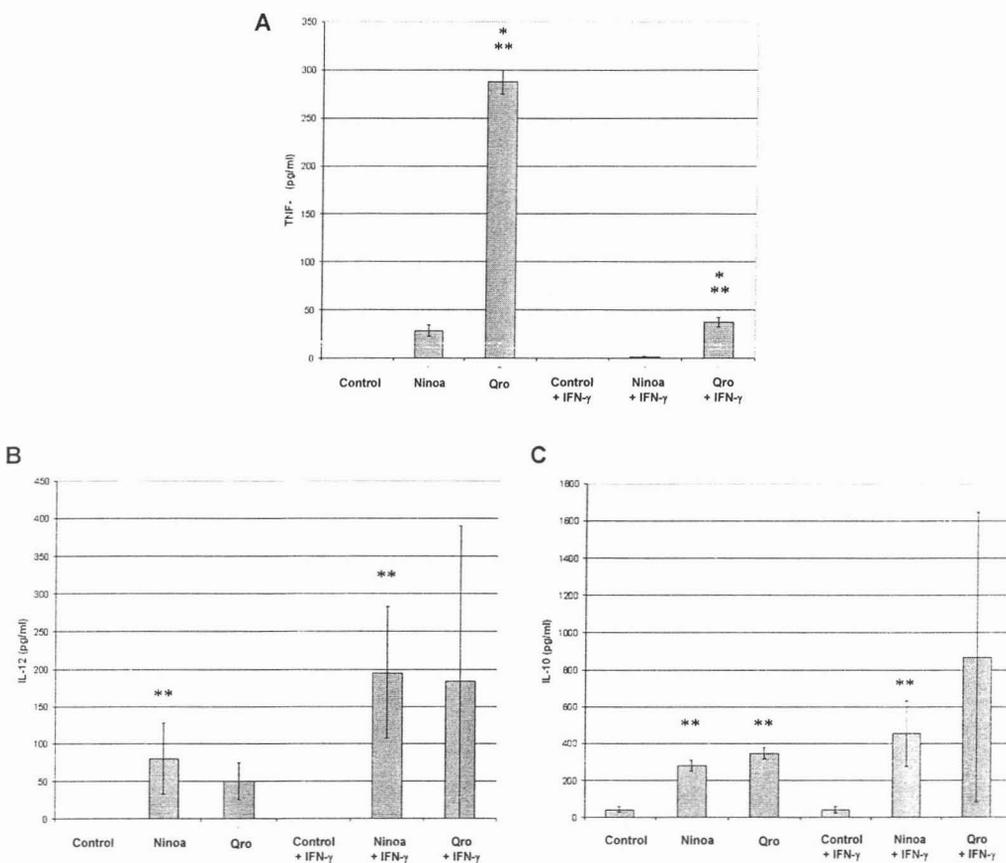


Figura 10. Cuantificación de citocinas en sobrenadantes de células J774. Células J774 fueron infectadas con las cepas Ninoa y Querétaro de *T. cruzi*. El sobrenadante se obtuvo 24 horas después de la infección y analizado por medio del método de ELISA. A) TNF- α , B) IL-12, C) IL-10. * Diferencia significativa en la infección entre cepas con una $p = 0.05$. ** Diferencia significativa en la infección con respecto al control con una $p = 0.05$.

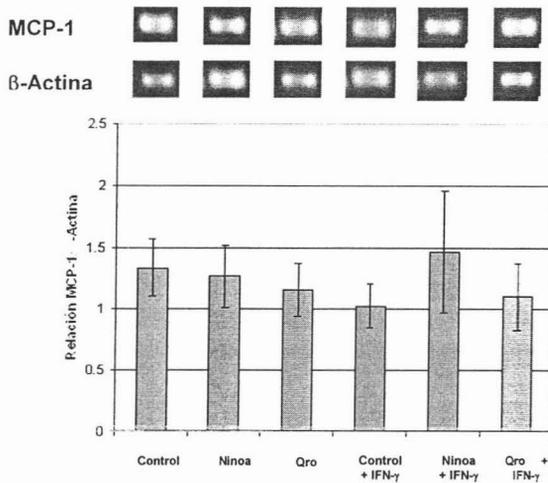
VII.iii. Expresión de Mensajeros RANTES Y MCP-1

Las quimiocinas RANTES y MCP-1 son producidas por monocitos y otras líneas celulares y tienen una acción directa sobre macrófagos, teniendo también una acción autócrina. En este estudio, se analizó la expresión de mensajeros para las quimiocinas RANTES y MCP-1 en cultivos de macrófagos infectados con las cepas Ninoa y Querétaro para determinar si existe una diferencia como resultado de la infección de dos cepas mexicanas con diferente virulencia.

Como se puede observar en la Figura 11A, la producción de la quimiocina MCP-1 tiene niveles de expresión similares en las células activadas y no activadas con IFN- γ . Es de resaltar que en el grupo activado con IFN- γ e infectado con la cepa Ninoa de *T. cruzi*, hay un aumento en la expresión de esta quimiocina, que aunque no fue significativo estadísticamente al ser comparado con la cepa Querétaro ni con el grupo control, es evidente en la gráfica.

Por otro lado, en la expresión de la quimiocina RANTES, no se observan diferencias significativas en el grupo que no fue activado con IFN- γ . Sin embargo, en el grupo activado se observó un incremento significativo de la expresión de esta quimiocina en el grupo experimental infectado con la cepa Ninoa con respecto al control sin infectar (Fig. 11B).

A



B

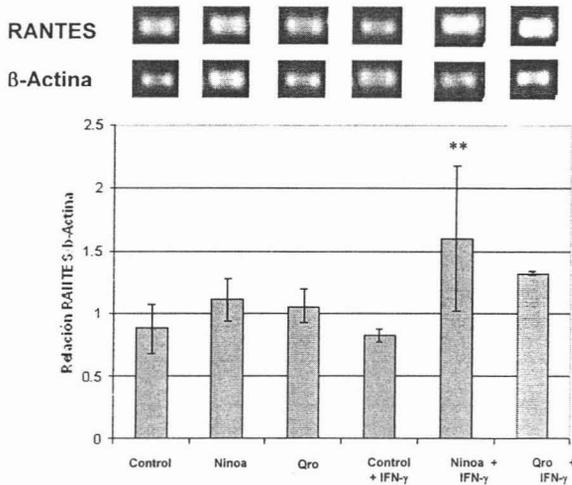


Figura 11. Determinación de la expresión de mensajeros para las quimiocinas A) MCP-1 y B) RANTES. Se extrajo RNA a partir de células J774 infectadas con las cepas Ninoa y Querétaro de *T. cruzi* para el ensayo de RT-PCR. Los amplificados fueron corridos en gels de agarosa al 2% y analizados por densitometría. Los resultados están expresados en una relación quimiocina/β-actina. Los gels mostrados son representativos de tres experimentos independientes. ** Diferencia significativa en la expresión de quimiocina con respecto al control con una $p=0.05$.

VII.iv. Producción de Óxido Nítrico

Se analizó la producción de óxido nítrico (NO) en el sobrenadante de macrófagos J774, activados con IFN- γ y sin activar, infectados con las cepas Ninoa y Querétaro para saber si inducían una respuesta diferencial. Como se puede apreciar en la figura 12, la producción de NO en el grupo de sobrenadantes que fueron recuperados a partir de células no activadas, se vio incrementada significativamente con respecto al control sin infectar. Esta diferencia fue también significativa entre las cepas, siendo la producción de NO en las células infectadas con la cepa Querétaro del doble de la producida por la cepa Ninoa. Por otro lado, la producción de NO fue mucho mayor en las células activadas con IFN- γ , donde se pudo observar un incremento significativo en la producción de NO en los sobrenadantes de células infectadas con ambas cepas con respecto al control no infectado. Más importante aún, se pudo observar una diferencia significativa en la producción de NO entre las células infectadas con las dos diferentes cepas, siendo la producción de NO inducida por la cepa Ninoa alrededor de 40% mayor que la inducida por la cepa Querétaro (Fig. 12).

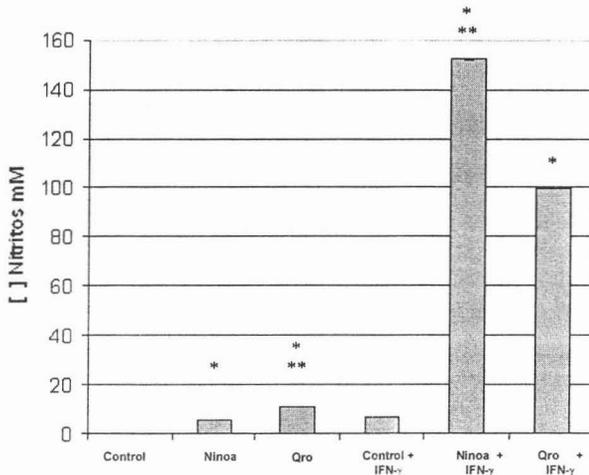


Figura 12. Cuantificación de la producción de óxido nítrico en sobrenadantes de células J774 infectadas con las cepas Ninoa y Querétaro de *T. cruzi*. Los sobrenadantes de analizaron por medio del método de Griess. * Diferencia significativa en la cuantificación de NO entre cepas. ** Diferencia significativa en la cuantificación de NO con respecto al control no infectado. $p=0.05$.

VIII. Discusión

El parásito *T. cruzi* es un organismo que presenta una amplia variabilidad genética. Esto se ve reflejado en su comportamiento biológico como es lo referente a virulencia, patogenicidad, tropismo y otras características propias de su naturaleza parasitaria.

Como se mencionó con anterioridad, las poblaciones de *T. cruzi*, están compuestas por un conjunto de cepas que circulan dentro de los ciclos selvático y doméstico, internacionalmente definidos como *T. cruzi* I y *T. cruzi* II respectivamente (Anonymous, 1999).

En este trabajo, se analizó la respuesta de los macrófagos a la infección con dos cepas mexicanas de *T. cruzi*, del tipo *T. cruzi* I (Lopez Olmos et al., 1998; Bosseno et al., 2002) que muestran un comportamiento biológico diferente entre ellas en modelo murino. Al inocular la misma cantidad de tripomastigotes (1×10^5) por vía peritoneal a ratones BALB/c, una cepa mata al 100% de los ratones durante la fase aguda de la infección (Querétaro), mientras que la otra cepa no mata a ninguno de los ratones infectados, llegando estos hasta la fase crónica de la infección (Ninoa), (Sosa, 2003; Rico, 2004).

El objetivo de este trabajo fue el de estudiar la interacción de *T. cruzi* con el hospedero utilizando para esto dos cepas que se sabe, difieren en virulencia, desde el punto de vista de los fenómenos inmunes que inducen estas cepas al infectar células tipo macrófago. Por ejemplo, si estas cepas que en el modelos *in vivo* presentaban diferencias en cuanto a virulencia, tendrían un comportamiento diferencial en un modelo *in vitro* en cuanto a infectividad se refiere, utilizando para esto una línea celular de macrófagos conocida como J774.

Los resultados de este estudio demuestran que estas cepas, además de presentar diferencias en virulencia en el modelo murino (Sosa, 2003; Rico, 2004), también muestran una clara diferencia en cuanto a infectividad en el modelo *in vitro*. La cepa Querétaro es alrededor de un 50% más infectiva (Fig. 7A) que la cepa Ninoa, reforzando la observación realizada previamente *in vivo*. También se demostró que la cepa Querétaro entra más

rápidamente a la célula hospedera que la cepa Ninoa. Esto se demostró en ensayos de infección en tiempos cortos, en los cuales se sabe que el parásito aún no se ha dividido (Ley *et. al.*, 1990) observándose un mayor número de células infectadas así como un mayor número de amastigotes por célula cuando se utilizó la cepa Querétaro. Las razones de este comportamiento no son muy claras, pero se podría deber a la expresión diferencial de moléculas de superficie involucradas en el reconocimiento del parásito por la célula hospedera como se ha sugerido en estudios hechos con otras cepas y en donde han encontrado la expresión diferencial de glicoproteínas de superficie y la actividad diferencias del señalamiento de calcio (Wilkowsky *et. al.* 1996; Ruiz *et. al.* 1998; Calvet *et. al.*, 2003). Experimentos para determinar la presencia de estas moléculas en ambas cepas se realizan actualmente en nuestro laboratorio.

Ahora bien, los macrófagos juegan dos distintos papeles en la infección con *T. cruzi*: como célula hospedera del parásito y como célula efectora en la respuesta inmune antiparasitaria. El éxito de la interacción de *T. cruzi* con el macrófago puede depender del estado de activación del macrófago. Los macrófagos pueden ser activados artificialmente por endotoxinas, también conocidas como lipopolisacáridos (LPS), que son componentes que se encuentran en la pared celular de una gran variedad de bacterias Gram negativas (Roitt y Delves, 2003), o por citocinas que son producidas durante la respuesta inmune (Golden *et. al.* 1991; Mc Cabe *et. al.* 1991). Una citocina en particular, el Interferón gamma (IFN- γ), ha sido bien caracterizado como un potente factor activador de macrófagos. En este estudio se activaron macrófagos con 100U/ml de IFN- γ recombinante, para determinar si había diferencias de respuesta por parte de los macrófagos ante la infección de las cepas mexicanas Querétaro y Ninoa de *T. cruzi*. Se midió la cantidad de la citocina TNF- α , que es otra citocina que en diversos estudios ha sido asociada con la actividad microbicida del macrófago, proveyendo una segunda señal para inducir la actividad microbicida en macrófagos activados con IFN- γ para estimular la producción de óxido nítrico (NO) (Green *et. al.*, 1990; Langermans *et. al.*, 1992).

A este respecto, un resultado inesperado fue el que muestra un incremento en la producción de TNF- α que se observó en los macrófagos infectados con la cepa Querétaro que no fueron activados con IFN- γ , el cual fue de casi 10 veces mayor que el que se obtuvo en las células infectadas con la cepa Ninoa del mismo grupo experimental. Por otro lado, el grupo de macrófagos que fue activado con IFN- γ también presentó una elevación en la producción de TNF- α por parte de los macrófagos infectados con la cepa Querétaro que, aunque no fue tan grande como en los macrófagos no activados, si presenta diferencias estadísticamente significativas. Este resultado sugiere que existe algo intrínseco y propio de la cepa Querétaro que está provocando este efecto en los macrófagos sin necesidad de que sean activados con anterioridad. Esto podría ser explicado por los resultados obtenidos en los ensayos de infección y que demostraron que esta cepa entra más rápido en la célula hospedera, ya que, si la teoría de que este fenómeno se debe a una sobre-expresión de moléculas de superficie que reconozcan la célula blanco es correcta, podría haber una mayor unión de más receptores del parásito a sus ligandos, como por ejemplo los TLR's.

Ahora bien, se ha descrito que el glicosilfosfatidinositol (GPI) y los glicoinositolfosfolípidos (GIPL's), derivado de *T. cruzi* son reconocidos a través de TLR2/CD14, sugiriendo que éstos glicolípidos del parásito son los PAMP's por los cuales *T. cruzi* es reconocido por los macrófagos (Campos *et. al.*, 2001).

Los resultados obtenidos en este estudio podrían ser explicados si se confirmara la presencia de una diferencia en el número de moléculas de GPI y de GIPL's en la superficie de parásitos de las cepas Ninoa y Querétaro ya que, de ser esto así, podrían inducir una mayor cantidad de moléculas de superficie en la célula hospedera, como los TLR's antes mencionados, lo cual podría culminar en una mayor producción de citocinas como el TNF- α .

Los resultados obtenidos al medir la secreción de IL-10 e IL-12 indican que si hay una producción similar de estas dos citocinas tanto en el grupo activado como en el no activado. No hubo diferencias significativas en la producción de estas citocinas entre los

macrófagos infectados con ambas cepas, observándose grandes variaciones en la producción de IL-10 e IL-12 en los macrófagos infectados por la cepa Querétaro.

También se ha visto que cuando se infectan *in vitro* macrófagos peritoneales con tripomastigotes, estos macrófagos producen y secretan algunas quimiocinas de las familias CC y CXC que son importantes para la activación de los macrófagos (Aliberti et al., 1999; Talvani et al., 2000; Coelho et al., 2002). El presente trabajo sugiere que la producción de la quimiocina RANTES se incrementa significativamente con respecto al control en los macrófagos infectados con la cepa Ninoa lo cual no fue observado en los macrófagos infectados con la cepa Querétaro. Además, no hubo diferencias significativas al comparar la expresión de este mensajero inducido por la infección de las diferentes cepas. En lo referente a la quimiocina MCP-1 no se observaron diferencias significativas en ninguno de los grupos experimentales. La expresión similar de los mensajeros para RANTES y MCP-1 en los macrófagos infectados con ambas cepas nos sugiere que esta infección no afecta diferencialmente la producción de estos mensajeros, lo cual contrasta con los datos obtenidos utilizando estas mismas cepas en un modelo murino (Oaxaca, 2005).

Generalmente se acepta que el NO producido por macrófagos activados tienen un papel importante en la eliminación de diferentes patógenos (Adams et al., 1990; Assreuy et al., 1994; Fleisch et al., 1991; Gazzinelli et al., 1992; Granger et al., 1988; Vicendeau y Daulouede, 1991). Por esta razón en este trabajo se cuantificó la producción de NO en macrófagos infectados con las dos cepas con diferente virulencia. Los resultados muestran un incremento en la producción de NO en las células activadas con IFN- γ e infectadas con la cepa Ninoa de *T. cruzi* de casi tres veces más que el inducido en las células infectadas con la cepa Querétaro (Fig. 12). Este incremento fue estadísticamente significativo y contrasta con los resultados obtenidos en la cuantificación de TNF- α . Estos resultados son contradictorios ya que el papel de TNF- α en la activación de macrófagos resulta en un incremento en la producción de NO por parte de las células infectadas. Lo observado en el presente trabajo nos hace suponer que la cepa Querétaro tiene algún mecanismo que

reduce la síntesis de NO en el macrófago como un mecanismo de evasión de la respuesta inmune. Se han hecho estudios en los que se ha observado que las glicoproteínas parecidas a mucinas GPI de *T. cruzi*, disparan cascadas de señalización que involucran moléculas adaptadoras como MyD-88 y la familia de las MAPK, así como factores de transcripción que conducen a la producción de IL-12, IL-10, TNF- α y NO (Camargo *et. al.* 1997; Ropert *et. al.* 2000) y de alguna manera las moléculas de superficie de estas dos cepas pudieran estar interactuando diferencialmente con el macrófago.

Ahora bien, recientemente se ha descrito que existe un fenómeno llamado tolerancia a endotoxinas en macrófagos en respuesta a LPS, el cual también se ha demostrado puede ser inducido por GPI de *T. cruzi* (Ropert *et. al.*, 2001). Este fenómeno de tolerancia está asociado con la supresión de vías de señalización que involucran a los TLR's, el receptor de IL-1 y el receptor para TNF- α . Además, va acompañado de la supresión de varios genes y la producción de citocinas como TNF- α , IL-6 e IL-12. Interesantemente, la expresión de otros mediadores de la respuesta inmune como IL-10 y NO no son afectadas en la tolerancia a LPS, sugiriendo que la tolerancia a endotoxinas no afecta todas las funciones celulares (Ropert *et. al.*, 2003). Este podría ser uno de los mecanismos que explicara la contradicción encontrada en la producción de TNF- α y NO en los grupos activados con IFN- γ , ya que en las células activadas e infectadas con ambas cepas se observa una producción muy baja de TNF- α que no concuerda con las concentraciones de NO encontrados en dichos grupos experimentales.

Finalmente, los resultados obtenidos en la producción de NO nos sugieren que la mayor producción inducida por parte de la cepa Ninoa es uno de los mecanismos por los cuales esta cepa puede ser controlada, ya que, la respuesta oportuna y efectiva del macrófago limitará el crecimiento del parásito y permitirá al hospedero controlar la infección, hecho observado en nuestro grupo en el modelo murino de infección (Sosa, 2003; Rico, 2004)

En general, la cepa Ninoa estimula un perfil de citocinas TH1 acompañada de la producción de óxido nítrico mientras que la infección con la cepa Querétaro, por el contrario, parece inducir un desequilibrio en los macrófagos al producir una excesiva producción de TNF- α , e inducir una menor producción de NO y otras citocinas pro-inflamatorias.

Los mecanismos moleculares que pudieran estar induciendo este tipo de fenómenos inmunes será motivo de estudios posteriores en el laboratorio.⁴ Sería de interés realizar estudios de activación de las cascadas de señalización involucradas en la producción de TNF- α y NO en infecciones con estas dos cepas para explicar los resultados observados en este estudio.

IX. Conclusiones

- Hay claras diferencias en la capacidad de infección de las cepas no virulenta y virulenta
- La producción de la citocina TNF- α es diferente entre las células infectadas y activadas con IFN- γ con ambas cepas con respecto al control sin infectar. Más aún, se pueden apreciar diferencias entre ambas cepas en la inducción de esta citocina en macrófagos no activados.
- La producción de las citocinas IL-12, IL-10 y las quimiocinas RANTES y MCP-1 se vio incrementada por la infección con *T. cruzi*, sin haber diferencias relacionadas con la cepa infectante.
- La producción de NO fue significativamente mayor en los macrófagos activados infectados con la cepa no virulenta Ninoa.

X. Bibliografia

- 1 Adams L., Hibbs J. H., Tainor R. R., Krahenbuhl J. L.. 1990. Microbiostatic effect of murine-activated macrophages for *Toxoplasma gondii*. Role for synthesis of inorganic nitrogen oxides from L-Arginine. *J. Immunol.* 144:2725-2729.
- 2 Aliberti J. C., Machado F. S., Gazzinelli R. T., Teixeira M. M., Silva J. S. 1999. platelet-activating factor induces nitric oxide synthesis in *Trypanosoma cruzi*-infected macrophages and mediates resistance to parasite infection in mice. *Infect. Immun.* 67:2810-2814.
- 3 Aliberti J.C.S., Machado F. S., Souto J. T., Campanelli A. P., Teixeira M. M., Gazzinelli R. T., Silva J. S. 1999. β - Chemokines enhance parasite uptake and promote nitric oxide-dependent microbiostatic activity in murine inflammatory macrophages infected with *Trypanosoma cruzi*. *Infect. Immun.* 67: 4819-4826.
- 4 Andrews N. W., Hong K. S., Robbins E. S., Nussenzweig V. 1987. Stage specific surface antigens expressed during the morphogenesis of vertebrate forms of *Trypanosoma cruzi*. *Exp. Parasitol.* 64:474-484.
- 5 Andrews N. W. 1993. Living Dangerously: How *Trypanosoma cruzi* uses lysosomes to get inside host cell, and then escapes into the cytoplasm. *Biol. Res.* 26:65-67.
- 6 Anonymous. 1999. Recommendations from a satellite meeting. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, Vol. 94, Suppl. I: 428-432.
- 7 Assreuy J. F., Cunha F. Q., Epperlein M., Noronha-Dutra A., O'Donnell C. A., Liew F. Y., Moncada S. 1994. Production of nitric oxide and superoxido by activated macrophages and killing *leishmania major*. *Eur. J. Immunol.* 24:672-276.
- 8 Bosseno M. F., Espinoza B., Sánchez B., Breniere, A. F. 2000. Mexican *Trypanosoma cruzi* stocks: analysis of minicircle kDNA homologies by cross-hybridization. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 95: 473-476.

- 9 Bosseno M. F., Barnábe C., Magallón E., Kasten F. L., Ramsey J., Espinoza, B., Brenière S. F. 2002. Predominance of *Trypanosoma cruzi* lineage I in México. J. Clin. Microbiol. 40: 627-632.
- 10 Brener Z. 1973. Biology of *Trypanosoma cruzi*. Annu. Rev. Microbiol. 27: 347-383.
- 11 Brener Z. 1980. Immunity to *Trypanosoma cruzi*. Adv. Parasitol. 19:247-292.
- 12 Brener Z. y Krettl A. U. 1990. Immunology of Chagas disease. En: Modern parasite biology. Cellular, immunological and molecular aspects. David J y Wyler WH. Eds. Free and Company. New York. 247-261.
- 13 Brisse S., Verhoef J., Tibayrenc M. 2001. Characterisation of large and small subunit rRNA and mini-exon gene further support the distinction of six *Trypanosoma cruzi* lineages. Int. J. Parasitol. 31:1218-1226.
- 14 Brisse S., Barnabé C., Tibayrenc M. 2000. Identification of six *Trypanosoma cruzi* phylogenetic lineages by random amplified polymorphic DNA and multilocus enzyme electrophoresis. Inter. J. Parasitol. 30: 35-44.
- 15 Burleigh B. A. y Andrews N. W. 1995. The mechanisms of *Trypanosoma cruzi* invasion of mammalian cells. Ann. Rev. Microbiol. 49:175-200.
- 16 Calvet C. M., Toma L., de Souza F. R., de Nazareth M., de Meirelles S. I., Pereira M. C. 2003. Heparan sulfate proteoglycans mediate the invasion of cardiomyocytes by *Trypanosoma cruzi*. J. Eukaryot. Microbiol. 50: 97-103.
- 17 Camargo M. M. 1997. Glycosylphosphatidylinositol-Anchored Mucin-Like glycoproteins isolated from *Trypanosoma cruzi* initiate the synthesis of proinflammatory cytokines by macrophages. J. Immunol. 158:5890-5901.
- 18 Campos M. A. S., Almeida I.C., Takeuchi O. 2001. Activation of toll-like receptor-2 by glycosylphosphatidylinositol anchors from a parasitic protozoan. J. Immunol. 167: 416-423.
- 19 Carneiro M., Chiari E., Gonçalves A. M., da Silva Pereira A. A., Morel C. M., Romanha A. J. 1990. Changes in the isoenzyme and kinetoplast DNA patterns of *Trypanosoma cruzi* strains induced by maintenance in mice. Acta Trop. 47: 35-45.

- 20 Cardillo F. 1993. An age-related T cells suppressor activity correlates with the outcome of autoimmunity in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. Eur. J. Immunol. 23:2597-2605.
- 21 Carvallo R., Rabinovich, J., Tonn, R. 1985. Factores biológicos y ecológicos de la enfermedad de Chagas. Centro panamericano de ecología Humana y Salud. Servicio Nacional de Chagas. Ministerio de Salud y Acción Social. República Argentina.
- 22 Chen L., Tadashi W., Hisami W., Fujiro S. 2001. Neutrophil depletion exacerbates experimental Chagas disease in BALB/c, but protects C57Bl/6 mice through modulating the Th1/Th2 dichotomy in different directions. Eur. J. Immunol. 31: 265-275.
- 23 Coelho P. S., Klein A., Talvani A., Coutinho S. F., Takeuchi O., Akira S., Silva J. S., Canizzaro H., Gazzinelli R. T., Teixeira, M. M. 2002. Glycosylphosphatidylinositol-anchored mucin-like glycoproteins isolated from *Trypanosoma cruzi* tripomastigotes induce in vivo leukocyte recruitment dependent on MCP-1 production by IFN- γ -primed-macrophages. J. Leukoc. Biol. 71: 837-844.
- 24 Cortez M., Neira I., Ferreira D., Luquetti A. O., Rassi, A., Atayde, V. D., Yoshida, N. 2003. Infection by *Trypanosoma cruzi* metacyclic forms deficient in gp82 but expressing a related surface molecule, gp30. Infect. Immun. 71: 6184-6191.
- 25 Coura, J. R., Junqueira, A. C. V., Fernandes, O., Valente, S. A. S., Miles, M. A. 2002. Emerging Chagas disease in Amazonian Brazil. Trends Parasitol. 18: 171-176.
- 26 De Souza W. 1984. Cell Biology of *Trypanosoma cruzi*. Int. Rev. Cytol. 86:197-283.
- 27 De Souza W. 2002. From the cell biology to the development of new chemotherapeutic approaches against trypanosomatids: Dreams and Reality. Kinetoplastid Biology and Disease. 1:1-21.
- 28 Di Noia J. M., Buscaglia C. A., De MArchi C. R., Almeida I. C., Frasch A. C. 2002. A *Trypanosoma cruzi* small surface molecule provides the first immunological evidence that Chagas disease is due a single parasite lineage. J. Exp. Parasitol. 195:401-413.

- 29 DosReis G. A. 1997. Cell-Mediated Immunity in Experimental *Trypanosoma cruzi* Infection. *Parasitol. Today.* 13:335-342.
- 30 Espinoza B., Vera-Cruz J. M., González H., Ortega E., Hernández R. 1998. Genotype and virulence correlation within mexican stocks of *Trypanosoma cruzi* isolated from patients. *Acta Trop.* 70: 63-72.
- 31 Finley R. W. y Dvorak J. A 1987. *Trypanosoma cruzi*: Analysis of the population dynamics of heterogeneous mixtures. *J Protozool* 34: 409-415.
- 32 Flesch I. E. y Kaufmann S. H. 1991. Mechanisms involved in mycobacterial growth inhibition by gamma interferon-activated bone marrow macrophages. *Infect. Immun.* 59:3213-3218.
- 33 Fonseca S. M. y Romanha A. J. 1999. Characterization of *Trypanosoma cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 94, Suppl. I:* 177-180.
- 34 Gaunt M. W., Yeo M., Frame I. A., Stothard J. R., Carrasco H. J., Tylor M. C., Mena S. S., Veazey P., Miles G. A., Acosta N., De Arias A. R., Miles M. A. 2003 Mechanism of genetic exchange in american tripanosomes. *Nature.* 421:936-939.
- 35 Gazzinelli R. T., Oswald I. P., Hieny S., James S. L., Sher A. 1992. The microbicidal activity of IFN- γ treated macrophages against *Trypanosoma cruzi* involves an L-arginine-dependent, nitrogen oxide-mediated mechanism inhibitable by IL-10 and TGF- β . *Eur. J. Immunol.* 22:2501-2506.
- 36 Golden J. M. y Tarleton R. L. 1991. *Trypanosoma cruzi*: cytokine effects on macrophage activation. *Exp. Parasitol.* 72:391-402.
- 37 Granger D. L., Hibbs J. B., Perfect J. R., Durack D. T. 1988. Specific amino acid (L-arginine) requirement for the mMicrobiostatic activity of murine macrophages. *J. Clin. Invest.* 81:1129-1136.
- 38 Green S. J., Mellouk S., Hoffman S. L., Meltzer M. S., Nacy C. A. 1990. Cellular mechanisms of nonspecific immunity to intracellular infection: cytokine-induced synthesis of toxic nitrogen oxides from L-arginine by macrophages and hepatocytes. *Immunol Lett.* 25: 15-19.

- 39 Guzmán-Bracho C. 2001. Epidemiology of Chagas disease in México: an update. *Trends Parasitol.* 17: 372-376.
- 40 Kleffmann T., Schmidt J., Scaub G. A. 1998. Attachment of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes to hydrophobic substrates and use of this property to separate stages and promote metacyclogenesis. *J. Eukaryot. Microbiol.* 45:548-555.
- 41 Kuhn R. E. 1994. Macrophages in experimental Chagas' disease. *Immunol Ser.* 60:495-502.
- 42 Langermans J. A., Van der Hulst M. E., Nibbering P. H., Hiemstra P. S., Fransen L., Van Furth R. 1992. IFN-gamma-induced L-arginine-dependent toxoplasmastatic activity in murine peritoneal macrophages is mediated by endogenous tumor necrosis factor-alpha. *J Immunol.* 148:568-74.
- 43 Leedale G. F. y Vickerman K. 2000. An illustrated guide to the protozoa. Organisms traditionally referred to a protozoa, or newly discovered groups. Society of Protozoologists, USA. Lawrence. 1432pp.
- 44 Ley V., Andrews N. W., Robbins E. S., Nussenzweig V. 1988. Amastigotes of *Trypanosoma cruzi* sustain an infective cycle in mammalian cells. *J. Exp. Med.* 168:649-659.
- 45 Ley V., Robbins E. S., Nussenzweig V., Andrews N. W. 1990. The exit of *Trypanosoma cruzi* from the phagosome is inhibited by raising the pH of acidic compartments. *J. Exp. Med.* 171:401-413.
- 46 López-Olmos V., Pérez-Nasser N., Piñero D., Ortega E., Hernández R. Espinoza B. 1998. Biological characterization and genetic diversity of Mexican isolates of *Trypanosoma cruzi*. *Acta Trop.* 69:239-254.
- 47 Macedo A. M., Machado C. R., Oliveira R. P., Pena, S. D. J. 2004. *Trypanosoma cruzi*: Genetic structure of populations and relevance of genetic variability to the pathogenesis of Chagas disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 99: 1-12.
- 48 Machado F. S., Martins G. A., Aliberti J. C. S., Mestriner F. L. A. C., Cunha, F. Q., Silva, J. S. 2000. *Trypanosoma cruzi*-infected cardiomyocytes produce chemokines

- and cytokines that trigger potent NO-dependent trypanocidal activity. *Circulation* 120: 3003-3008.
- 49 Machado C. A. y Ayala F. J. 2001. Nucleotide sequences provide evidence of genetic exchange among distantly related lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98:7396-7401.
- 50 Mc Cabe J. M., Meagher S. G., Mullins B. T. 1991. *J. Infect. Dis.* 163:912-915.
- 51 Miles M. A., Toye P. J., Oswald S. C., Godfrey D. G. 1977. The identification by isoenzyme 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.
- 52 Miles M. A., Souza A, Pova M., Shaw J. J., Lainson R., Toye P. J. 1978. Isozymic heterogeneity of *Trypanosoma cruzi* in the first autochthonous patients with Chagas' disease in Amazonian Brazil. *Nature.* 272: 819-821
- 53 Miles M. A., Cedillos R. A., Pova M. M., de Souza A. A., Prata A., Macedo V. 1981. Do radically dissimilar *Trypanosoma cruzi* strains (zymodemes) cause Venezuelan and Brazilian forms of Chagas disease? *Lancet* 1: 1338-1340.
- 54 Minoprio P. 1989. Immunobiology of murine *Trypanosoma cruzi* infection: the predominance of parasite nonspecific responses and the activation of TCR I T cells. *Immunol. Rev.* 112:184-206.
- 55 Norris K. A., Brandt B., Cooper N. R., So M. 1991. Characterization of a *Trypanosoma cruzi* C3 binding protein with functional and genetic similarities to the human complement regulatory protein, decay-accelerating factor. *J. Immunol.* 147:2240-2247.
- 56 Norris K. A. :1998. Stable transfection of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes with the trypomastigote-specific complement regulatory protein cDNA confers complement resistance. *Infect. Immun.* 66:2460-2465.
- 57 Oaxaca E. 2005. Expresión de quimiocinas en modelo murino de infección con cepas de *Trypanosoma cruzi* que exhiben diferentes grados de virulencia. Tesis para obtener el grado de Biólogo. FES Iztacala.

- 58 Organización Mundial de la Salud. 1991. Control de la enfermedad de Chagas. Informe de un comité de expertos de la OMS. Serie Informes Técnicos No. 811. Ginebra. 101 pp.
- 59 Pasare C. y Medzhitov R. 2005. Toll-like receptors: linking innate and adaptive immunity. *Adv Exp Med Biol.* 560:11-18.
- 60 Postan M., McDaniel J. P., Dvorak J. A. 1986. *Trypanosoma cruzi*: constancy of clone pathogenicity for inbred mice during long-term in vitro maintenance. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 80: 659-662.
- 61 Rangel-Flores, H., Sánchez, B., Mendoza-Duarte, J., Barnabé, C., Brenière, F. S., Ramos, C., Espinoza, B. 2001. Serologic and parasitological demonstration of *Trypanosoma cruzi* infections in an urban area of central México; correlation with electrocardiography alterations. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 65: 887-895.
- 62 Reed S. G. 1988. In vivo Administration of Recombinant IFN-gamma induces macrophage activation, and prevents acute disease, immune supresión and death in experimental *Trypanosoma cruzi* Infection. *J. Immunol.* 140:4342-4347.
- 63 Rico D. 2004. Respuesta inmune celular contra cepas mexicanas de *Trypanosoma cruzi*: papel de las citocinas. Tesis que para obtener el título de Biólogo. Facultad de Ciencias. UNAM.
- 64 Rodríguez M. M., Ribeiro M., Boscardin S. B. 2000. CD4+ Th1 but not Th2 clones efficiently activate macrophages to eliminate *Trypanosoma cruzi* through a nitric oxide dependent mechanism. *Immunol. Lett.* 73: 43-50.
- 65 Rodriguez A, Samoff E., Rioult M. G., Cheng A., Andrews N. W. 1996. Host cell invasion by tripanosomes requires lysosomes and microtubule/kinesin-mediated transport. *J. Cell. Biol.* 134:349-362.
- 66 Rodriguez A., Webster P., Ortego J., Andrews N. W. 1997. Lysosomes behave as Ca²⁺ - regulated exocytic vesicles in fibroblats and epithelial cells. *J. Cell. Biol.* 137:93-104.

- 67 Romanha A. J. 1982. Heterogeneidade enzimática em *Trypanosoma cruzi*, PhD Thesis, UFMG, Belo Horizonte, 110 pp.
- 68 Roitt I. M. y Delves P. J. 2003. Inmunología Fundamentos. Décima Edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina. 559pp.
- 69 Ropert C. y Gazzinelli RT. 2000. Signaling in immune system cells by glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor and related structures derived from parasitic protozoa. *Curr. Opin. Microbiol.* 3:395-403.
- 70 Ropert C., Almeida C., Ciosel M., Travassos L., Ferguson M., Cohen P., Gazzinelli R. 2001. Requirement of mitogen-activated protein kinases and I κ B phosphorylation for induction of proinflammatory cytokine synthesis by macrophages indicates functional similarity of receptors triggered by glycosylphosphatidylinositol anchors from parasitic protozoa and bacterial lipopolysaccharide. *J. Immunol.* 166:3423.
- 71 Ropert C., Ciosel M., Chavez A., Gazzinelli R. 2003. Inhibition of a σ 38/Stress-activated protein kinase-2-dependent phosphatase restores function of IL-1 receptor-associated kinase-1 and reverses Toll-like receptor 2 and 4 dependent tolerance of macrophages. *J. Immunol.* 171:1456.
- 72 Ropert C. y Gazzinelli R. 2004. Regulatory role of Toll-like receptor 2 during infection with *Trypanosoma cruzi*. *J. Endotoxin Research.* 10(6):425.
- 73 Ruiz R. C., Favorito S., Dorta L. M., Oshiro M. E. M., Ferreira A. T., Manque P. M., Yoshida N. 1998. Infectivity of *Trypanosoma cruzi* strains is associated with differential expresión of surface glycoproteins with differential Ca²⁺ signalling activity. *Biochem. J.* 330:505-511.
- 74 Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA.
- 75 Silber A. M., Marcipar I. S., Roodveldt C., Meckert C., Laguens R., Marcipar A. J. 2002. *Trypanosoma cruzi*: identification of a galactose-binding protein that binds to cell surface of human erythrocytes and is involved in cell invasion by the parasite. *Exp. Parasitol.* 100: 217-225.

- 76 Sosa S. 2003. Respuesta inmune celular contra cepas mexicanas de *Trypanosoma cruzi*
- 77 . Tesis que para obtener el Título de: Biólogo. Facultad de Ciencias. UNAM. p. 78.
- 78 Takle G. y Snary D., 1993. Immunology and molecular biology in parasitic infection. Editor. Keneth Warren. Edit. Blackwel Scientific Publication.
- 79 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., 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*. *Microbes and Infection* 2: 851-866.
- 80 Tardieux I., Webster P., Ravesloot J., Lunn J. A., Heuser J. E., Andrews N. W. 1992. Lysosome recruitment and fusion are early events required for tripanosome invasion af mammalian cells. *Cell*. 71:1117-1130.
- 81 Tarleton R. L. 1995. The role of T cells in *Trypanosoma cruzi* infections. *Parasitol. Today* 11:7-9.
- 82 Tarleton R. L. 1997. Immunity to *Trypanosoma cruzi*. In: Host response to intracelular pathogens. Editor: Haufmann SHE. Landes Company, Austin, Tx. 227-247.
- 83 Tay J., Lara R., Velasco O., Gutiérrez, M. 1996. Parasitología Médica. Sexta edición Méndez Editores, México. pp: 107-128.
- 84 Tibayrenc M., Ward P., Moya A., Ayala F. J. 1986. Natural populations of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease, have a complex multiclonal structure. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 1335-1339.
- 85 Tibayrenc M. y Ayala F. J. 1988. Isozyme variability in *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease: genetical, taxonomical, and epidemiological significance. *Evolution* 42: 277-292.

- 86 Trujillo F., Lozano F., Soto M. M., Hernández R. 1993. Prevalencia de infección a *Trypanosoma cruzi* en donadores de sangre en el Estado de Jalisco, México. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 26: 89-92.
- 87 Tyler K. M. y Engman D. E. 2000. Flagellar elongation induced by glucose limitation is preadaptive for *Trypanosoma cruzi* differentiation. Cell Motil. Cytoskeleton 46:269-278.
- 88 Tyler K. M. y Engman D. M. 2001. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. Int. J. Parasitol. 31:472-481.
- 89 Velasco-Castrejón O. 1991. La enfermedad de Chagas. Publicaciones Técnicas INDRE # 8. SSA. México D.F.
- 90 Velasco-Castrejón O., Valdespino J. L., Tapia-Conyer R., Salvatierra B., Guzmán-Bracho C., Magos C., Llausás A., Gutiérrez G., Sepúlveda J. 1992. Seroepidemiología de la enfermedad de Chagas en México. Salud Pública Mex. 34:186-196.
- 91 Vespa G. N., Cunha F. Q., Silva J. S. 1994. Nitric oxide is involved in control of *Trypanosoma cruzi*-induced parasitemia and directly kills the parasite in vitro. Infect Immun. 62(11):5177-5182.
- 92 Vicendeu P. y Daulouede. 1991 Macrophage cytostatic effect on *Trypanosoma musculi* involves an L-arginine dependent mechanism. J. Immunol. 146:4338-4343.
- 93 Villalta F., Zhang Y., Bibb K.E., Kappes J. C., Lima M. F. 1998. The cysteine-cysteine family of chemokines RANTES, MIP-1 α , and MIP-1 β induce trypanocidal activity in human macrophages via nitric oxide. Infect. Immun. 66: 4690-4695.
- 94 Wilkowsky S. E., Wainszelbaum M. J., Isola ELD. 1996. *Trypanosoma cruzi*: participation of intracellular Ca²⁺ during metacyclic trypomastigote-macrophage interaction. Bioch. and Bioph. Res. Comm. 222:386-389.
- 95 Zhang Q., Tibayrenc M., Ayala F. J. 1988. Linkage disequilibrium in natural populations of *Trypanosoma cruzi* (flagellate), the agent of Chagas disease. J. Protozool 35: 81-85.

96 www.dpd.cdc.gov/dpdx

97 http://www.sigmaaldrich.com/Area_of_Interest/Life_Science/Cell_Signaling/Scientific_Resources/Pathway_Slides___Charts/Inductible_Nitric_Oxide_Synthase__iNOS_.html

XI. Anexo 1

Tratamiento de las laminillas (Cell-line No. Cat. 10-476 con 18 pozos) anterior al ensayo de infección

1. Las laminillas son puestas en Etanol al 70% por 18 horas
2. Se realizaron 10 lavados sumergiendo las laminillas 10 veces en cajas de Coplin con agua corriente.
3. Las laminillas fueron puestas en HCl 1N en una caja de Coplin en un agitador durante 30 min.
4. Enseguida se hicieron 10 lavados con agua corriente como en el paso número 2.
5. Se pusieron en agitación durante 30 min en una caja de Coplin con PBS
6. Se hicieron otros 10 lavados mas con agua corriente (ver paso 2)
7. Cada laminilla fue puesta en una caja de Petri con una cama de papel filtro Wattman del número 1, envueltas en papel estraza y esterilizadas hasta su uso.

XII. Anexo 2

Preparación del colorante Giemsa

Solución Madre

- Se pesan 0.75 gr. de colorante Giemsa (Sigma No. Cat. 51811-82-6) y se disuelven en 65 ml. de metanol y 35 ml. de glicerina pura.
- Se pone en agitación por un lapso de 30 min.
- Se filtra con un papel Whatman de No. 1.
- Se guarda en un frasco color ambar hasta su uso.

Solución de Trabajo

- Se disuelven 5 ml. de la solución madre de Giemsa en 45 ml. de Buffer de Fosfatos

XIII. Anexo 3

Ensayo de Oxido Nítrico

Preparación de la Curva Estándar.

- Se utiliza Nitrito de Sodio como estándar (Solución Stock (SS)= 20mM o 69 mg de Nitrito de Sodio en 50ml de ddH₂O)

Concentración	Dilución	Volúmenes
200	1:100 SS	10µl SS + 990µl de medio
100	1:2 Sol 200	300µl sol. 200 + 300 µl de medio
50	1:2 Sol 100	300µl sol. 100 + 300 µl de medio
25	1:2 Sol 50	300µl sol. 50 + 300 µl de medio
12.5	1:2 Sol 25	300µl sol. 25 + 300 µl de medio
6.25	1:2 Sol 12.5	300µl sol. 12.5 + 300 µl de medio
3.125	1:2 Sol 6.25	300µl sol. 6.25 + 300 µl de medio

Reactivo de Griesse.

- El reactivo de Griesse esta constituido por dos soluciones:

A) 0.1% de Naftilendiamina Dihidroclorada en ddH₂O.

B) 1.0% de Sulfanilamida en H₃PO₄ al 2.5%

Ambas soluciones tienen que ser almacenadas a 4° C hasta su uso y ser mezclada inmediatamente antes de usarse ya que son sumamente sensibles a la luz.

Detección.

- En una placa de 96 pozos, añadir a cada pozo 100µl del estándar o de muestra del sobrenadante de macrófago por triplicado.
- Añadir 100µl del reactivo de Griesse (mezcla 1:1).
- Incubar a temperatura ambiente por 10 minutos.

- Leer la absorbancia a 550 y 570 nm en un lector de ELISA

Análisis

- Para el análisis de los datos se crea una curva estándar con las concentraciones conocidas del estándar de nitrito de sodio en el eje de las X y con su correspondiente Densidad optica en el eje de las Y.

XIV. Anexo 4

Resultados obtenidos de la densidad óptica (OD) en la cuantificación de las citocinas

TNF- α , IL-12 e IL-10 provenientes de 3 ensayos independientes por duplicado.

TNF- α

	Control Exp 1	Control Exp 2	Control Exp 3
OD1	0	0	0
OD2	0	0	0
Promedio	0	0	0
[] TNF- α			
	Ninoa Exp 1	Ninoa Exp 2	Ninoa Exp 3
OD1	0.01	0.012	0.005
OD2	0.011	0.012	0.005
Promedio	0.0105	0.012	0.005
[] TNF- α	32.8125	37.5	15.625
Promedio de []		28.6437	
Desv. Est.		6.02	
	QRO Exp 1	QRO Exp 2	QRO Exp 3
OD1	0.049	0.04	0.054
OD2	0.045	0.04	0.056
Promedio	0.047	0.04	0.055
[] TNF- α	146.875	125	171.875
Promedio de []		147.916667	
Desv. Est.		12.3	
	Control+IFN-γ Exp 1	Control+IFN-γ Exp 2	Control+IFN-γ Exp 3
OD1	0	0	0
OD2	0	0	0
Promedio	0	0	0
[] TNF- α			
Promedio de []			
Desv. Est.			
	Ninoa+IFN-γ Exp 1	Ninoa+IFN-γ Exp 2	Ninoa+IFN-γ Exp 3
OD1	0.001	0	0
OD2	0.003	0	0
Promedio	0.002	0	0
[] TNF- α	6.25	0	0
Promedio de []		2.0831	
Desv. Est.		0.5	
	QRO+IFN-γ Exp 1	QRO+IFN-γ Exp 2	QRO+IFN-γ Exp 3
OD1	0.024	0.003	0.016
OD2	0.015	0	0.014
Promedio	0.0195	0.0015	0.015
[] TNF- α	60.935	4.68	46.875
Promedio de []		37.5	
Desv. Est.		5.33	

IL-12

	Control Exp 1	Control Exp 2	Control Exp 3
OD1	0	0.006	0
OD2	0	0	0
Promedio	0	0.003	0
[] IL-12	0	2.34	0
Promedio de []			
Desv. Est.			
	Ninoa Exp 1	Ninoa Exp 2	Ninoa Exp 3
OD1	0.181	0.081	0.244
OD2	0.192	0.077	0.243
Promedio	0.1865	0.079	0.2435
[] IL-12	92.32	27.75	120.5
Promedio de []		80.19	
Desv. Est.		47.54990326	
	QRO Exp 1	QRO Exp 2	QRO Exp 3
OD1	0.149	0.066	0.12
OD2	0.163	0.076	0.099
Promedio	0.156	0.071	0.1095
[] IL-12	73.23	24.8	51.4
Promedio de []		49.81	
Desv. Est.		24.25411924	
	Control+IFN- α Exp 1	Control+IFN- γ Exp 2	Control+IFN- γ Exp 3
OD1	0	0	0
OD2	0	0	0
Promedio	0	0	0
[] IL-12			
Promedio de []			
Desv. Est.			
	Ninoa+IFN- α Exp 1	Ninoa+IFN- γ Exp 2	Ninoa+IFN- γ Exp 3
OD1	0.233	0.54	0.353
OD2	0.216	0.498	0.324
Promedio	0.2245	0.519	0.3385
[] IL-12	111.13	287.13	187.27
Promedio de []		195.1766667	
Desv. Est.		88.26599874	
	QRO+IFN- α Exp 1	QRO+IFN- γ Exp 2	QRO+IFN- γ Exp 3
OD1	0.115	0.664	0.149
OD2	0.125	0.679	0.175
Promedio	0.12	0.6715	0.162
[] IL-12	56.33	421.33	76.05
Promedio de []		184.57	
Desv. Est.		205.2771122	

IL-10

	Control Exp 1	Control Exp 2	Control Exp 3
OD1	0.024	0.034	0.03
OD2	0.032	0.064	0.039
Promedio	0.028	0.049	0.0345
[] IL-10	33.41	58.48	40.58
Promedio de []		44.15666667	
Desv. Est.		12.91203444	
	Ninoa Exp 1	Ninoa Exp 2	Ninoa Exp 3
OD1	0.105	0.127	0.109
OD2	0.094	0.118	0.114
Promedio	0.0995	0.1225	0.1115
[] IL-10	251.01	309.03	281.28
Promedio de []		280.44	
Desv. Est.		29.01911956	
	QRO Exp 1	QRO Exp 2	QRO Exp 3
OD1	0.121	0.153	0.136
OD2	0.125	0.142	0.147
Promedio	0.123	0.1475	0.1415
[] IL-10	310.29	372.1	356.96
Promedio de []		346.45	
Desv. Est.		32.21745024	
	Control+IFN- γ Exp 1	Control+IFN- γ Exp 2	Control+IFN- γ Exp 3
OD1	0.047	0.048	0.024
OD2	0.026	0.045	0.014
Promedio	0.0365	0.0465	0.019
[] IL-10	43.56	55.5	22.67
Promedio de []		40.57666667	
Desv. Est.		16.61708258	
	Ninoa+IFN- γ Exp 1	Ninoa+IFN- γ Exp 2	Ninoa+IFN- γ Exp 3
OD1	0.127	0.254	0.146
OD2	0.147	0.268	0.138
Promedio	0.137	0.261	0.142
[] IL-10	345.61	658.43	358.22
Promedio de []		454.08666667	
Desv. Est.		177.0788001	
	QRO+IFN- γ Exp 1	QRO+IFN- γ Exp 2	QRO+IFN- γ Exp 3
OD1	0.149	0.566	0.173
OD2	0.143	0.581	0.193
Promedio	0.146	0.5735	0.183
[] IL-10	368.31	1764.7	461.65
Promedio de []		864.88666667	
Desv. Est.		780.6574889	