



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO **UNAM**
POSGRADO 

FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

RESPUESTA INMUNE EN ÓRGANOS
BLANCO INFECTADOS CON CEPAS
MEXICANAS DE *Trypanosoma cruzi*.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE :
MAESTRA EN CIENCIAS (BIOQUIMICAS)

P R E S E N T A :
ANDREA CRISTINA VIZCAÍNO CASTILLO



Tutor: DRA. BERTHA ESPINOZA GUTIÉRREZ

MÉXICO, D.F.

Septiembre 2007



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

RESPUESTA INMUNE EN ÓRGANOS BLANCO INFECTADOS CON CEPAS MEXICANAS DE *Trypanosoma cruzi*.

RECONOCIMIENTOS

Esta tesis se realizó bajo la dirección de la Dra. Bertha Espinoza Gutiérrez en el laboratorio de Tripanosomiasis, en el Departamento de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El Comité Tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dra. Bertha Espinoza Gutiérrez	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
Dr. Ruy Pérez Montfort	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Dra. Marina Macías Silva	Instituto de Fisiología Celular, UNAM

Se reconoce la asesoría de la Dra. Rosalía Lira en la parte histológica e inmunohistoquímica de esta tesis, y sus comentarios a lo largo del desarrollo de este trabajo.

Se reconoce el apoyo técnico del M. en C. Ignacio Martínez Martínez, por su ayuda en la infección con *T. cruzi* de los ratones utilizados en este trabajo.

Se agradece el apoyo otorgado por el Dr. Marco Antonio Cerbón y el QFB Luciano Mendoza de la Facultad de Química, UNAM en la utilización de las instalaciones y asesoría para realizar los cortes en microtomo.

Se agradece al Dr. Raúl Mancilla, del Departamento de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas, por los comentarios realizados en la parte histológica.

Se agradece al Dr. Alejandro Camacho, del Departamento de Toxicología Ambiental del Instituto de Investigaciones Biomédicas, por los comentarios realizados sobre PCR en tiempo real.

Este trabajo de tesis se realizó bajo el apoyo de los proyectos de CONACYT 47822Q y DGAPA IN212806.

Durante los estudios de maestría gocé de una beca otorgada por CONACYT y de un complemento de beca otorgado por DGEP.

Esta tesis fue defendida en examen presentado el día de septiembre de 2007.

El Jurado de Examen de Grado estuvo constituido por:

Presidente	Dr. Ruy Pérez Montfort	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Vocal	Dra. Yolanda López Vidal	Facultad de Medicina, UNAM
Secretario	Dra. Marina Macías Silva	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Suplente	Dra. Clara Inés Espitia Pinzón	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
Suplente	Dr. Edgar Zenteno Galindo	Facultad de Medicina, UNAM

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Bertha Espinoza Gutiérrez, por permitirme formar parte de su equipo de trabajo, por el apoyo proporcionado para la realización de este proyecto.

A la Dra. Rosalía Lira, por sus enseñanzas y sus comentarios.

A los miembros del jurado, por sus correcciones y comentarios sobre esta tesis.

Al Biol. Edgar Oaxaca, por su amistad, enseñanzas y ayuda al inicio de mi proyecto.

A la U.N.A.M., por ser mi casa de formación académica.

DEDICATORIAS

A mi madre, alma bondadosa y llena de luz,

*A mi padre, ejemplo de perseverancia,
fuerza, responsabilidad,*

*A mi hermana, incondicional amiga,
confidente, cómplice,*

*A Rolando Galael, por todo lo
que se me pueda ocurrir,
¡salud por la autoimportancia!*

A toda mi familia, que sé que siempre estará ahí.

A mis grandes amigos, Alejandra Ávila y Luciano Mendoza, compañeros de carrera y de maestría, por los buenos momentos que su humor "ácido" nos hace vivir.

A todos los miembros del laboratorio, con quienes he compartido momentos buenos y momentos difíciles, frustraciones y logros: Andrea Jiménez, María Luisa, Cenia, Deyanira, Fer, Guiehdani, Elsa, Noemí, Rodrigo, Nacho, José Antonio, Natalia, Andrea Alejandra, y Aurora.

A Hiroko, Nancy, Libertad, Iris, Ivonne, Lorena, Dalia, Sylvia y Gura, pues el tiempo que llevamos de amigas iguala la mitad de nuestra edad.

A la familia Escobar del Pozo, Huguette, Carlos, Charlie, Lili y, desde luego, Rolando, por haberme acogido como un miembro más.

ÍNDICE

Índice de figuras	iii
Lista de abreviaturas	iv
Glosario	v
Resumen	vi
I. INTRODUCCIÓN	1
I.1. Generalidades	1
I.2. La enfermedad de chagas	2
I.2.1. Fase aguda	3
I.2.2. Fase crónica	3
I.2.3. Diagnóstico y tratamiento	5
I.3. Biología y ciclo de vida de <i>T. cruzi</i>	6
I.3.1. Morfología	6
I.3.2. Ciclo de vida	7
I.4. Transmisión del parásito	9
I.5. Variabilidad genética de <i>T. cruzi</i>	11
I.5.1. Implicación clínica de la variabilidad genética de <i>T. cruzi</i>	12
I.5.2. Cepas de <i>Trypanosoma cruzi</i> en México	13
I.6. Antecedentes	14
I.6.1. Respuesta inmune en la fase aguda de la enfermedad de Chagas	14
I.6.1.1. Papel de las citocinas y quimiocinas en la enfermedad de Chagas	14
I.6.1.2. Respuesta celular en la enfermedad de Chagas	17
I.6.1.3. Anticuerpos	20
I.6.2. Respuesta inmune en la fase crónica de la enfermedad de Chagas	21
I.6.3. Modelos experimentales para el estudio de la enfermedad de Chagas	22
II. JUSTIFICACIÓN	25
III. HIPÓTESIS	26
IV. OBJETIVOS	26
IV.1 General	26
IV.2 Particulares	26
V. DISEÑO EXPERIMENTAL	27

VI. MATERIAL Y MÉTODOS	28
VI.1. Ratones.....	28
VI.2. Parásitos.....	28
VI.3. Obtención de órganos.....	29
VI.4. Histología.....	29
VI.5. Inmunohistoquímica de epimastigotes de cultivo de <i>Trypanosoma cruzi</i>	30
VI.6. Inmunohistoquímica.....	31
VI.6.1. Detección de nidos de amastigotes y detección de macrófagos.....	31
VI.6.2. Detección simultánea de nidos de amastigotes y macrófagos.....	32
VI.6.3. Estandarización de las inmunohistoquímicas.....	32
VI.7. Extracción de RNA total.....	33
VI.7.1. Cuantificación de RNA por espectrofotometría.....	34
VI.8. Tratamiento del RNA con DNasa I.....	34
VI.8.1. Electroforesis en geles de agarosa 1%.....	34
VI.9. Transcripción reversa (RT) de mRNAs.....	35
VI.10. PCR en tiempo real (PCR-tr).....	35
VI.10.1. Primers.....	35
VI.10.2. Estandarización de las condiciones de amplificación.....	36
VI.10.3. PCR en tiempo real.....	36
VI.11. Análisis estadístico.....	37
VII. RESULTADOS	38
VII.1. Parasitemia.....	38
VII.2. Características macroscópicas.....	39
VII.3. Parasitismo en los tejidos.....	41
VII.4. Infiltrado inflamatorio.....	43
VII.5. Macrófagos en los infiltrados inflamatorios.....	48
VII.6. PCR en tiempo real.....	54
VII.6.1. Curvas de eficiencia de amplificación.....	55
VII.6.2. Expresión de mRNA de citocinas IL-4, IL-10, IL-12, IFN- γ , TNF- α en corazón de ratones infectados.....	57
VII.6.3. Expresión de mRNA de citocinas IL-4, IL-10, IL-12, IFN- γ , TNF- α en músculo esquelético de ratones infectados.....	60
VIII. DISCUSIÓN	63
IX. CONCLUSIONES	75
X. REFERENCIAS	76
ANEXO I. REACTIVOS.....	85
ANEXO II. TÉCNICAS CONVENCIONALES.....	89
ANEXO III. PCR EN TIEMPO REAL.....	98

Figura 1. Distribución geográfica de la enfermedad de Chagas.....	1
Figura 2. Fase aguda y crónica de la enfermedad de Chagas	5
Figura 3. Estadios de <i>T. cruzi</i>	7
Figura 4. Ciclo de vida de <i>T. cruzi</i>	8
Figura 5. Vectores de la enfermedad de Chagas en México.....	10
Figura 6. Respuesta inmune en la fase aguda de la enfermedad de Chagas	16
Figura 7. Curvas de parasitemia.....	38
Figura 8. Características macroscópicas	39
Figura 9. Peso del bazo de ratones infectados con las cepas Ninoa y Querétaro de <i>T. cruzi</i> , y de ratones sin infectar.....	40
Figura 10. Características macroscópicas en músculo esquelético	41
Figura 11. Detección de la cepa Ninoa de <i>T. cruzi</i> con el suero anti- <i>T. cruzi</i>	41
Figura 12. Detección de los parásitos en los tejidos	42
Figura 13. Cinética de infección en tejidos de ratones infectados con dos cepas mexicanas de <i>T. cruzi</i>	43
Figura 14. Grado de inflamación de tejidos infectados con la cepa Ninoa o Querétaro de <i>T. cruzi</i> a diferentes tiempos post-infección	44
Figura 15. Infiltrados inflamatorios en corazón.....	45
Figura 16. Infiltrados inflamatorios en colon	45
Figura 17. Infiltrados inflamatorios en músculo esquelético.....	46
Figura 18. Zonas de calcificación en músculo esquelético debido a infección con cepa Querétaro	46
Figura 19. Inmunohistoquímica de macrófagos.....	48
Figura 20. Presencia de macrófagos en los infiltrados inflamatorios en ratones infectados con <i>T. cruzi</i>	49
Figura 21. Ausencia de macrófagos en el tejido cardíaco	50
Figura 22. Detección de macrófagos en bazo y músculo esquelético, pero no en corazón..	51
Figura 23. Clasificación de nidos según el infiltrado celular y la presencia de macrófagos...	52
Figura 24. Porcentaje de nidos de amastigotes infiltrados en tejidos infectados con dos cepas mexicanas de <i>T. cruzi</i> a los 15 y 21 días pi.....	53
Figura 25. RNA total de corazón y músculo esquelético	54
Figura 26. Efecto de la infección con <i>T. cruzi</i> sobre el gen de referencia interno	55
Figura 27. Eficiencias de amplificación.....	56
Figura 28. Expresión de mRNA de citocinas proinflamatorias en corazón de ratones infectados.....	58
Figura 29. Expresión de mRNA de citocinas reguladoras en corazón de ratones infectados.....	59
Figura 30. Expresión de mRNA de citocinas proinflamatorias en músculo esquelético de ratones infectados	61
Figura 31. Expresión de mRNA de citocinas reguladoras en músculo esquelético de ratones infectados.....	62
Tabla 1. Secuencias de los primers utilizados y tamaño del amplicón	36

RESUMEN

Diversos estudios en nuestro laboratorio han mostrado que existen diferencias biológicas entre dos cepas mexicanas de *Trypanosoma cruzi* pertenecientes al grupo I. Estas diferencias incluyen parasitemia, capacidad de infección *in vitro* y virulencia. El presente estudio compara el perfil de expresión de citocinas y la reacción inflamatoria *in situ* causados por la infección con dos cepas diferentes, identificadas como Querétaro y Ninoa. Se analizaron el corazón, músculo esquelético y colon de ratones BALB/c infectados y sin infectar a diferentes tiempos post-infección (1, 15, 21 y 90 días pi). Usando un suero anti-*T. cruzi*, se detectaron por inmunohistoquímica nidos de amastigotes solamente a los 15 y 21 días pi. El número de nidos fue significativamente mayor en los animales infectados con la cepa Querétaro que con la cepa Ninoa. La inflamación del tejido fue evaluada por tinción con hematoxilina/eosina y se cuantificó numéricamente de acuerdo al grado de inflamación. El grado de inflamación fue mayor con la cepa Querétaro en los tejidos analizados. Además, sólo esta cepa indujo calcificación en el músculo esquelético detectada mediante la tinción de von Kossa, indicando un posible evento necrótico. Usando el anticuerpo F4/80, se analizó la presencia de macrófagos en los infiltrados. El número de nidos infiltrados en corazón, músculo esquelético y colon fue mayor en ratones infectados con la cepa Querétaro que con la cepa Ninoa. Sin embargo, la proporción de macrófagos presentes en estos infiltrados sólo varió entre 20 y 34%, dependiendo del tejido y de la cepa infectante. Interesantemente, no se detectaron macrófagos en los nidos infiltrados en corazón. La cepa Querétaro también indujo una mayor expresión del mRNA de las citocinas proinflamatorias IL-12, IFN- γ y TNF- α y de IL-10 en corazón, aunque la expresión del mensajero para IL-4 fue mayor con la cepa Ninoa. En músculo esquelético sólo la expresión del mRNA de IL-10, IFN- γ y TNF- α fue mayor con la cepa Querétaro. Además, los altos niveles de TNF- α en este tejido podrían estar relacionados con el proceso de calcificación. En conclusión, en comparación con la cepa Ninoa, la cepa Querétaro induce una reacción inflamatoria diferencial, con un severo daño en el músculo esquelético, en la que podría estar participando una mayor expresión de citocinas proinflamatorias.

I. INTRODUCCIÓN

I.1. GENERALIDADES.

La enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis Americana, descubierta por Carlos Chagas en 1909, está presente en toda Latinoamérica. Su distribución geográfica abarca desde el sur de los Estados Unidos hasta el sur de Argentina (Figura 1). Sin embargo, las tasas de prevalencia, las características del parásito, la patología clínica y los vectores difieren ampliamente. Esto provoca que las manifestaciones de la enfermedad y las características epidemiológicas varíen de un área endémica a otra.



Figura 1. Distribución geográfica de la enfermedad de Chagas. En negro se muestran los países endémicos de la Tripanosomiasis Americana. Tomado de www.who.int/int/ctd/chagas/geo.htm

Según la Organización Mundial de la Salud, existen de 11 a 18 millones de personas infectadas en Latinoamérica, se producen alrededor de 13 000 muertes por año a consecuencia de la enfermedad y cerca de una tercera parte de la población total en dicha región se encuentra en riesgo de contraerla (OMS, 2002). Por estos motivos, esta afección es

considerada como un problema importante de salud pública en Latinoamérica (Velasco, 1991).

La presencia de esta enfermedad en comunidades rurales de México, algunas de las cuales se están convirtiendo rápidamente en zonas urbanas, podría tener importantes consecuencias epidemiológicas (Rangel-Flores *et al.*, 2001). Una de las principales manifestaciones de la enfermedad, la cardiomiopatía chagásica crónica, parece afectar a un gran número de pacientes con enfermedades del corazón en nuestro país, pero muchos casos pueden no ser reportados debido a la naturaleza inespecífica de los síntomas clínicos (Vera-Cruz *et al.*, 2003; Sosa-Jurado *et al.*, 2003). Mediante un estudio de vigilancia en la red de bancos de sangre del país realizado en 1998, se detectó una seroprevalencia que variaba entre 0.2 y 2.8% con un promedio general de 1.6% (Guzmán-Bracho *et al.*, 1998). Otro estudio más reciente evaluó a donadores de sangre voluntarios en un hospital de cardiología de la Ciudad de México durante un periodo de cinco años, sugiriendo que la seroprevalencia para *T. cruzi* en la capital del país podía establecerse entre 0.37 y 1% (Hernández-Becerril *et al.*, 2005).

La enfermedad es causada por el parásito protozoario conocido como *Trypanosoma cruzi*, el cual se transmite principalmente por insectos hemípteros de la familia Reduviidae pertenecientes a los géneros *Triatoma* y *Rhodnius*, entre otros (Martínez *et al.*, 2005), mejor conocidos en nuestro país como chinches besuconas u hociconas.

T. cruzi es un protozoario altamente pleomórfico con un ciclo de vida complejo. Forma parte de la familia Trypanosomatidae, junto con los parásitos *Trypanosoma brucei* (agente etiológico de la enfermedad del sueño) y los pertenecientes al género *Leishmania* (causantes de diversas formas clínicas de leishmaniosis). Por tanto, debido a su importancia médica y biológica, este parásito ha sido objeto de diversos estudios.

I.2. LA ENFERMEDAD DE CHAGAS.

La enfermedad de Chagas en humanos presenta un cuadro clínico muy variable, que consta de una fase aguda y una fase crónica.

I.2.1. Fase aguda.

La fase aguda de la enfermedad comienza cuando el parásito *T. cruzi* entra en el cuerpo. La reacción cutánea que ocurre en la puerta de entrada de los parásitos se llama chagoma, la cual puede provocar una reacción del tejido subcutáneo con edema local e induración (Figura 2A). El chagoma es caracterizado histológicamente por un infiltrado mononuclear intenso en el sitio de la infección. Este primer signo de infección sugiere que *T. cruzi* puede estimular a las células cutáneas del hospedero para producir mediadores que desencadenarán una respuesta inflamatoria local (Teixeira *et al.*, 2002). Cuando la puerta de entrada es el ojo, (Figura 2B), se desarrolla una reacción indolora de la conjuntiva, con edema unilateral de ambos párpados y linfadenitis de los ganglios preauriculares. Esta es una señal característica de la infección aguda que se conoce como signo de Romaña (OMS, 2002; Prata 2001).

La reacción local en el sitio de entrada es seguida de malestar general con síntomas y signos tales como fiebre, polilinfadenopatía, hepatomegalia y esplenomegalia, que pueden ser sucedidos por vómito, diarrea y anorexia. Esto resulta ser consecuencia de una parasitemia abundante, aunque con frecuencia los síntomas son leves e inespecíficos haciendo difícil el reconocimiento del contagio. Pueden presentarse anormalidades cardíacas (miocarditis aguda) que desaparecen 4-8 semanas después sin ninguna secuela aparente. Sin embargo, en pacientes menores de 3 años pueden tener un curso fatal en menos de 3% de los casos agudos. También pueden presentarse manifestaciones neurológicas como meningoencefalitis con fiebre, convulsiones y/o pérdida de la conciencia, la cual se asocia hasta con 50% de mortalidad, principalmente en niños (OMS, 2002).

La enfermedad de Chagas aguda se reconoce solamente en 1-2% de todos los individuos que adquieren la infección y tiene una duración de 6 a 8 semanas (OMS, 2002).

I.2.2. Fase crónica.

La fase crónica de la enfermedad de Chagas comienza cuando la parasitemia disminuye a niveles generalmente indetectables y tanto los síntomas generales como las manifestaciones clínicas de una miocarditis aguda o meningoencefalitis desaparecen. La mayoría de los pacientes infectados se ven saludables, y no se puede encontrar evidencia de

daño en los órganos por medio de los métodos de diagnóstico estándares actuales. Se pueden detectar anticuerpos convencionales de tipo IgG contra el parásito, junto con una parasitemia escasa y un curso clínico impredecible (Prata, 2001). Estudios parasitológicos, como el xenodiagnóstico o el hemocultivo pueden demostrar parásitos circulantes en al menos la mitad de los individuos infectados varios años después de que tuvo origen la infección. Esta forma de la fase crónica de la enfermedad de Chagas se denomina la forma indeterminada o fase crónica asintomática, y en la mayoría de los pacientes (50-70%) persiste indefinidamente (OMS, 2002).

Sin embargo, varios años o incluso décadas después de la infección inicial, 20-30% de los individuos infectados desarrollarán lesiones de varios órganos, principalmente el corazón y el sistema digestivo (Prata, 2001). Esta condición es llamada la forma crónica sintomática cardíaca o digestiva de la enfermedad de Chagas.

De las evoluciones clínicas que puede presentar la enfermedad, la cardiomiopatía chagásica crónica (CCC) es la consecuencia clínica más importante. Las manifestaciones varían desde síntomas leves hasta falla cardíaca y, frecuentemente, una muerte repentina. Sus principales manifestaciones son: falla congestiva del corazón, infarto, arritmias cardíacas y tromboembolismo. Aunque menos común, también pueden observarse casos de cardiomegalia, la cual es debida a una combinación de hipertrofia, dilatación y alteración de la arquitectura del músculo cardíaco; el peso del corazón usualmente aumenta. Otro hallazgo frecuente y patognomónico de la CCC es el aneurisma apical cardíaco (Figura 2C) (OMS, 2002).

En la forma digestiva de la enfermedad crónica, la destrucción de la innervación entérica autonómica causada por la infección con *T. cruzi* conlleva a la disfunción del sistema digestivo. Se pueden observar alteraciones anatómicas y funcionales a diferentes niveles hasta llegar a manifestarse en las formas más avanzadas como crecimiento de las estructuras tubulares del sistema gastrointestinal, particularmente megaesófago y megacolon (Figura 2D) (Da Silveira *et al.*, 2007). La denervación intrínseca del esófago causada por la infección con *T. cruzi* resulta en pérdida de la peristalsis esofágica y acalasia del esfínter más bajo del esófago. Es raro encontrar el megacolon como una manifestación aislada; usualmente está asociado con megaesófago y/o cardiomiopatía. Los principales signos y síntomas para sugerir

un diagnóstico de megacolon están asociados con la retención de heces y de gas; también puede haber meteorismo, distensión abdominal molesta y, a veces, dolor intestinal (OMS, 2002).

La fase crónica dura por el resto de la vida del individuo infectado.

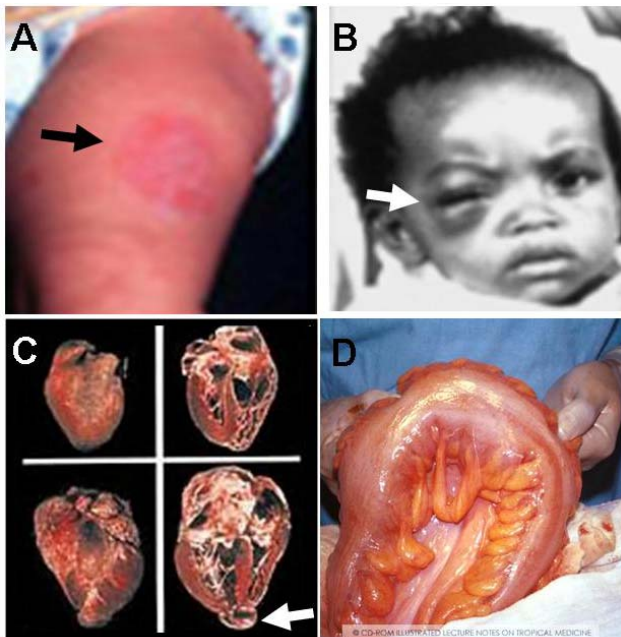


Figura 2. Fase aguda y crónica de la enfermedad de Chagas. Signos característicos de la fase aguda. A) signo de Romaña (flecha). Tomado de Prata *et al.*, 2001. B) chagoma (flecha). Tomado de www.iqb.es/icd10/k23.1.htm. Manifestaciones clínicas de la fase crónica. C) se observa un corazón normal (recuadros superiores) y un corazón chagásico (recuadros inferiores); la flecha indica un aneurisma apical. Tomado de www.ovpr.uga.edu/researchnews/winter2000/immunity.html. D) megacolon secundario a infección crónica con *T. cruzi*. Tomado de www.itg.be/itg/DistanceLearning/LectureNotesVandenEndenE/04_Chagas_diseasep8.htm.

I.2.3. Diagnóstico y tratamiento.

Además del diagnóstico por la sintomatología, es común realizar el diagnóstico serológico, ya que durante las fases aguda y crónica se producen anticuerpos de tipo IgM e IgG, respectivamente. Entre las técnicas usadas se encuentran la hemaglutinación indirecta, inmunofluorescencia indirecta, y ELISA. También se utilizan métodos parasitológicos indirectos clásicos como son el xenodiagnóstico y el hemocultivo (Barrett *et al.*, 2003), y más recientemente, las técnicas de PCR para la amplificación de DNA del parásito (Pacheco, 2000).

La enfermedad de Chagas no se cura espontáneamente por lo que el paciente debe ser tratado oralmente con dos fármacos nitroheterocíclicos: el nifurtimox y el benznidazol. Éstos poseen actividad tripanocida contra los parásitos en circulación, por lo que su uso suele limitarse a la fase aguda de la infección. Sin embargo, ambos fármacos inducen serios efectos secundarios que suelen requerir la suspensión del tratamiento, como náuseas, pérdida del

apetito, distensión abdominal y cefalea, y en raras ocasiones, dermatitis, edema, fiebre, linfadenopatías, artralgias y mialgias. Por lo anterior, es necesaria la búsqueda de nuevos fármacos o estrategias de tratamiento (Barrett *et al.*, 2003; Prata, 2001).

I.3. BIOLOGÍA Y CICLO DE VIDA DE *T. cruzi*

I.3.1. Morfología.

T. cruzi se caracteriza por la presencia de diversas formas de desarrollo en su ciclo de vida, las cuales pueden ser observadas en los hospederos vertebrados e invertebrados. De acuerdo con las características del flagelo y la posición relativa del cinetoplasto (material genético mitocondrial, kDNA) con respecto al núcleo, se pueden diferenciar 3 formas morfológicas principales: tripomastigotes, amastigotes y epimastigotes (De Souza, 2002; Navarro *et al.*, 2003).

Los tripomastigotes miden aproximadamente 25 μm de largo por 2 μm de ancho. El flagelo emerge del extremo apical posterior y el cinetoplasto está ubicado en la parte posterior del núcleo. Pueden ser observados en los tejidos o en la circulación sanguínea (denominándose tripomastigotes sanguíneos) dentro de los hospederos vertebrados, o en el intestino posterior, las heces y la orina de los hospederos invertebrados (tripomastigotes metacíclicos). Esta forma no es capaz de dividirse, pero constituye la forma flagelada infectiva del parásito (Figura 3A).

Los amastigotes, también conocidos como esferomastigotes, micromastigotes, o forma aflagelada, son las formas replicativas intracelulares de *T. cruzi* en los mamíferos. Tienen una forma redondeada, carecen de flagelo y membrana ondulante, y se multiplican por fisión binaria en el citoplasma de las células hospederas (Figura 3B).

Los epimastigotes son organismos de forma alargada que miden 20-40 μm de largo. El flagelo emerge de la región lateral anterior. Su cinetoplasto se localiza en la parte anterior del núcleo. Se encuentran en el intestino medio de los hospederos invertebrados y constituyen la forma flagelada replicativa en los insectos vectores (Figura 3C).

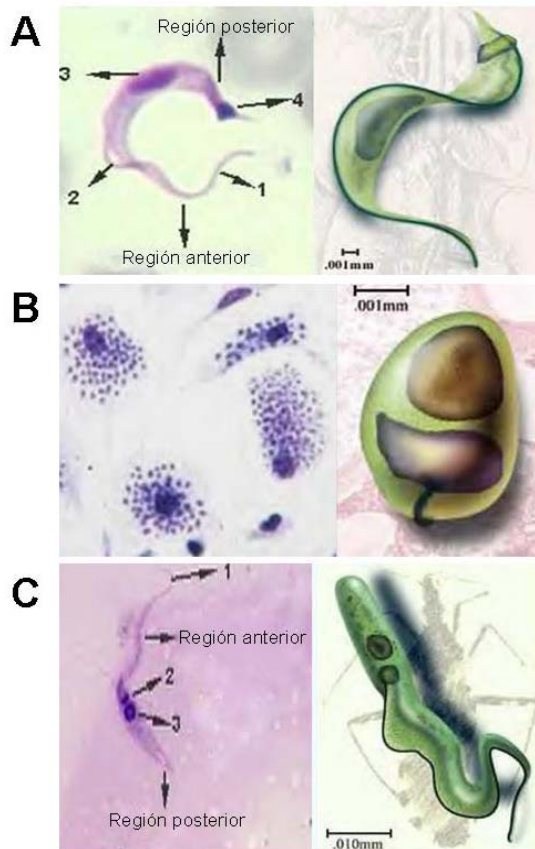


Figura 3. Estadios de *T. cruzi*. En cada caso se muestra a la izquierda una microfotografía de la forma de desarrollo del parásito, y a la derecha, una representación esquemática de la misma. A) Tripomastigote, forma infectiva del parásito. 1: flagelo; 2: membrana ondulante; 3: núcleo; 4: cinetoplasto; se indican las regiones anterior y posterior. B) Amastigote, forma replicativa e infectiva. La imagen de la izquierda muestra a varios macrófagos con amastigotes intracelulares. C) Epimastigote, forma replicativa en el insecto. 1: flagelo; 2: cinetoplasto; 3: núcleo; se indican las regiones anterior y posterior. Microfotografías tomadas de www.biof.ufrj.br/laminario.html; www.uga.edu/cellbio/tarleton.html. Esquemas tomados de www.uta.edu/chagas/html/biolTru.html

I.3.2. Ciclo de vida.

Cuando el insecto reduído se alimenta de la sangre de un mamífero infectado con *T. cruzi*, ingiere una población pleomórfica de tripomastigotes sanguíneos (y hasta 10% de amastigotes). Los parásitos pasan al intestino medio del insecto, donde se transforman en epimastigotes y se dividen repetidamente mediante un proceso de fisión binaria. Los epimastigotes se adhieren hidrofóticamente a la cutícula de la pared de la parte posterior del intestino para diferenciarse en formas metacíclicas. Este proceso es conocido como metaciclogénesis. Una vez formados, los tripomastigotes metacíclicos se desprenden de la cutícula y son excretados (Tyler y Engman, 2001; De Souza, 2002). Durante la ingesta de sangre, el insecto defeca sobre la piel, y las formas metacíclicas ingresan al hospedero vertebrado mediante una acción mecánica, por ejemplo, cuando éste se rasca la piel o se talla el ojo. Los tripomastigotes metacíclicos son capaces de parasitar una gran cantidad de células de mamífero nucleadas, incluyendo macrófagos residentes primarios (Silva *et al.*, 1995); así,

penetran a las células del hospedero vertebrado y se transforman en amastigotes que se multiplican intracelularmente, también por fisión binaria. Los amastigotes se transforman en tripomastigotes sanguíneos que son liberados a la circulación junto con algunos amastigotes durante la ruptura celular. Los amastigotes liberados infectan nuevas células y los tripomastigotes vuelven a entrar en el torrente sanguíneo, donde pueden ser ingeridos por otro insecto, infectándose y completando el ciclo (Macedo *et al.*, 2002) (Figura 4).

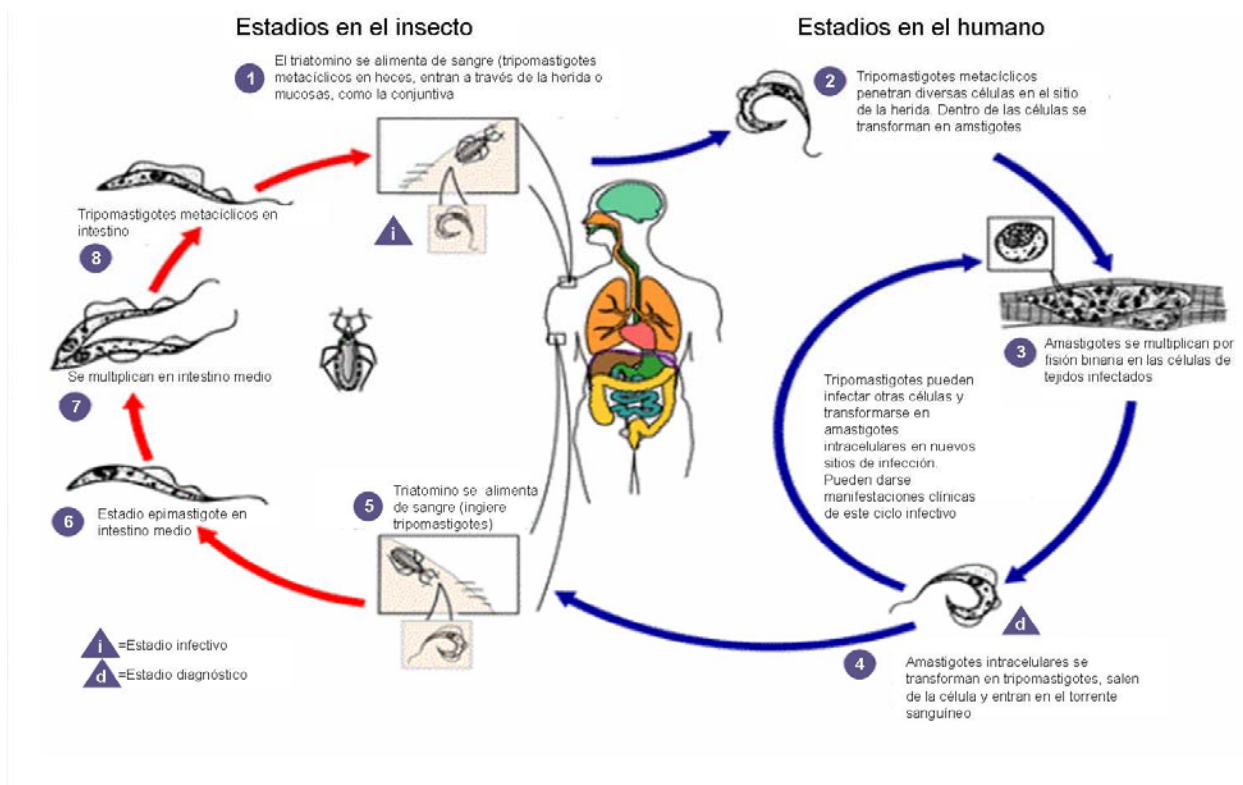


Figura 4. Ciclo de vida de *T. cruzi*. Cuando el triatomino se alimenta, deposita tripomastigotes metacíclicos junto con sus heces (1). Los tripomastigotes invaden diversas células, dentro de las cuales se transforman en amastigotes (2). Los amastigotes se multiplican por fisión binaria dentro de las células de tejidos infectados (3), y se transforman en tripomastigotes sanguíneos, los cuales al ser liberados de las células pueden infectar otras células o permanecer en el torrente sanguíneo (4). Cuando un triatomino se alimenta de sangre, ingiere los tripomastigotes sanguíneos (5); éstos se transforman en epimastigotes en el intestino medio del insecto (6), donde se multiplican (7). Finalmente, se transforman en tripomastigotes metacíclicos en la parte posterior del intestino (8), cerrando el ciclo. Modificado de <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx>

En general, dependiendo de la cepa del parásito, *T. cruzi* necesita menos de 20 min para entrar en una célula. Después de la invasión, le toma 1-2 horas para alterar la membrana vacuolar, 2-3 horas para transformarse en amastigote y entrar en las fases G1/G2 de su ciclo

celular, y 24-44 h para sintetizar DNA. Dentro de la célula prolifera por medio de división binaria durante 2-9 ciclos y llena por completo el citoplasma de la célula en 4-5 días, provocando la ruptura celular y la liberación de nuevos tripomastigotes (de Araújo-Jorge, 1999).

I.4. TRANSMISIÓN DEL PARÁSITO

La mayoría de los casos de la enfermedad de Chagas son causados por la transmisión del parásito por medio de insectos infectados pertenecientes a la subfamilia Triatominae en la familia Reduviidae (orden Hemiptera) (Barrett *et al.*, 2003). Cuando los triatominos pican la piel para alimentarse de la sangre, simultáneamente depositan heces u orina que contienen tripomastigotes de *T. cruzi*. La comezón provocada por la mordida conduce al rascado, permitiendo que los parásitos entren en la circulación a través de heridas imperceptibles así creadas. Alternativamente, durante el rascado, los parásitos pueden ser transferidos a la conjuntiva, por donde entran en el cuerpo aún en la ausencia de lesiones en la piel. Otras formas en que se puede adquirir la enfermedad y causar una fase aguda inicial incluyen infección congénita, infección adquirida por medio de transfusión sanguínea o trasplante de órganos de un donador infectado, por transmisión oral, y accidentes de laboratorio (Prata, 2001; OMS, 2002).

La distribución geográfica de los triatominos y de los hospederos vertebrados, asociada con las preferencias de los insectos por fuentes específicas de sangre, define dos ciclos de transmisión de *T. cruzi*: un ciclo selvático que involucra diferentes especies de insectos reduvidos y animales salvajes, y un ciclo doméstico/peridoméstico en el cual los animales domésticos y los seres humanos actúan como reservorios (Macedo *et al.*, 2004). La conexión entre los dos ciclos de transmisión está dada por ratas, ratones, murciélagos, zarigüeyas y hemípteros infectados que migran hacia los ambientes o poblaciones humanas, forzados por la destrucción de los bosques (Macedo *et al.*, 2002). La migración humana de regiones endémicas puede contribuir también al transportar vectores triatominos favoreciendo el establecimiento del ciclo doméstico en otras áreas (Coura *et al.*, 2002).

La mayoría de las especies pertenecientes a la subfamilia Triatominae (más de 120 especies), son vectores potenciales del agente de la enfermedad de Chagas. Sin embargo, sólo aquellas con un mayor grado de adaptación al ambiente doméstico han sido reconocidas como vectores efectivos de la tripanosomiasis humana (García *et al.*, 2001). Entre estas especies, cinco son de especial importancia epidemiológica en Sudamérica: *Triatoma infestans*, *Triatoma brasiliensis*, *Triatoma dimidiata*, *Pastrongylus megistus* y *Rhodnius prolixus* (Buscaglia y Di Noia, 2003).

En México existen al menos 31 especies de triatominos (Guzmán-Bracho, 2001). La mayoría de estas especies resultan ser de importancia epidemiológica ya que pueden encontrarse infectadas en forma natural por *T. cruzi*, con índices de infección que oscilan entre 9.5 y 91%, dependiendo del estado de la República Mexicana en que fueron colectadas. Entre ellas se encuentran: *Triatoma rubida* y *T. recurva* (en Sonora), *T. dimidiata* (en Hidalgo y Veracruz), *T. longipennis* (en Jalisco y Nayarit), *T. pallidipennis* (en Morelos), *T. bassolsae* (en Puebla), *T. lecticularia* (en Nuevo León), *T. mazzeottii* (en Guerrero) (Martínez *et al.*, 2005) (Figura 5).

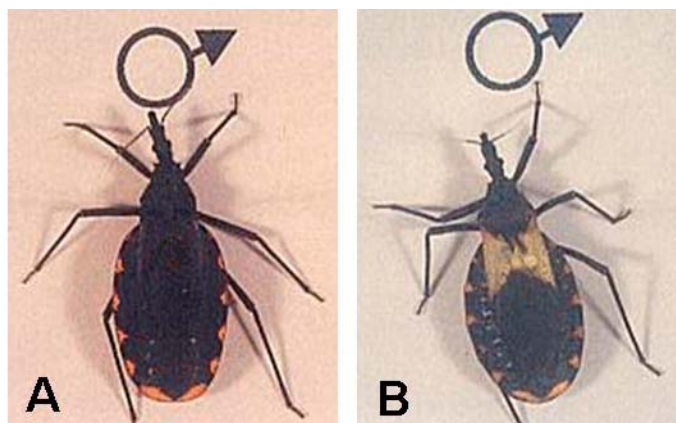


Figura 5. Vectores de la enfermedad de Chagas en México. Se muestran dos especímenes machos de dos especies diferentes de insectos triatominos. A) *Triatoma bassolsae*. B) *Triatoma pallidipennis* (Fotografías tomadas por F. Martínez).

I.5. VARIABILIDAD GENÉTICA DE *T. cruzi*

Los humanos pueden ser considerados como un hospedero accidental reciente en la historia evolutiva de *T. cruzi*. Es probable que su encuentro se haya dado hace apenas 12 000-40 000 años, cuando el hombre llegó al continente Americano (Barrett *et al.*, 2003). Por lo tanto, resulta natural suponer que no todas las especies de este protozoario puedan infectar a los humanos y causar la enfermedad de Chagas. Mediante diferentes estudios biológicos, bioquímicos y moleculares se ha demostrado que *T. cruzi* es un taxón muy heterogéneo, lo que ha permitido dividirlo en grupos genéticos que suelen asociarse con alguno de los ciclos de transmisión (selvático o doméstico/peridoméstico), particularmente en los países sudamericanos.

Los primeros métodos experimentales usados para estudiar esta diversidad genética se basaron en la variabilidad isoenzimática del parásito, proponiéndose la existencia de tres grupos isoenzimáticos (zimodemos Z1, Z2 y Z3) de *T. cruzi*. Estudios epidemiológicos demostraron que Z1 y Z3 estaban asociados con el ciclo selvático y Z2 con el ciclo de transmisión doméstico (Miles *et al.*, 1980). Esta complejidad del parásito fue también revelada mediante análisis de longitud de polimorfismos por fragmentos de restricción (RFLP) (Morel *et al.*, 1980) y DNA polimórfico amplificado al azar (RAPD) (Steindel *et al.*, 1993). La dicotomía básica de las especies se demostró en estudios posteriores, utilizando diversas metodologías incluyendo amplificación de miniexones, análisis de microsatélites de DNA y cariotipo molecular (Buscaglia y Di Nonia, 2003), volviéndose la nomenclatura de los grupos principales bastante confusa. Fue en 1999, tratando de unificar los conceptos, cuando los dos linajes principales fueron renombrados como *T. cruzi* I y *T. cruzi* II (Anonymous, 1999). Poco después se identificaron cinco subdivisiones filogenéticas dentro del grupo genético II, proponiéndose la existencia de seis grupos discretos principales de este parásito (I, IIa, IIb, IIc, IId, IIe) (Brisse *et al.*, 2000). Sin embargo, existen cepas que no pueden ser clasificadas inequívocamente en ninguno de los dos linajes principales, y corresponden a cepas híbridas de *T. cruzi*, que presentan características de ambos linajes. Una alternativa para la clasificación de estas cepas es que constituyan un tercer grupo principal del taxón *T. cruzi*, tal vez el grupo *T. cruzi* III (Macedo *et al.*, 2004).

I.5.1. Implicación clínica de la variabilidad genética de *T. cruzi*.

En Brasil, la enfermedad humana está mucho más asociada con las cepas del grupo *T. cruzi* II (encontradas formando parte del ciclo doméstico/peridoméstico), aunque algunas cepas de *T. cruzi* I y *T. cruzi* III podrían estar eventualmente involucradas (Macedo *et al.*, 2004). En la región amazónica, donde se reportan casos aislados de la enfermedad, la baja morbilidad en el área y las bajas parasitemias se correlacionan con el genotipo *T. cruzi* I presente en la región (Coura *et al.*, 2002).

Se han observado variaciones geográficas en la prevalencia y severidad de las formas clínicas crónicas (cardíacas, digestivas, cardiodigestivas o indeterminadas) y la morbilidad de la enfermedad de Chagas, aunque esta heterogeneidad geográfica aún permanece sin explicación (Macedo *et al.*, 2002; Buscaglia y Di Noia, 2003). Se ha sugerido que los diversos genotipos descritos dentro de las especies de *T. cruzi*, podrían ser parcialmente responsables de la diversidad en las evoluciones clínicas (Andrade *et al.*, 1992). Por ejemplo, en Chile la forma digestiva es la más frecuente, mientras que en Argentina sólo corresponde al 3.5% del total. En Brasil, la prevalencia relativa de las formas cardíaca y digestiva es de 20-30% y 8-10%, respectivamente, mientras que la cardiodigestiva raramente se encuentra (Vago *et al.*, 2000). En México, la forma predominante es la cardiopatía chagásica, con 96.5% de prevalencia (Sierra-Johnson *et al.*, 2005; CENAVECE, 2006).

Estudios comparativos entre ambos genotipos sudamericanos sugieren que la variación genómica de *T. cruzi* podría influir en el curso de la enfermedad. La presencia de distintas poblaciones del parásito ha sido correlacionada con la patología observada en diferentes formas clínicas de la enfermedad de Chagas, sugiriendo que poblaciones genéticamente diferentes despliegan un tropismo tisular característico y, por tanto, influyen en el desenlace de la enfermedad (Dutra *et al.*, 2005). Además, debido a que el parasitismo es el resultado de la interacción de dos genomas, es importante considerar los aspectos genéticos del hospedero. En consecuencia, el comportamiento de los parásitos en distintos reservorios podría ser diferente (Macedo *et al.*, 2002). Diversos estudios en donde se prueban distintas cepas de ratón y/o del parásito, así como otros hospederos, confirman lo anterior, al demostrar que el tropismo hacia los tejidos y la severidad de la enfermedad dependen de la cepa infectante (Andrade *et al.*, 1999; Lima *et al.*, 1999; Andersson *et al.*, 2003; Garzon *et al.*,

2005) así como de la cepa del hospedero infectado (Andrade *et al.*, 2002; Andersson *et al.*, 2003; Guiñazú *et al.*, 2004; Marinho *et al.*, 2004; Pérez Brandán *et al.*, 2006).

I.5.2 Cepas de *Trypanosoma cruzi* en México.

Mientras que en los países sudamericanos es posible encontrar ambos grupos genéticos e incluso dividirlos en ciclos de transmisión, en México, se ha encontrado hasta el momento una predominancia de cepas pertenecientes al grupo *T. cruzi* I. Bosseno y colaboradores (2002) analizaron 56 aislados mexicanos con diversos orígenes geográficos mediante RAPD. Los resultados claramente demostraron que 98% de las cepas analizadas pertenecían al grupo *T. cruzi* I. Además, se encontró que el polimorfismo entre estas cepas era reducido, constituyendo un grupo homogéneo. Lo anterior es notable considerando la amplia distribución geográfica y la variedad de hospederos, tanto domésticos como selváticos, de los cuales fueron aisladas.

En un estudio anterior en el que se estudiaron 17 aislados mexicanos provenientes del centro y sur del país, se mostró mediante la construcción de un árbol filogenético (de acuerdo a su caracterización enzimática) que los aislados mexicanos formaban un grupo coherente y separado de las cepas brasileñas y peruanas incluidas como control (López-Olmos *et al.*, 1998). Por tanto, a diferencia de lo reportado en países como Brasil (Coura *et al.*, 2002), las cepas pertenecientes al grupo genético I pueden ser consideradas como los agentes primarios de la enfermedad de Chagas en nuestro país (Bosseno *et al.*, 2002).

Sin embargo, a pesar de la importancia de la genética tanto de las poblaciones de *T. cruzi* como del hospedero vertebrado, no puede descartarse un posible papel de los aspectos ambientales, así como de factores nutricionales e inmunológicos asociados con el hospedero (Macedo *et al.*, 2004). La respuesta inmune montada por éste en contra del parásito puede resultar crucial para su resolución, involucrando la participación de las respuestas innata y adaptativa, incluyendo diferentes efectores celulares y factores solubles como anticuerpos y citocinas.

I.6. ANTECEDENTES

I.6.1. Respuesta inmune en la fase aguda de la enfermedad de Chagas.

El control de este parásito depende de la inmunidad humoral y de la respuesta adquirida mediada por células así como de elementos del sistema inmune innato (Golgher y Gazzinelli, 2004). La inmunidad innata provee la primera línea de defensa al detectar el tipo de agente infeccioso a través de receptores que reconocen patrones incluyendo a los receptores tipo toll (TLRs). Estos receptores reconocen múltiples patrones microbianos y son críticos para desencadenar eventos necesarios para la activación de la inmunidad innata e iniciación de la inmunidad adquirida (Takeda *et al.*, 2003). Moléculas derivadas de *T. cruzi*, como los anclajes de glicosilfosfatidilinositol (GPI) y la proteína Tc52 (una proteína secretada por el parásito), estimulan la producción de citocinas proinflamatorias por parte de los macrófagos, a través de TLR4 (Oliveira *et al.*, 2004) y TLR2 (Ouaissi *et al.*, 2002), respectivamente. Recientemente se describió que el TLR9 se activa por DNA genómico de *T. cruzi* y desempeña un papel importante en el reconocimiento temprano de este parásito. Según este estudio, el TLR9 no sólo contribuye en la activación de los mecanismos inmunes innatos como la producción de interleucina (IL)-12 por parte de células dendríticas y macrófagos, sino que, además, actúa en cooperación con el TLR2 para ejercer una función efectora óptima en la resistencia contra *T. cruzi* (Bafica *et al.*, 2006). Por tanto, durante las fases iniciales de la infección, los macrófagos pueden responder ante los tripomastigotes mediante diferentes TLRs y producir citocinas proinflamatorias como IL-12 y factor de necrosis tumoral (TNF)- α que facilitan la polarización de células T CD4⁺ y CD8⁺ hacia una respuesta de tipo Th1 (Dutra *et al.*, 2005).

I.6.1.1 Papel de las citocinas y quimiocinas en la enfermedad de Chagas.

El ambiente de citocinas tipo Th1 contribuye a la resistencia contra muchos parásitos intracelulares, incluyendo *T. cruzi*. Existen reportes que indican que la producción de las citocinas IL-12 (Aliberti *et al.*, 1996), interferón (IFN)- γ (Gazzinelli *et al.*, 1992) y TNF- α (Silva *et al.*, 1995) durante la fase aguda de la infección está asociada con la resistencia al parásito. Al inicio de la infección, los tripomastigotes de *T. cruzi* inducen la síntesis de IL-12 por parte de los macrófagos. La IL-12 es un potente inductor de la biosíntesis de citocinas,

particularmente de IFN- γ por las células T y NK (Aliberti *et al* 1996). El IFN- γ generado por estas células es, a su vez, capaz de activar a los macrófagos para matar a los amastigotes intracelulares mediante la síntesis de óxido nítrico (NO). Los macrófagos activados por IFN- γ producen TNF- α , el cual contribuye en la amplificación de la producción de NO y la muerte del parásito (Silva *et al.*, 1995) (Figura 6). Además, el IFN- γ induce también la expresión de moléculas de adhesión (dos Santos *et al.*, 2001) y de algunas quimiocinas (Teixeira *et al.*, 2002) que son esenciales para el reclutamiento inicial de leucocitos al sitio de infección. Las quimiocinas producidas después de la infección de las células blanco pueden desempeñar un papel importante durante la respuesta innata protectora temprana contra el parásito. Dentro de las quimiocinas cuyos niveles se han encontrado elevados durante la respuesta temprana a *T. cruzi* están CCL2/MCP-1, CCL3/MIP-1 α y CCL4/MIP-1 β (Talvani *et al.*, 2000; Marino *et al.*, 2004), mientras que CCL5/RANTES, CXCL9/MIG y CXCL10/IP10 son expresadas tanto en la fase aguda como en la crónica (Talvani *et al.*, 2000). Durante un estudio usando un modelo de infección aguda con la cepa Y de *T. cruzi* (genotipo II), se encontró una producción de quimiocinas (CXCL9, CXCL10, CCL3) en corazones infectados que era dependiente del tiempo de infección (Aliberti *et al.*, 2001). No sólo las quimiocinas en sí, sino también sus receptores se encuentran involucrados en el control de la migración de las células T. Por ejemplo, ratones deficientes de CCR5 (el receptor para CCL3, CCL4 y CCL5) infectados con *T. cruzi* experimentaron una dramática inhibición en la migración de células T al corazón y fueron más susceptibles a la infección (Machado *et al.*, 2005). Sin embargo, aunque la expresión de CCR5 es necesaria para dirigir la migración de macrófagos y células T al corazón durante la fase aguda temprana, no parece ser esencial para el mantenimiento de la inflamación en este tejido durante la infección crónica (Hardison *et al.*, 2006). Otra función que se ha atribuido recientemente a una de las quimiocinas (CCL2) es la de actuar como quimioattractor de las formas tripomastigote de *T. cruzi* e inducir su morfogénesis, por lo que podría estar involucrada en el tropismo hacia ciertos tejidos (Yamauchi *et al.*, 2006).

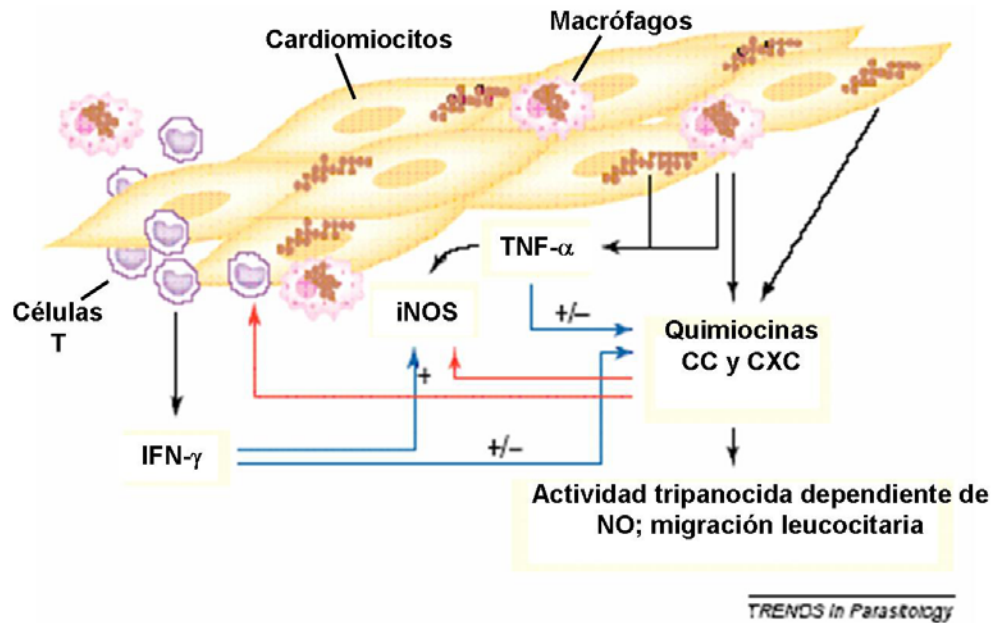


Figura 6. Respuesta inmune en la fase aguda de la enfermedad de Chagas. La infección de cardiomiocitos y macrófagos, o la activación de estos últimos, induce la síntesis de quimiocinas de tipo CC y CXC. Estas pueden estimular el reclutamiento de leucocitos y la producción temprana de NO por medio de la iNOS. El IFN- γ liberado por las células T y NK, junto con el TNF- α derivado de macrófagos promueven (+) la muerte del parásito dependiente de NO, y modula (+/-) la producción de quimiocinas tisulares. Tomado de Teixeira *et al.*, 2002.

Sin embargo, una respuesta tipo Th1 exacerbada no sólo contribuye con la eliminación del parásito, sino también con el daño al propio hospedero. El IFN- γ , a pesar de ser una citocina clave en la inducción de quimiocinas y citocinas necesarias para el reclutamiento inicial de leucocitos y la subsiguiente eliminación del parásito, ha sido asociado con el establecimiento de miocarditis durante la infección con *T. cruzi*. Estudios en ratones deficientes de IFN- γ han mostrado que el proceso inflamatorio cardíaco se ve atenuado a pesar de que los niveles de parásitos se ven aumentados con respecto a ratones control infectados (Talvani *et al.*, 2000). El TNF- α también muestra una acción dual, es decir, de protección y de daño tisular (Silva *et al.*, 1995; Lima *et al.*, 2001), ya que participa en la destrucción de macrófagos parasitados y parásitos intracelulares, tal vez como parte de la respuesta inmune innata activada para controlar la multiplicación del parásito, contribuyendo a la destrucción del tejido (Lima *et al.*, 2001).

En realidad, en los estudios realizados no se ha visto una clara polarización hacia una respuesta tipo Th1 o Th2 al estudiar a ratones susceptibles o resistentes a la infección con *T. cruzi*. Las citocinas consideradas como Th2, incluyendo IL-4 e IL-10 (propriadamente una citocina reguladora), así como el TGF- β (una citocina inmunosupresora), actúan como potentes inhibidores de las funciones antimicrobianas de los macrófagos mediadas por el IFN- γ (Hamano *et al.*, 2003). Por tanto, se ha asociado a IL-4 e IL-10 con aumento en la susceptibilidad ante la infección con *T. cruzi*. En ratones en los que la IL-4 fue depletada, se observó un aumento en la producción de IFN- γ y NO y una disminución en la parasitemia y mortalidad con respecto a los ratones control (Hiyama *et al.*, 2001). Asimismo, Silva y colaboradores (1992) mostraron que IL-10 ejercía un efecto regulador negativo al inhibir la secreción de IFN- γ durante la infección con *T. cruzi*. Sin embargo, estudios posteriores reportaron una muerte temprana durante la infección con *T. cruzi* en ratones deficientes de IL-10 (Hunter *et al.*, 1997). Por su parte, Talvani y colaboradores (2000), mediante el análisis de la expresión de mRNAs de algunas citocinas en ratones infectados con cepas sudamericanas, demostraron el papel regulador de IL-4 e IL-10 en los procesos inflamatorios involucrados en el daño tisular que ocurren durante la infección por el parásito, y su posible contribución para aumentar la susceptibilidad a *T. cruzi*. Aun así, se ha sugerido que su función sea importante para el control de la fuerte respuesta mediada por células y evitar así el desarrollo de una respuesta inmune patológica (Talvani *et al.*, 2000).

I.6.1.2. Respuesta celular en la enfermedad de Chagas.

Además de la activación sistémica de la respuesta inmune, la infección con *T. cruzi* conduce a una reacción inflamatoria local en algunos órganos, principalmente en el tejido cardíaco. Esta reacción inflamatoria es responsable del control local de la replicación de los parásitos, pero también es la causante del daño tisular local, agrandamiento de los cardiomiocitos y posterior desarrollo de cardiomiopatía. Como resultado de los altos niveles de expresión de quimiocinas y moléculas de adhesión, se observa un infiltrado inflamatorio intenso en los hospederos vertebrados infectados con parásitos de *T. cruzi* (Golgher y Gazzinelli, 2004).

La resistencia del hospedero durante una infección con *T. cruzi* involucra los esfuerzos combinados de diversas poblaciones celulares, incluyendo células NK, células T CD4⁺ y células T CD8⁺. (Aliberti *et al.*, 1996). Las células NK desempeñan un papel importante en la resistencia en la infección aguda, principalmente por su capacidad de producir IFN- γ en etapas muy tempranas de la misma (Antúnez y Cardoni, 2000).

El tejido inflamado está expuesto a altas cantidades de antígenos del parásito, ya sean secretados por los parásitos extracelulares o liberados por la muerte de los mismos. Una vez capturados por las células dendríticas (DC) inmaduras, estos antígenos son transportados a los nódulos linfáticos próximos. Las DC maduras presentan los antígenos peptídicos unidos a MHC a células naive T CD4⁺ y CD8⁺. Dependiendo del fondo genético del individuo, de la carga parasitaria y del balance de citocinas, las características funcionales de las células T CD4⁺ primadas por las DC pueden ser rápidamente polarizadas bajo la influencia de citocinas estimuladoras de tipo 1 o 2 (IL-12 e IL-4, respectivamente). Dirigidas por quimiocinas inflamatorias, estas células CD4⁺ Th1 y T CD8⁺ se adhieren a las adhesinas vasculares expresadas por las células endoteliales activadas y son reclutadas a los sitios de inflamación. Tras la estimulación con el antígeno, estas células T efectoras secretan IFN- γ y TNF- α y/o directamente matan por apoptosis a las células blanco infectadas que expresan MHC clase I (Scharfstein y Morrot, 1999).

Se ha reconocido el requerimiento de células T CD4⁺ como componentes críticos de una respuesta inmunoprotectora contra *T. cruzi*. Se ha visto que ratones deficientes de células T CD4⁺ son altamente susceptibles a la infección con *T. cruzi*, desarrollan una alta carga parasitaria, un proceso inflamatorio insignificante y mueren temprano en la fase aguda de la infección (Tarleton *et al.*, 1994).

También se ha demostrado que los linfocitos T CD8⁺ desempeñan un papel crucial en el control de la infección con *T. cruzi*, ya que suelen dominar los focos inflamatorios en tejidos parasitados. Ratones depletados de células T CD8⁺ exhiben una replicación incontrolada de parásitos seguido de la muerte del animal. Los linfocitos CD8⁺ protegen al hospedero contra *T. cruzi* probablemente a través de su actividad citolítica y su producción de IFN- γ y TNF- α (van Overtvelt *et al.*, 2002).

La resistencia del hospedero a la infección con *T. cruzi* induce también a las células del linaje monocito/macrófago a producir altos niveles de citocinas proinflamatorias. Los macrófagos desempeñan dos papeles muy distintos en la infección con *T. cruzi*: como célula hospedera para el parásito y como célula efectora en la respuesta inmune anti-parásito. El desenlace de la interacción de *T. cruzi* con los macrófagos depende del estado de activación del macrófago. Los macrófagos pueden ser activados artificialmente por endotoxinas, también conocidas como lipopolisacáridos (LPS), un componente encontrado en la pared celular de bacterias gram negativas, o por citocinas que son producidas durante una respuesta inmune. Como ya se ha mencionado, el IFN- γ ha sido bien caracterizado como un potente factor activador de macrófagos (Golden y Tarleton, 1991).

La interacción de los macrófagos con *T. cruzi*, los productos intracelulares o los exoantígenos pueden ser relevantes en el control o la persistencia de la infección (Stempin *et al.*, 2004). La respuesta de los macrófagos a la infección con *T. cruzi* se encuentra bajo el control de una compleja red de moléculas incluyendo citocinas, quimiocinas y proteínas de matriz extracelular (Savino *et al.*, 2007). Se ha demostrado su influjo en el corazón, un órgano blanco de la enfermedad, durante la fase aguda de la infección. Estos macrófagos infiltrantes son el resultado de la producción, maduración y activación de monocitos sanguíneos periféricos (PBMs). Se ha demostrado un dramático incremento de monocitos en la sangre periférica durante la infección *in vivo* con *T. cruzi*; los procesos de movilización de PBMs ocurren en paralelo a la carga parasitaria y están asociados con el mecanismo de resolución de la parasitemia y el parasitismo cardíaco. Por tanto, la notable producción de PBMs indica que los monocitos/macrófagos juegan un papel importante en el mecanismo de curación de la fase aguda de la enfermedad de Chagas (Fabrino *et al.*, 2004).

Sin embargo, no sólo las células de la respuesta inmune participan en la secreción de citocinas y quimiocinas para controlar la infección. Se ha demostrado que los cardiomiocitos están integrados en el fenómeno inflamatorio, secretando citocinas, quimiocinas y NO, que pueden atraer a los leucocitos al sitio de inflamación y controlar la replicación del parásito intracelular (Machado *et al.*, 2000).

I.6.1.3. Anticuerpos

Junto con la síntesis de citocinas y quimiocinas, se da también la activación policlonal de células B y T. Las células B del bazo y nódulos linfáticos son estimuladas por las células T. Conforme progresa la enfermedad, el número de células secretoras de inmunoglobulinas (Ig) aumenta y es posible medir la hipergamaglobulinemia en el suero de animales infectados (Golgher y Gazzinelli, 2004). La activación policlonal de células B inducida por microbios es un evento común en diversas infecciones, y se cree que desempeña un papel crucial tanto en aumentar la producción de anticuerpos específicos como en el mantenimiento de células B de memoria (Montes *et al.*, 2006).

Debido a que la presencia de anticuerpos específicos contra el parásito siempre se ha asociado con la infección, se han llevado a cabo diversos estudios para determinar el papel de estas moléculas en la dinámica de la enfermedad. Una clase importante de anticuerpos humanos que reacciona con epítopes de galactosa fue encontrada en el suero de pacientes chagásicos crónicos. Se demostró que estos anticuerpos podrían mediar la lisis de tripomastigotes de *T. cruzi*, de ahí su nombre de “anticuerpos líticos”, sugiriendo un papel protector para estas moléculas (Dutra *et al.*, 2005).

También se ha demostrado que productos purificados de *T. cruzi* son potentes inductores de la activación policlonal de células B en una manera independiente de células T. Uno de estos inductores es la glutamato deshidrogenasa del parásito, la cual estimula la proliferación policlonal y la diferenciación de células naive B sin depender de células T, pero que necesita un requerimiento absoluto de células CD11b⁺. En éstas promueve la secreción de IL-6, IL-10 y factor activador de células B, que contribuyen en una forma diferente pero complementaria en dirigir la proliferación y diferenciación terminal de células B (Montes *et al.*, 2006).

Ratones deficientes en células B mostraron un retardo en el aumento en la parasitemia aguda, sugiriendo que los anticuerpos pueden aumentar la virulencia del parásito en estados tempranos de la infección. Sin embargo, también se ha observado un mayor índice de mortalidad en estadios tardíos de la infección en este tipo de ratones, indicando que la producción de anticuerpos, aunque secundaria en importancia a la inmunidad celular, es importante para la resistencia adquirida (Scharfstein y Morrot, 1999).

I.6.2. Respuesta inmune en la fase crónica de la enfermedad de Chagas.

La respuesta inmune del hospedero cambia conforme la infección progresa de la fase aguda a la crónica, y probablemente está relacionada con cambios en la producción de citocinas (Morato *et al.*, 1998). Poco después del control de la parasitemia y el parasitismo tisular, la miocarditis así como la activación de linfocitos policlonales se ven atenuados durante la etapa crónica de la infección, aunque los animales infectados nunca alcanzan los niveles umbrales de los ratones control sin infectar (Golgher y Gazzinelli, 2004).

En la fase crónica, algunas citocinas y células efectoras siguen siendo importantes para el establecimiento o no de una enfermedad severa. Por ejemplo, se ha observado una producción aumentada de TNF- α en pacientes chagásicos con cardiomiopatía crónica. Se ha demostrado también que las células PBMs de pacientes chagásicos indeterminados y cardíacos así como las células T y los monocitos de pacientes chagásicos indeterminados producen más IL-10 que las células de individuos con CCC (Dutra *et al.*, 2005).

Por otro lado, células T CD8⁺ aisladas de tejido muscular de ratones con infecciones crónicas de *T. cruzi* expresan marcadores de superficie que reflejan un fenotipo efector/de memoria, pero que tienen una función efectora atenuada (Leavey y Tarleton, 2003). Laucella y colaboradores (2004) encontraron una mayor frecuencia de células T de memoria productoras de IFN- γ específicas para *T. cruzi* en individuos sin síntomas clínicos en comparación con aquellos con presencia de enfermedad. Sin embargo, Cunha-Neto y colaboradores (2005) encontraron un resultado contradictorio en el que genes inducibles por IFN- γ relacionados con hipertrofia, estaban regulados positivamente específicamente en muestras de corazón con CCC. En otros estudios se encontró un nivel significativamente mayor de células T CD8⁺ efectoras/de memoria totales en sujetos seropositivos que presentaban anomalías en el electrocardiograma (ECG) en relación con sujetos seropositivos con ECG normales y sujetos control. En el mismo estudio se observaron niveles disminuidos de estas subpoblaciones celulares en los sujetos seropositivos que además de las anomalías en ECG y rayos X presentaban manifestaciones de la enfermedad como agrandamiento del corazón y evidencia clínica de falla cardíaca. Esto sugiere un agotamiento clonal gradual tal vez como resultado de una estimulación antigénica

continúa por parásitos persistentes que está asociado con un incremento en la severidad de la enfermedad (Albareda *et al.*, 2006).

Durante años ha existido un debate sobre la causa de la enfermedad crónica debida a la infección con *T. cruzi*. La idea de autoinmunidad como causa de la enfermedad de Chagas surgió por una simple razón: los parásitos son difíciles de detectar en los sitios de mayor daño patológico en hospederos infectados crónicamente (Tarleton, 2003). Además, se demostró la existencia de varios antígenos del parásito que mimetizan antígenos del hospedero, así como la presencia de “autoanticuerpos” en pacientes chagásicos y “células T autorreactivas” en conejos infectados con *T. cruzi* (Golgher y Gazzinelli, 2004). Sin embargo, el uso de técnicas más sensibles como la PCR ha permitido generar evidencia de la persistencia del parásito en el corazón y otros sitios de enfermedad durante la etapa crónica. La especificidad del tejido en la enfermedad en diferentes hospederos correlaciona bien con la persistencia del parásito en esos tejidos. Así, se han detectado dos factores que están asociados con el desarrollo de la enfermedad severa: 1) la carga parasitaria y 2) la efectividad de la respuesta inmune del hospedero en controlar los parásitos en tejidos específicos. De tal forma que la calidad de la respuesta inmune a *T. cruzi* se correlaciona con la severidad de la enfermedad. Los tratamientos que aumentan la respuesta inmune disminuyen la severidad de la enfermedad crónica (Tarleton, 2003). Actualmente se acepta que las respuestas antiparásito y de autorreactividad no son mutuamente excluyentes en la enfermedad de Chagas y que la combinación de estos tipos de respuesta inmune podría estar involucrada en el establecimiento de la patología (Dutra *et al.*, 2005).

I.6.3. Modelos experimentales para el estudio de la enfermedad de Chagas.

Los modelos experimentales son ampliamente utilizados para el estudio de la infección por *T. cruzi*. Diversos estudios se han realizado con la finalidad de evaluar la respuesta inmune generada durante la misma, incluyendo el papel que desempeñan algunas citocinas, realizando experimentos tanto *in vivo* como *in vitro*, y utilizando cepas susceptibles y resistentes. Los animales que desarrollan altas parasitemias durante la fase aguda y subsecuentemente desarrollan cardiomiopatía severa son denominados *patopermisivos*.

Contrariamente, los que no desarrollan altos niveles de parásitos circulantes o daño cardiaco severo son denominados *patorresistentes* (Morato *et al.*, 1998).

El ratón ha resultado ser un buen modelo para estudiar la enfermedad de Chagas, ya que desarrolla tanto la fase aguda como la crónica de la infección con la evolución de varios aspectos patológicos en ambas fases como en la enfermedad humana. De hecho, gracias a estudios experimentales en roedores infectados con diversas cepas de *T. cruzi* se ha logrado determinar el papel que desempeñan varias citocinas y tipos celulares en mediar la protección contra la infección aguda (Dutra *et al.*, 2005). Sin embargo, las diferentes cepas de ratones desarrollan diferentes niveles de resistencia y susceptibilidad que pueden mostrar algunas (aunque no todas) las variaciones del curso de la infección que ocurre en el hombre (Calabrese *et al.*, 2000). No obstante, el uso de este tipo de modelos también ha contribuido para desarrollar nuevos y mejores métodos de diagnóstico (Vera-Cruz *et al.*, 2003).

Dentro de estos modelos, el uso de cepas del parásito con diferentes características ha sido útil para estudiar la relevancia de las poblaciones de *T. cruzi* en la relación hospedero-parásito. Por ejemplo, en un estudio se seleccionaron dos cepas con diferencias biológicas extremas: RA, una cepa pantrópica y altamente virulenta; y CA-I, una cepa miotrópica de baja virulencia. Con ellas mostraron que la infección *in vivo* con *T. cruzi* modula la funcionalidad de las células presentadoras de antígeno (APCs), en una manera dependiente de la cepa usada (Alba Soto *et al.*, 2003). La inmunopatología de la enfermedad de Chagas también ha sido evaluada en modelos murinos al realizar estudios comparativos entre clones pertenecientes al mismo genotipo (Garzon *et al.*, 2005). En ese estudio, la clona de mayor virulencia *in vivo* fue asociada con una mayor capacidad de invadir las células del hospedero y provocar severo daño tisular, así como de inducir una mayor activación policlonal e inmunosupresión durante la fase aguda. Otros estudios realizados en otros roedores (por ejemplo en *Calomys callosus*, una especie de roedor silvestre) han servido para investigar la evolución de la infección y de las lesiones histopatológicas, demostrando la importancia de las características de las cepas en la determinación de lesiones en el hospedero mamífero (Magalhães-Santos *et al.*, 2004).

En el laboratorio de la Dra. Bertha Espinoza se cuenta actualmente con un cepario de *T. cruzi* que consta de 100 aislados diferentes, de los cuales, la mayoría ya ha sido caracterizado genéticamente. Biológicamente, se han encontrados cepas que poseen baja

virulencia y cepas con alta virulencia (Caballero, 1996). Seleccionando dos cepas, se observó que al inocular ratones BALB/c por vía intraperitoneal con 1×10^5 tripomastigotes de una cepa denominada Querétaro el 100% de los ratones moría a causa de la infección, mientras que con la otra cepa, denominada Ninoa, sobrevivía el 100% de los animales, los cuales llegaban a la fase crónica de la infección (Sosa, 2003, Rico Ramírez, 2004).

En estudios realizados con macrófagos *in vitro* se observó que estas cepas no sólo mostraban diferencias en su virulencia, sino también poseían diferente capacidad de infección (Jiménez Marín, 2005). En este mismo estudio se observó también un incremento en la producción de TNF- α , siendo mayor en las células infectadas con la cepa Querétaro que en las células infectadas con Ninoa. También se observó una expresión diferencial de citocinas (IL-12, IL-10, IL-4, IFN- γ) en suero de ratones infectados con estas cepas, siendo mayor en los ratones infectados con la cepa Querétaro con excepción de IL-4 (Rico Ramírez, 2004).

En otro estudio con estas cepas se evaluó mediante RT-PCR la expresión de citocinas *in situ* en corazón, bazo y músculo esquelético de ratones infectados con las cepas mencionadas. Se observó una expresión diferencial de algunas quimiocinas (CCL2, CCL4 y CXCL9) en los órganos estudiados desde las 5 h post-infección. La expresión de mRNA de estas quimiocinas fue mayor en los ratones infectados con la cepa Querétaro (Oaxaca Hernández, 2005). Sin embargo, aún falta por realizarse la caracterización histopatológica del modelo usado en el laboratorio, así como evaluar el perfil de citocinas *in situ*, el cual podría estar contribuyendo en las diferencias observadas durante la infección con estas cepas.

III. HIPÓTESIS

Dadas las diferencias biológicas observadas entre dos cepas mexicanas de *T. cruzi* I, es probable que en el modelo murino el perfil de citocinas expresado *in situ* esté relacionado con la evolución y severidad de la infección causada por cada una de estas cepas, afectando en forma distinta el proceso inflamatorio en los tejidos infectados.

IV. OBJETIVOS

IV.1 General:

- Estudiar el fenómeno inflamatorio *in situ* de ratones infectados con las cepas mexicanas de *Trypanosoma cruzi*, Querétaro y Ninoa.

IV.2 Particulares:

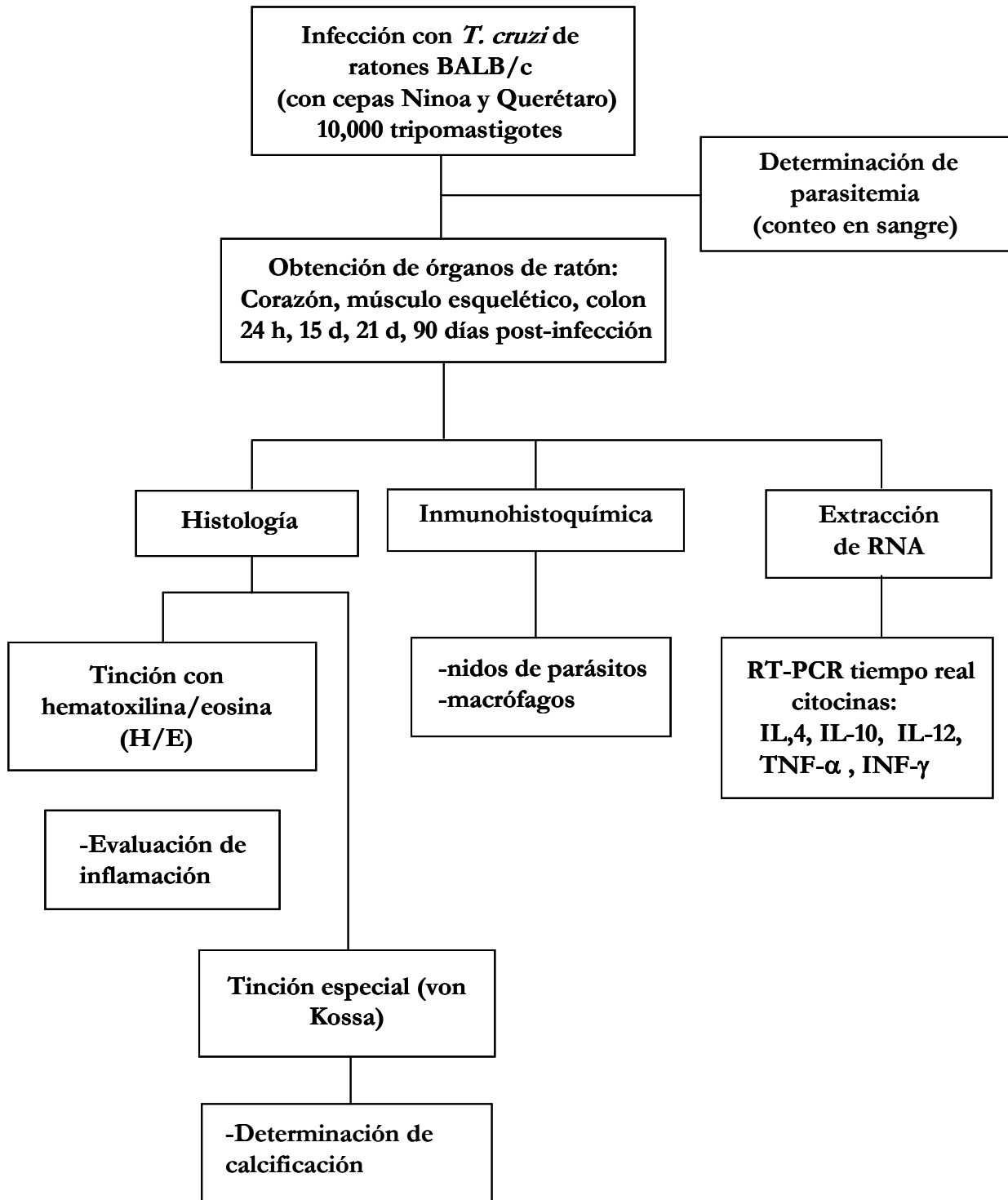
- Determinar la presencia de parásitos en los órganos blanco estudiados de los ratones infectados por *T. cruzi*.
- Estudiar los infiltrados inflamatorios durante la cinética de infección por *T. cruzi*, con especial énfasis en la presencia de macrófagos en los mismos.
- Analizar la expresión *in situ* de mRNA de las citocinas IL-4, IL-10, IL-12, IFN- γ , y TNF- α , en los órganos blanco estudiados.
- Estudiar el daño histopatológico producido por la infección con cada una de las cepas de *T. cruzi*.

II. JUSTIFICACIÓN

Diversos estudios en nuestro laboratorio han mostrado diferencias biológicas entre dos cepas mexicanas de *Trypanosoma cruzi* en un modelo murino, a pesar de que ambas cepas han sido caracterizadas como *T. cruzi* I. Estas diferencias incluyen la capacidad de infección *in vitro*, la carga parasitaria en sangre y su virulencia. Sin embargo, los resultados obtenidos han sido en su mayoría en sistemas *in vitro* o a nivel sistémico, como la medición de citocinas en suero. Además, aún no se ha realizado la caracterización histopatológica de este modelo de infección, particularmente en aquellos tejidos considerados como órganos blanco del parásito. Otros investigadores han reportado ya diferencias en la inmunopatología producida por la infección con cepas sudamericanas pertenecientes al mismo genotipo (Garzon *et al.*, 2005). Por tal motivo, resulta interesante estudiar las poblaciones de células inmunes en tejidos blanco directamente afectados por la infección, complementando así la caracterización de nuestro modelo. Además, considerando que el perfil de citocinas puede influir en el desenlace de la enfermedad, es importante evaluar la respuesta del hospedero ante la infección con estas cepas mexicanas. Una forma es mediante la determinación de la expresión *in situ* de algunas citocinas que participan en la resistencia (IL-12, IFN- γ , TNF- α) o susceptibilidad (IL-4, IL-10) a la infección.

La evaluación de la respuesta inmune del hospedero ante la infección con cepas mexicanas del parásito es necesaria, ya que en México la enfermedad de Chagas es debida predominantemente al grupo *T. cruzi* I.

V. DISEÑO EXPERIMENTAL



VI. MATERIAL Y MÉTODOS

VI.1. RATONES.

Se utilizaron ratones hembra de la cepa BALB/c de 7-8 semanas de vida, con un peso entre 18 y 20 g, proporcionados por el bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la U.N.A.M. Se realizaron 2 experimentos independientes; en cada uno de ellos se utilizaron 36 ratones, los cuales se dividieron en tres grupos experimentales conformados por: 12 ratones que fueron infectados con la cepa virulenta (grupo Querétaro), 12 ratones infectados con la cepa no virulenta (grupo Ninoa) y 12 ratones sin infectar o controles (grupo control). A su vez, se usaron tres ratones de cada grupo por cada punto experimental: 24 horas, 15 días, 21 días y 90 días post-infección (pi). Los ratones se mantuvieron en condiciones de alimentación y líquidos *ad libitum* (Suckow *et al.*, 2001).

VI.2. PARÁSITOS.

Del cepario perteneciente al laboratorio de Inmunología de la Dra. Bertha Espinoza, conformado por más de 100 aislados mexicanos, se seleccionaron dos cepas que han mostrados diferencias en patogenicidad en estudios previos realizados en el laboratorio. La cepa Ninoa fue aislada de un caso agudo de enfermedad de Chagas en humano (Monteón *et al.*, 1996). La cepa Querétaro fue aislada de un insecto vector. Como ha sido demostrado previamente, ambas cepas pertenecen al grupo genético *T. cruzi* I (López-Olmos *et al.*, 1998; Bosseno *et al.*, 2001).

Cada ratón fue inoculado intraperitonealmente con 10 000 tripomastigotes sanguíneos de la cepa correspondiente en 200 μ L de PBS estéril. El grupo control fue inyectado con el mismo volumen de PBS. La parasitemia se determinó a partir de 5 μ L de sangre obtenidos de la vena de la cola diluidos 1:10 o 1:50 en PBS (dependiendo del día post-infección) y mediante conteo de los parásitos en una cámara de Neubauer, como ha sido reportado previamente (Sosa, 2003).

VI.3. OBTENCIÓN DE ÓRGANOS.

Previo a su uso, el material quirúrgico fue sumergido durante 2 h en una solución de dietilpírocarbonato (DEPC) 0.1%; se envolvió y se esterilizó en autoclave. Los ratones correspondientes (3 por cada punto experimental) se sacrificaron a 1, 15, 21 y 90 días pi para la obtención de los órganos. Se seleccionaron estos tiempos pi por corresponder a etapas iniciales de la infección, de crecimiento exponencial de los parásitos en sangre, pico de parasitemia y etapa crónica, respectivamente.

En condiciones de asepsia, se ingresó a las cavidades abdominal y torácica y se extrajeron el bazo, el corazón, y un fragmento de colon (de la región contigua al ciego). El corazón y el bazo de cada ratón fueron pesados usando cajitas de vidrio previamente tratadas con solución de DEPC 0.1%, esterilizadas y pesadas; el peso de cada órgano se obtuvo por diferencia del peso de la caja con el órgano menos el peso de la caja vacía. El músculo esquelético fue obtenido de una de las extremidades traseras del ratón.

Cada órgano y tejido fue dividido en dos: una parte se colectó en tubos eppendorf libres de RNasas y se congeló inmediatamente a -70°C , para la posterior extracción de RNA total. La otra parte se fijó usando paraformaldehído 4% y se incluyó en parafina (Paraplast embedding media, Paraplast X-tra; Sigma-Aldrich, MO, EUA) (ver Anexo II).

VI.4. HISTOLOGÍA.

De los tejidos embebidos en parafina, se realizaron cortes de 5 micras de espesor, que se colectaron en portaobjetos previamente silanizados (ver Anexo II), dejándose a $37-40^{\circ}\text{C}$ durante toda la noche. Las laminillas se desparafinaron usando xileno y varios baños de etanol a diversas concentraciones (absoluto, 96%, 70% y 50%). Las secciones se tiñeron con hematoxilina/eosina (H/E) para estudiar su histología y posible daño tisular (para una descripción detallada de las técnicas de desparafinación y tinción con H/E, revisar el Anexo II). Tres laminillas no consecutivas, cuyos cortes tenían una separación de $50\ \mu\text{m}$ entre sí, fueron examinados en un microscopio óptico (Optiphot-2, Nikon), y se tomaron microfotografías usando una cámara Coolpix 4300 (Nikon), acoplada al microscopio. El infiltrado inflamatorio en corazón y músculo esquelético fue analizado según los grados de

inflamación descritos por Sun y Tarleton (1993). Para estudiar el infiltrado inflamatorio en corazón se utilizó el siguiente grado de inflamación: 0=normal, 1=focal, 2=multifocal, 3= difuso con involucramiento parcial de la pared, 4=involucramiento total de la pared. Para el estudio del infiltrado inflamatorio en músculo esquelético el grado de inflamación utilizado fue: 0=normal, 1=pocos infiltrados celulares, 2=infiltrado difuso, 3= infiltrados abundantes, 4=infiltrados granulomatosos. En el caso del colon, no se encontró en la literatura alguna escala que pudiera utilizarse para medir el grado de inflamación en este tejido, por lo que se utilizó el siguiente, considerando solamente el infiltrado inflamatorio en la muscularis externa del colon: 0=normal, 1=leve, 2=moderado, 3=severo.

Adicionalmente, se llevaron a cabo tinciones de von Kossa en algunas laminillas para verificar la presencia de depósitos de calcio, siguiendo la técnica convencional (ver Anexo II).

VI.5. INMUNOHISTOQUÍMICA DE EPIMASTIGOTES DE CULTIVO DE *Trypanosoma cruzi*.

Los parásitos en cultivo fueron colectados en tubos eppendorf y centrifugados a 3000 rpm durante 5 min. Se lavaron con PBS pH 7.4 y se centrifugaron nuevamente a las mismas condiciones. Se contó y ajustó el número de parásitos a 2×10^6 parásitos/mL y se centrifugó una vez más. Los parásitos fueron resuspendidos en una pequeña alícuota de PBS (en lo que queda después de decantar), y se adicionó 1 mL de paraformaldehído 4% en PBS. Inmediatamente después se colocaron 10 μ L sobre un portaobjetos silanizado y se dejó secar a T.A. Los portaobjetos se pueden almacenar a 4°C si se van a utilizar en los próximos días, o a -20°C si se van a utilizar en meses.

Los parásitos fijados fueron marcados como se describe en la técnica de Inmunohistoquímica usando el suero anti-*T. cruzi*, probando cuatro concentraciones de suero (1:100, 1:250, 1:500, 1:1000).

VI.6. INMUNOHISTOQUÍMICA.

VI.6.1. Detección de nidos de amastigotes y detección de macrófagos.

Laminillas no consecutivas fueron desparafinadas y rehidratadas (ver Anexos). Estas se incubaron en PBS con albúmina sérica bovina (BSA) 2% durante 2 h para bloquear uniones inespecíficas (Lima et al., 2001).

Los anticuerpos primarios utilizados fueron un anticuerpo F4/80 biotinilado (dilución 1:50; Caltag Laboratories, CA, EUA) para la detección de macrófagos; un anticuerpo isotipo IgG2b para los controles negativos (dilución 1:50; Caltag Laboratories); un anticuerpo dirigido contra el parásito obtenido previamente en el laboratorio a partir de la inmunización de un conejo con un extracto total de *T. cruzi* cepa Querétaro, (suero anti-*T. cruzi*, dilución 1:1000); y suero preinmune de conejo, para usarlo como control negativo (dilución 1:1000). Los cortes fueron incubados con 50 μ L de anticuerpo F4/80 biotinilado o suero anti-*T. cruzi* o con 50 μ L de anticuerpo isotipo IgG2b o suero preinmune preparados con PBS/BSA 0.5%, durante toda la noche a 4°C, en una cámara húmeda. Tras la incubación durante toda la noche, se realizaron tres lavados con PBS/BSA 1%, y se colocaron 50 μ L de estreptavidina-ficoeritrina 1:500 (SA-PE; Caltag Laboratories) (para detectar los anticuerpos F4/80 biotinilados unidos a macrófagos) o un segundo anticuerpo anti-IgG de conejo acoplado a fluoresceína 1:100 (anti-IgG-FITC; Sigma Immuno Chemicals, MO, EUA) (para la detección del parásito). Se dejó incubando durante 1 h en oscuridad, al término de la cual se realizaron (bajo luz tenue) 2 lavados con PBS/BSA 1% y un tercer lavado con PBS. Se contratiñó el material genético con el fluorocromo DAPI (Molecular Probes, Oregon, EUA) usando una dilución 1:1000 en PBS y se realizó el montaje utilizando el reactivo Gel/Mount (Biomedica Corp., CA, EUA). Los resultados fueron visualizados en un microscopio de fluorescencia Zeiss Axiovert (Zeiss).

Para revelar utilizando un sistema enzimático, se siguieron los mismos pasos hasta la incubación del primer anticuerpo durante toda la noche (en este caso sólo se utilizó el anticuerpo F4/80 o el isotipo IgG2b). Después de los lavados, las laminillas se incubaron con una solución al 3% de H₂O₂ durante 15 min. Se lavaron tres veces con PBS (10 min por lavado) y se agregó después el conjugado estreptavidina-peroxidasa (SA-HRP; Amersham Biosciences), en una dilución 1:300 en PBS. Se dejó incubar durante 1h 30 min, y se lavaron

las laminillas tres veces con PBS. Para revelar se utilizó el sustrato diaminobenzidina (Sigma) preparado en el momento. Se contratiñó con hematoxilina de Harris diluida 1:10, y se montaron las laminillas.

Los conteos de nidos de amastigotes detectados con el suero anti-*T. cruzi* se realizaron con el objetivo 40X (amplificación total de 400X) y se estudiaron 75 campos por ratón en el corazón, 60 campos por ratón en músculo esquelético (tomado de la extremidad posterior) y 30 campos por ratón en colon proximal (de la porción cercana al ciego).

En el caso de la detección de macrófagos, se contó el número de campos en los que se observaba una alta densidad de macrófagos, con respecto al número de campos totales analizados por cada tejido de cada ratón. No se consideró la presencia de nidos de parásitos en esos campos para esta evaluación.

VI.6.2. Detección simultánea de nidos de amastigotes y macrófagos.

Para evaluar el porcentaje de nidos infiltrados y la presencia de macrófagos en ellos, se realizaron inmunohistoquímicas con doble marcaje. Para la incubación de los anticuerpos primarios se utilizaron 50 µL de una mezcla de anticuerpo F4/80 biotinilado + suero anti-*T. cruzi* ó 50 µL de anticuerpo isotipo IgG2b + suero preinmune preparados con PBS/BSA 0.5%. Para la detección de los anticuerpos se utilizaron 50 µL de una mezcla de SA-PE 1:500 + un segundo anticuerpo anti-IgG-FITC 1:100. Se siguió la misma técnica descrita arriba.

VI.6.3. Estandarización de las inmunohistoquímicas.

Se estandarizó la inmunohistoquímica para la detección del parásito en los tejidos. Se probaron diluciones 1:500 y 1:1000 de suero anti-*T. cruzi*. Se trabajó con una dilución 1:100 del segundo anticuerpo anti-IgG-FITC), estandarizado previamente en el laboratorio. Se utilizó el colorante fluorescente DAPI para la contratiñación de los núcleos. También fue necesario determinar su dilución adecuada, probando 1:100, 1:250, 1:500, 1:1000 y 1:2000; se seleccionó la dilución 1:1000.

Se estandarizó la inmunohistoquímica para la detección de macrófagos. Se probó el anticuerpo F4/80 biotinilado a las diluciones 1:20, 1:50 y 1:100. El complejo SA-PE utilizado

para revelar su unión se probó en diluciones 1:100, 1:250 y 1:500. Como control negativo se utilizó el anticuerpo isotipo anti-IgGb a la misma dilución que el anticuerpo de trabajo.

Se estandarizó la inmunohistoquímica doble para teñir simultáneamente los parásitos y los macrófagos. Se hizo una mezcla de los anticuerpos primarios y se incubaron juntos durante toda la noche a 4°C; también se probó incubando uno de los anticuerpos toda la noche a 4°C, y añadiendo el otro anticuerpo primario al día siguiente, con incubación de 2 h a 37°C; así como la adición simultánea de los complejos reveladores. No se encontraron diferencias entre un procedimiento y otro, ni con respecto a la reacción estandarizada para cada suero o anticuerpo.

VI.7. EXTRACCIÓN DE RNA TOTAL.

La extracción de RNA total se realizó por la técnica de TRIzol® (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Se utilizó la mitad de cada corazón, y un pedazo de aproximadamente 6x6x6 mm de músculo esquelético. Brevemente, las muestras fueron maceradas adicionando 400 µL de TRIzol® en un tubo de 2 mL libre de RNasas y vertiendo en éste el fragmento de órgano o tejido; éste se disgregó utilizando un homogenizador PRO 200; una vez homogenizado, se agregaron 600 µL más de TRIzol®. Se mezcló en vórtex y se incubó durante 10 min en hielo, y durante 5 más a temperatura ambiente. Se adicionaron 200 µL de cloroformo, se mezcló por inversión, y se incubó durante 3 min a temperatura ambiente. Se centrifugó a 12000 x g durante 15 min a 4°C. Se recuperó la fase acuosa en un tubo limpio y se adicionaron 500 µL de alcohol isopropílico, se mezcló por inversión y se dejó incubar a temperatura ambiente durante 10 min. Se centrifugó a 12000 x g durante 10 min a 4°C. Se decantó el sobrenadante, se lavó la pastilla con 1 mL de etanol 75% y se centrifugó a 7500 x g durante 5 min a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y se dejó secar la pastilla al aire, la cual fue resuspendida en 100-150 µL de agua tratada con DEPC 0.1%, y alicuotada para su almacenamiento a -70°C hasta su uso.

VI.7.1. Cuantificación de RNA por espectrofotometría.

La cuantificación se realizó en un espectrofotómetro GeneQuant Pro mediante el uso de capilares de 0.5 mm de diámetro y 5 cm de longitud. El espectrofotómetro proporciona automáticamente los parámetros de pureza (la relación de pureza está dada por la ecuación: $r = OD_{260} / OD_{280}$; un valor en el intervalo 1.5-2 es indicativo de una muestra pura) y de concentración de la muestra de RNA (en ng/ μ L).

VI.8. TRATAMIENTO DEL RNA CON DNasa I.

Las muestras de RNA fueron tratadas con DNasa I recombinante (Ambion) para la eliminación de DNA genómico como posible contaminante. Para ello, se trataron 2 μ g de RNA con 1 μ L de rDNasa I (2 U/ μ L), 2 μ L de buffer para reacción 10X, y H₂O/DEPC para PCR (ver Anexo I) suficiente para completar 20 μ L. La mezcla se dejó incubando durante 30 min a 37°C. Se adicionaron 2 μ L de DNase Inactivation Reagent (reactivo de inactivación de la DNasa) a cada muestra y se incubó a temperatura ambiente durante 2 min, mezclando el tubo de dos a tres veces durante este tiempo. Después se centrifugó a 10000 x g durante 1.5 min. El sobrenadante, donde se encuentra el RNA, fue transferido a un tubo nuevo, cuidando de no tomar el pellet. Las muestras se colocaron en hielo inmediatamente después.

VI.8.1. Electroforesis en geles de agarosa 1%.

Para verificar que el RNA conservara su integridad, es decir, que no hubiera sido degradado tras el tratamiento con DNasa I, se realizaron electroforesis en geles de agarosa 1%, a 100 V durante 30 min, en los cuales se cargaron 5 μ L de RNA tratado por pozo. El gel se tiñó con bromuro de etidio y se analizó en un transiluminador.

VI.9. TRANSCRIPCIÓN REVERSA (RT) DE mRNAs.

Inmediatamente después del tratamiento con DNasa I (ver arriba), se realizó la transcripción reversa de las muestras de RNA. Se utilizó el kit TaqMan® Reverse Transcription Reagents (Applied Biosystems, CA, EUA). Por cada muestra se adicionaron los reactivos para transcripción reversa: 0.5 µL de MultiScribe RT (50 U/µL), 0.4 µL de RNase Inhibitor (20 U/L), 1 µL de oligo d(T)₁₆ 50 µM, 4 µL de mezcla de dNTPs 2.5 mM, 4.4 µL de MgCl₂ 25 mM, 2 µL de Taqman RT buffer 10X, 5 µL de RNA tratado con DNasa I (equivalentes a 500 ng de RNA), y agua cbp para 20 µL. La transcripción reversa se llevó a cabo en el termociclador PTC-100® Programmable Thermal Controller (MJ Research Inc.) utilizando el siguiente programa: 25°C durante 10 min, 48°C durante 30 min, y 95°C durante 5 min (después de este paso, el cDNA obtenido puede ser almacenado a -20 °C hasta su uso). Se tomaron 5 µL de RNA tratado con DNasa I y se mezclaron con 15 µL de agua, para ser usados como control no-RT en la PCR.

VI.10. PCR EN TIEMPO REAL (PCR-tr)

VI.10.1. Primers

Para cada muestra de cDNA obtenido se realizó la PCR en tiempo real de las citocinas IL-4, IL-10, IL-12, IFN-gama, TNF-alfa, y del transcrito constitutivo HPRT (hipoxantina fosforribosil transferasa), utilizando oligonucleótidos específicos. Estos primers fueron diseñados específicamente para PCR en tiempo real mediante el programa Primer Express® Applications-based primer design software (Applied Biosystems, CA, EUA)(Tabla 1).

Tabla 1. Secuencias de los primers utilizados y tamaño del amplicón

PRIMER*	SECUENCIA	TAMAÑO DEL AMPLICÓN (pb)
mIL-4 sense	GCA GAG ACT CTT TCG GGC TTT	60
mIL-4 antisense	TCA TTC ATG GTG CAG CTT ATC G	
mIL-10 sense	GGA AGA CAA TAA CTG CAC CCA CTT	61
mIL-10 antisense	CCG CAG CTC TAG GAG CAT GT	
mIL-12 sense	CGT GCT CAT GGC TGG TGC AAA G	89
mIL-12 antisense	CAC ATG TCA CTG CCC GAG AGT	
mIFN-γ sense	AAT GAA CGC TAC ACA CTG CAT	69
mIFN-γ antisense	TGG CAG TAA CAG CCA GAA ACA	
mTNF-α sense	GGG CAG GTC TAC TTT AGA GTC ATT G	67
mTNF-α antisense	GGC TGG GTA GAG AAT GGA TGA A	
mHPRT sense	GAA AGA CTT GCT CGA GAT GTC A	65
mHPRT antisense	AGC ACA CAG AGG GCC ACA A	

* m es por murino

VI.10.2. Estandarización de las condiciones de amplificación.

Se estandarizaron las condiciones para PCR de los genes en estudio, probando temperaturas de alineamiento entre 50 y 62°C. Se seleccionó la temperatura de 60°C para todos los genes, la cual coincidió con la temperatura recomendada en el protocolo de amplificación incluido en el manual del fabricante del ABI Prism® 7000 SDS (Applied Biosystems). Por tal motivo, se utilizó dicho programa de amplificación.

También se probaron diferentes concentraciones de primers buscando la concentración en la que se obtuviera una buena eficiencia de amplificación, sin que se formaran dímeros de primers. Se probaron concentraciones finales de 50, 150, 300 y 600 nM. La concentración seleccionada fue 300 nM.

VI.10.3. PCR en tiempo real.

Para la amplificación se usó el kit SYBR® Green PCR y el sistema de detección ABI Prism® 7000 SDS (Applied Biosystems). Para una reacción de 20 µL se utilizaron 10 µL de SYBR Green PCR Master Mix 2X, 1.2 µL de cada primer (antisense y sense) 5 µM del gen en estudio, 5.6 µL de agua para PCR y 2 µL de molde de cDNA obtenido por RT.

El programa de amplificación para la PCR en tiempo real consistió de: 1 ciclo de 95 °C durante 10 min, y 40 ciclos a 95 °C durante 15 seg, 60 °C durante 1 min (Protocolo SYBR® Green PCR Master Mix). Por cada grupo de reacciones de PCR se incluyó un control no-RT (RNA tratado con DNasa I que no fue transcrito reversamente) para cada muestra y un control negativo (sin cDNA) por cada juego de primers.

Se elaboraron curvas estándar a partir de diluciones seriadas de cDNA de músculo esquelético y de corazón de un ratón infectado con la cepa Querétaro y sacrificado a los 21 días pi. Cada una de estas diluciones fue amplificada usando cada uno de los juegos de primers. Los valores de Ct se graficaron contra el logaritmo de la concentración de cDNA inicial. Las eficiencias de amplificación de cada gen fueron calculadas a partir de las ecuaciones de las rectas (Cummings y Tarleton, 2003), utilizando la fórmula:

$$E=10^{-1/\text{pendiente}}$$

VI.11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Los resultados de parasitemia, peso de órganos y estudios inmunohistoquímicos e histológicos se expresaron como la media aritmética \pm desviación estándar de 6 ratones para cada punto analizado provenientes de 2 experimentos independientes. Las diferencias fueron analizadas estadísticamente mediante una prueba U de Mann Whitney de dos colas, considerando una $p < 0.05$. Las excepciones fueron para el análisis del peso de órganos, en donde se usó una prueba de ANOVA de una vía, con el post-test de Bonferroni, considerando una $p < 0.05$, y en el parasitismo en los tejidos, donde se utilizó una prueba t de Student de una cola, $p < 0.05$ (Campbell y Machin, 1993).

Los resultados obtenidos mediante PCR-tr fueron analizados utilizando el software *Q-Gene*, obtenido sin costo en el sitio www.BioTechniques.com (Muller et al., 2002). Este

programa utiliza un método de análisis en el cual se toma en cuenta la eficiencia de amplificación de cada gen para calcular la expresión relativa de los genes problema con respecto al control. Las diferencias estadísticas fueron medidas mediante ANOVA de una vía, con el post-test de Bonferroni, $p < 0.05$.

VII. RESULTADOS

VII.1. PARASITEMIA.

Las cepas mexicanas de *T. cruzi*, denominadas Querétaro y Ninoa, fueron inoculados en ratones BALB/c y el curso de la parasitemia fue seguido durante la infección. Se observó un rápido incremento en el número de parásitos en sangre siendo detectables a partir del día 7 pi, alcanzando el punto máximo de parasitemia entre el día 21 y 23 pi. Sin embargo, el pico de parasitemia en los ratones infectados con la cepa Querétaro fue 4.36 veces mayor (4.5×10^6 parásitos/mL) que el número máximo de parásitos alcanzado en los ratones infectados con la cepa Ninoa (1.03×10^6 parásitos/mL de sangre) (Figura 7). Los parásitos fueron indetectables en la etapa crónica de la infección (a partir del día 60 pi).

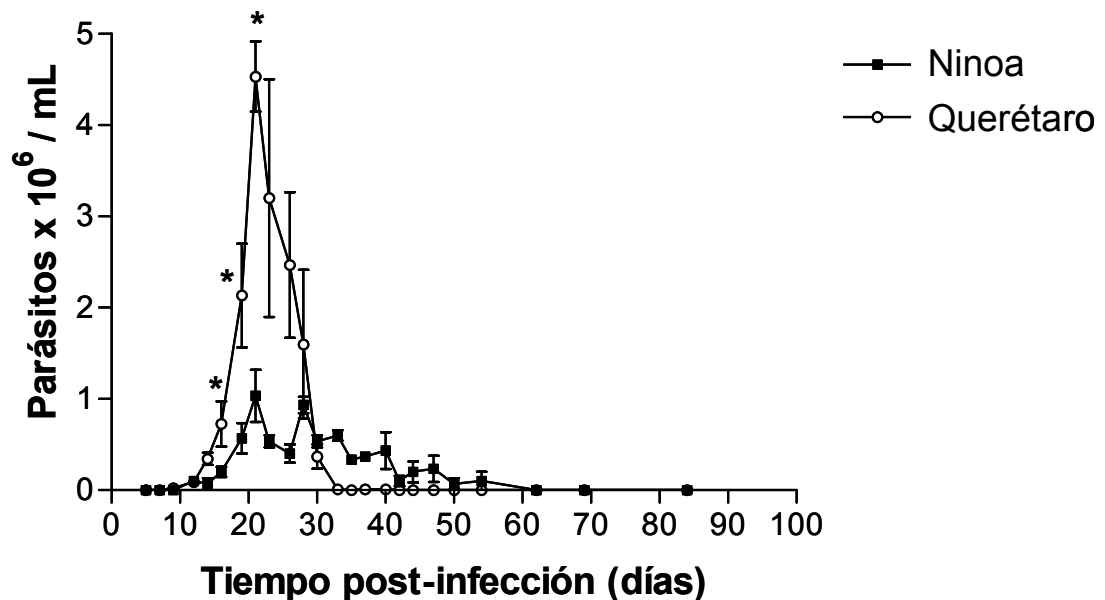


Figura 7. Curvas de parasitemia. Se infectaron ratones con 10 000 tripomastigotes de la cepa Querétaro (círculos abiertos) o de la cepa Ninoa (cuadros cerrados) y se determinó el número de parásitos presentes en sangre cada tercer día, por conteo en cámara de Neubauer. Los datos se presentan como el promedio \pm DE de al menos tres ratones por punto experimental. Se muestra una gráfica representativa de dos experimentos independientes. Prueba de U Mann-Whitney, $p < 0.05$.

VII.2. CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS.

Los animales infectados con la cepa Querétaro presentaron erizamiento del pelo del lomo, posición jorobada y temblor continuo de todo su cuerpo alrededor del día 13-15 pi; al día 21 pi se observó parálisis en sus extremidades posteriores (Figura 8C). Estas manifestaciones continuaron a lo largo del curso de la infección, aunque su intensidad fue menor conforme disminuyó la parasitemia. Lo anterior no fue observado en los animales infectados con la cepa Ninoa o en los animales control (Figura 8A y 8B).



Figura 8. Características macroscópicas. Ratones infectados con 10 000 tripomastigotes de la cepa Ninoa (B) o de la cepa Querétaro (C), en comparación con un ratón control (A), a los 21 días pi. La flecha muestra la pérdida de la postura anatómica de la extremidad posterior en el ratón infectado con la cepa Querétaro, indicando parálisis de este miembro.

Los ratones fueron sacrificados a diferentes días pi, como se indica en Material y Métodos. El corazón y el bazo de cada ratón fueron pesados. A las 24 h no se observó diferencia alguna en el peso de dichos órganos entre ninguno de los grupos experimentales. Sin embargo, para el día 15 pi –que corresponde al inicio de la fase exponencial de crecimiento del parásito en sangre, como se aprecia en las curvas de parasitemia-- el peso del bazo de los ratones infectados con la cepa Querétaro aumentó 5 veces, mientras que para los infectados con la cepa Ninoa sólo se duplicó, con respecto al control. Para el día 21, es decir cercano al pico de parasitemia, los ratones infectados con la cepa Querétaro presentaron bazos cuyo peso era 7.5 veces mayor que el peso de un bazo de ratón sin infectar (0.82 ± 0.13 g, y 0.11 ± 0.04 g, respectivamente), mientras que el de los ratones infectados con Ninoa era casi 4 veces mayor. A los 90 días pi, el peso de los bazos de los animales infectados (con ambas cepas), había disminuido a 2 veces con respecto a el peso del bazo de los animales

control (Figura 9). No se observaron diferencias en el peso del corazón en ninguno de los grupos en ningún punto experimental.

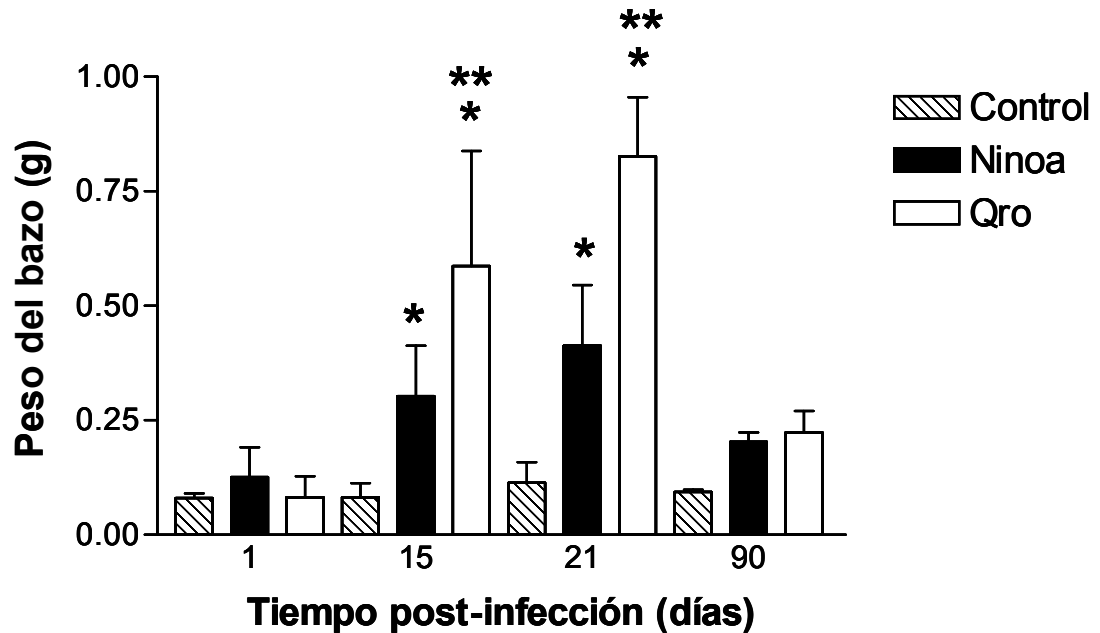


Figura 9. Peso del bazo de ratones infectados con las cepas Ninoa y Querétaro de *T. cruzi*, y de ratones sin infectar. Al momento del sacrificio, se extrajo el bazo de cada ratón, y se pesó. Control, barras rayadas; Ninoa, barras cerradas; Querétaro, barras abiertas. Los datos están expresados como el promedio \pm DS de tres ratones por cada punto experimental, correspondientes a un experimento representativo de dos experimentos independientes. Se usó una prueba de ANOVA con post-test de Bonferroni, * $p < 0.001$ vs control; ** $p < 0.001$ entre cepas.

Por otro lado, sólo en los ratones infectados con la cepa Querétaro se observó la presencia de zonas blanquecinas en el músculo esquelético al día 21 pi (en 100% de los ratones), así como adelgazamiento del mismo en las extremidades posteriores de cada ratón (Figura 10). A los 90 días pi, también fueron evidentes estas zonas, aunque de menor tamaño.

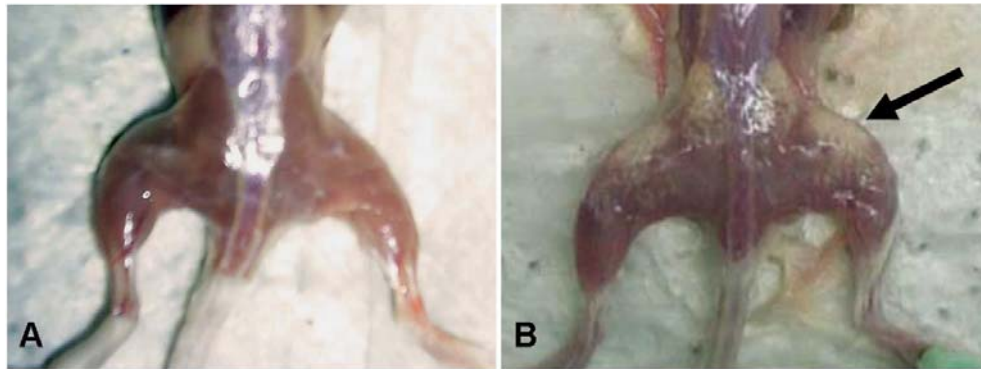


Figura 10. Características macroscópicas en músculo esquelético. Músculo esquelético de un ratón control (A) y de uno infectado con la cepa Querétaro, 21 días pi (B). La flecha muestra un área de color blanquecino en el tejido muscular.

VII.3. PARASITISMO EN LOS TEJIDOS.

La carga parasitaria en los tejidos fue analizada mediante el conteo de nidos de amastigotes en corazón, colon y músculo esquelético. El suero anti-*T. cruzi* fue producido a partir de un extracto total de proteínas de la cepa Querétaro. Para poder usarlo con ambas cepas, se verificó que fuera capaz de reconocer a la cepa Ninoa. La dilución elegida para la realización de los experimentos fue 1:1000, por ser la mayor dilución que produjo una tinción específica con la menor cantidad de fondo⁽¹⁾ (Figura 11).

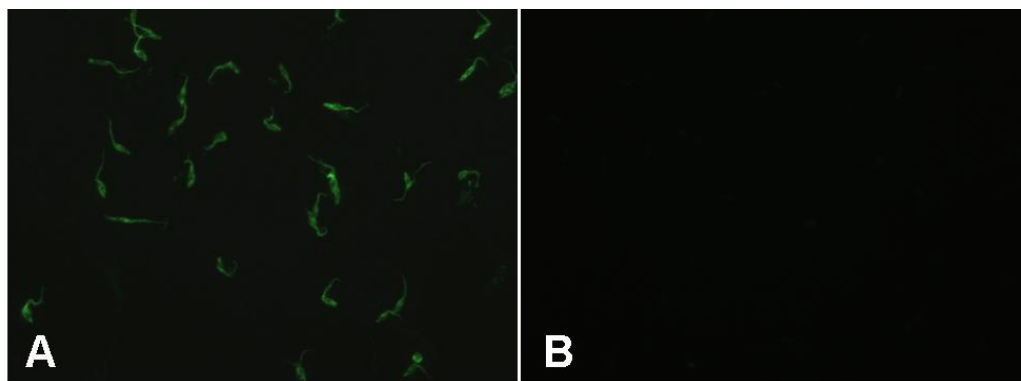


Figura 11. Detección de la cepa Ninoa de *T. cruzi* con el suero anti-*T. cruzi*. Parásitos fijados con paraformaldehído fueron incubados con diferentes concentraciones del suero anti-*T. cruzi* o suero preinmune (1:1000), y después con el segundo anticuerpo anti-IgG-FITC (1:100). A) Epimastigotes de la cepa Ninoa marcados con el suero anti-*T. cruzi*, dilución 1:1000. B) Control negativo, dilución 1:1000.

¹ Este criterio se aplicó para la elección de las demás diluciones de trabajo utilizadas durante las inmunohistoquímicas realizadas en este proyecto

Una vez comprobado que el suero anti-*T. cruzi* reconocía a los parásitos de ambas cepas, se estandarizó la inmunohistoquímica para la detección del parásito en los tejidos. Se seleccionó la dilución 1:1000 de suero anti-*T. cruzi*. Se observó que la tinción del parásito era específica y que las zonas con fluorescencia verde, debida a la fluoresceína, correspondían con los núcleos pequeños teñidos con DAPI (en azul) pertenecientes a los amastigotes (Figura 12).

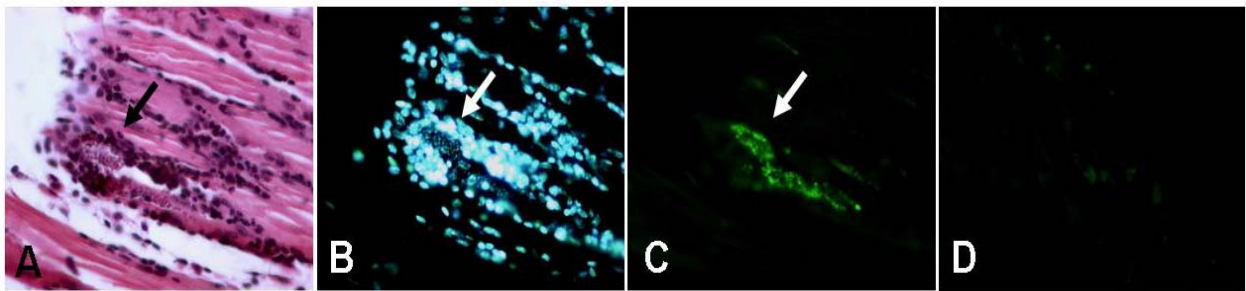


Figura 12. Detección de los parásitos en los tejidos. Cortes de 5 μm fueron incubados con el suero anti-*T. cruzi* (1:1000), después con el segundo anticuerpo anti-IgG-FITC (1:100) y contrateñidas con DAPI (1:1000). A) Tinción con H/E de músculo esquelético infectado con la cepa Querétaro, 15 días pi. B) Tinción con DAPI del mismo campo. C) Parásitos detectados con el suero anti-*T. cruzi* (mismo campo). D) Control negativo. Las flechas muestran la presencia de un nido de amastigotes. Aumento 400X.

Se observaron parásitos en los tejidos a partir del día 15 pi, siendo el número de nidos de amastigotes significativamente mayor con la cepa Querétaro que con la cepa Ninoa en los tres tejidos analizados. En corazón, la cepa Querétaro presentó 10 veces más nidos que la cepa Ninoa. Los nidos fueron observados principalmente en el pericardio y miocardio, y en escasas ocasiones en el endocardio. En músculo esquelético se observó el mismo fenómeno, pero la diferencia fue 59 veces mayor. Los nidos se encontraban distribuidos por todo el tejido analizado. En el caso del colon, hubo 33 veces más nidos de amastigotes con la cepa Querétaro que con la cepa Ninoa. Al día 21 pi aumentó el número de nidos observados con la cepa Ninoa, particularmente en el colon, donde se observó una diferencia significativa con respecto al día 15 pi. En la infección con la cepa Querétaro los valores promedio del número de nidos de amastigotes a los 21 días pi fueron similares a lo observado a los 15 días pi, pero continuaron siendo significativamente mayores con respecto a la infección con la cepa Ninoa. Los nidos en colon se detectaron en la muscularis externa del colon. Para el día 90 pi,

no se detectaron nidos mediante esta técnica en ningún tejido con ninguna de las dos cepas estudiadas (Figura 13).

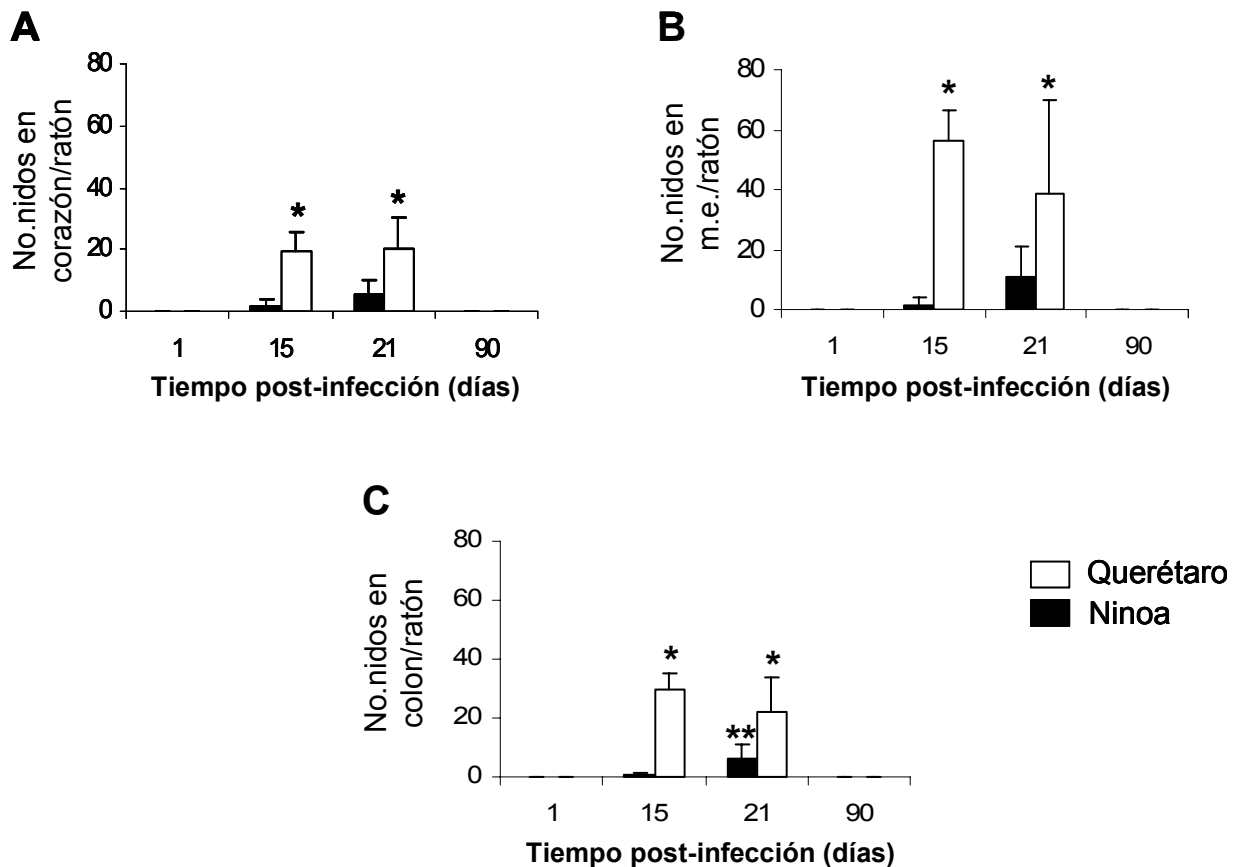


Figura 13. Cinética de infección en tejidos de ratones infectados con dos cepas mexicanas de *T. cruzi*. Los nidos de amastigotes fueron detectados mediante inmunohistoquímica, como se describe en la figura 12. El número de nidos por ratón producto de la infección con la cepa Ninoa se representa con barras sólidas, mientras que para la infección con Querétaro se utilizan barras abiertas. A) Número de nidos en corazón. B) Número de nidos en músculo esquelético. C) Número de nidos en colon. Los datos representan el promedio \pm DE de 6 ratones en dos experimentos independientes. Se usó una prueba t de Student: * entre cepas; ** entre la misma cepa en los diferentes días pi, $p < 0.05$.

VII.4 INFILTRADO INFLAMATORIO.

Al analizar los cortes teñidos con H/E se encontró que ambas cepas indujeron infiltrado inflamatorio en los tres tejidos estudiados, principalmente en músculo esquelético. Sin embargo, la intensidad del infiltrado fue significativamente mayor en la infección

producida con la cepa Querétaro, como lo muestran los resultados del grado de inflamación realizado para cada órgano (Figura 14). Los infiltrados inflamatorios fueron abundantes desde el día 15 pi en la infección con la cepa Querétaro, aumentando para el día 21 pi. Con la cepa Ninoa, la inflamación severa se observó hasta los 21 días pi. Para los 90 días pi, el infiltrado inflamatorio había disminuido en ambas infecciones en corazón y músculo esquelético. Aunque el grado de inflamación también disminuyó a los 90 días pi en el colon, no fue tan notable como en los otros tejidos estudiados.

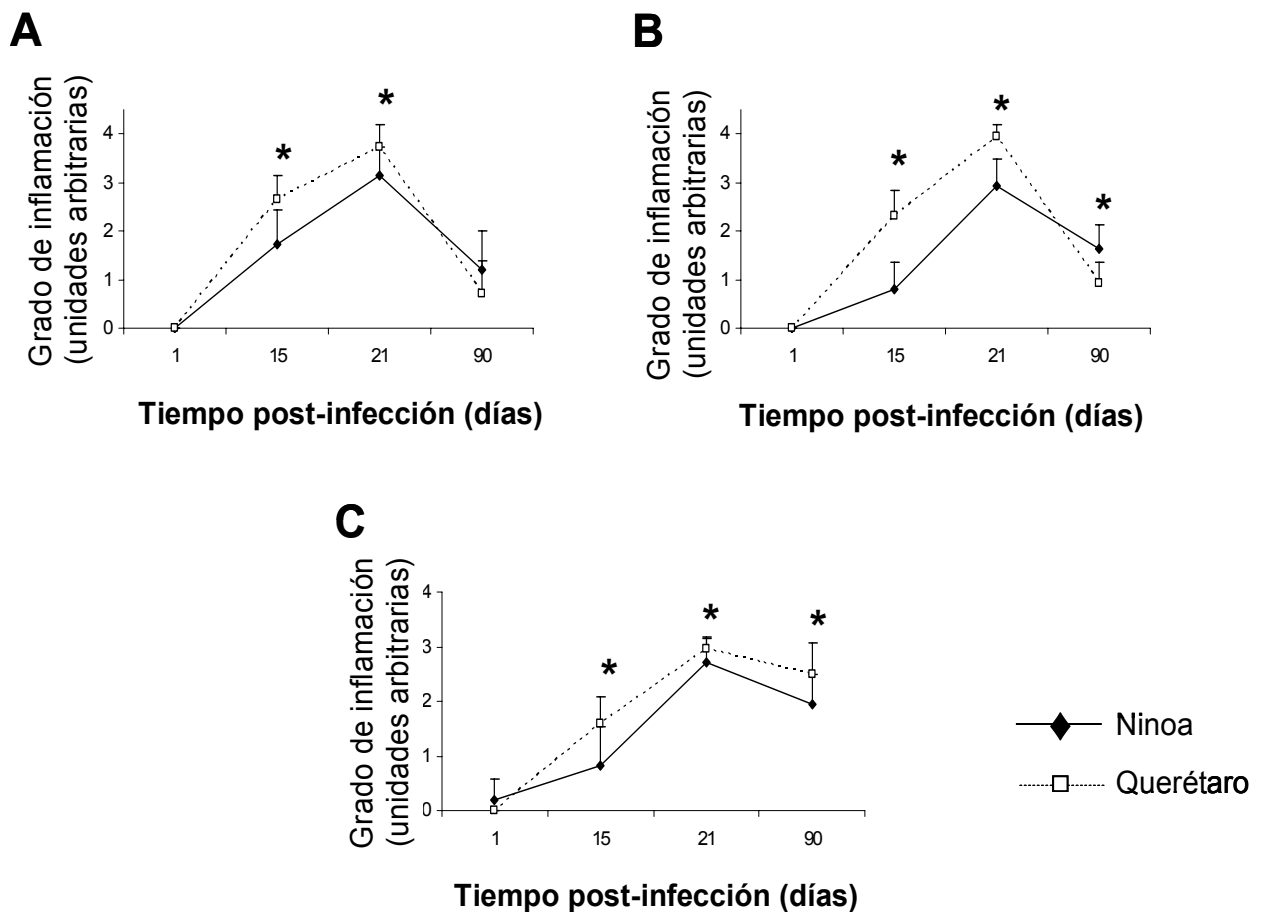


Figura 14. Grado de inflamación de tejidos infectados con la cepa Ninoa o Querétaro de *T. cruzi* a diferentes tiempos post-infección. Se analizaron laminillas teñidas con H/E en un microscopio óptico, y se utilizó un score de inflamación para cada tejido, como se describe en Material y Métodos. A) Corazón. B) Músculo esquelético. C) Colon. Se usó la prueba U Mann-Whitney de dos colas, $p < 0.001$.

El infiltrado inflamatorio se observa a partir de los 15 días pi en todos los tejidos, y desde entonces es evidente que la intensidad del infiltrado es mayor en la infección con la cepa Querétaro, aunque sin llegar a producir aún algún tipo de daño tisular.

A los 21 días pi se observó en corazón un infiltrado intenso con ambas infecciones, que provocó en algunas áreas la desorganización del tejido, producto de la infiltración y enema, siendo la intensidad del infiltrado mayor en la infección con la cepa Querétaro. Para los 90 días pi, los infiltrados inflamatorios habían disminuido notablemente con ambas infecciones, hasta llegar a observarse sólo focos aislados. Aunque en la fase crónica el infiltrado inflamatorio es mayor con la cepa Ninoa que con la cepa Querétaro, la diferencia no resultó ser estadísticamente significativa (Figuras 14 y 15).

En el caso del colon, se consideró que el parásito no infecta el intestino por ingestión, sino que llega por vía sanguínea y, como se apreció en el estudio inmunohistoquímico de nidos de parásitos, se establece en la muscularis externa. Por tal motivo, sólo se analizó el incremento en células inflamatorias en la parte muscular del colon. A los 15 días pi se observaban infiltrados focales o dispersos con pocas células inflamatorias, siendo mayor con la cepa Ninoa. Sin embargo, para los 21 días pi, la inflamación fue más severa, abarcando gran parte de la muscular del intestino, llegando a ser similar entre la infección con ambas cepas. En la etapa crónica de la infección (90 días pi), los infiltrados de células inflamatorias en ambas infecciones continúan siendo intensos, aunque su severidad es menor que lo observado durante el pico de infección (Figuras 14 y 16). Desde los 15 hasta los 90 días pi, las diferencias entre ambas cepas mostraron ser estadísticamente significativas.

En músculo esquelético fue más evidente la diferencia en el grado de infiltración desde los 15 días pi, ya que mientras con la cepa Ninoa apenas se observaban escasas zonas de infiltración perivascular, con la cepa Querétaro los infiltrados fueron difusos y abundantes. Al día 21 pi, en la infección con la cepa Ninoa, las células inflamatorias se observaban en abundancia en los espacios intersticiales, así como formando cúmulos sobre lo que muy probablemente eran nidos de parásitos, pero sin ocasionar daño tisular severo. Por el contrario, la cepa Querétaro no sólo produjo un infiltrado abundante que abarcaba fibras completas (Figuras 17H) con infiltrado tipo granulomatoso, sino además daño tisular el cual se observaba como sitios de tinción basofílica intensa (Figuras 18D). Mediante la tinción

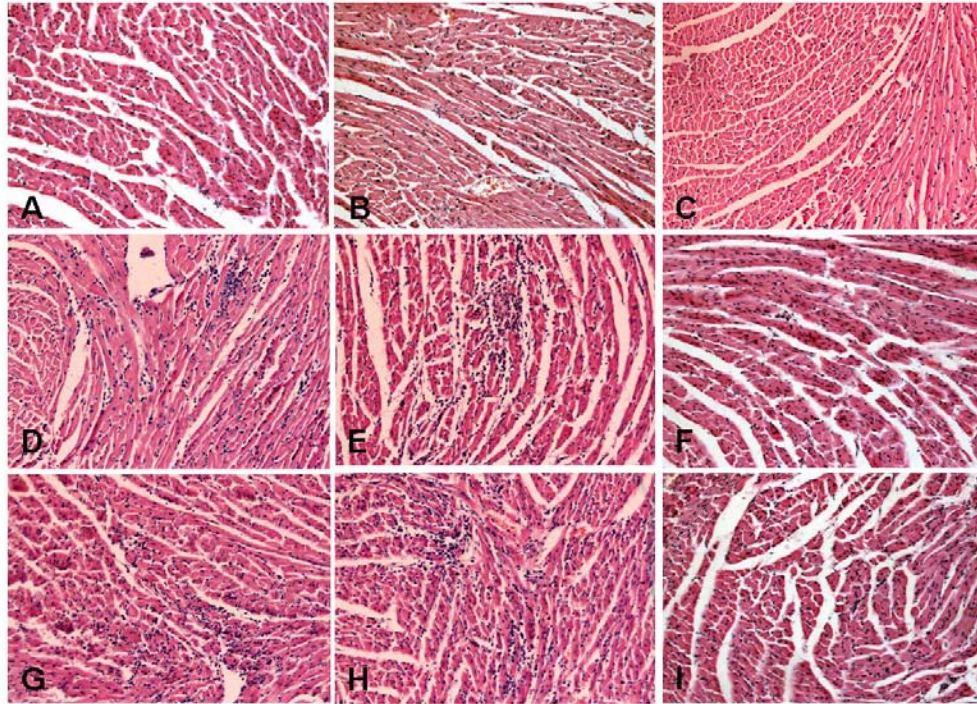


Figura 15. Infiltrados inflamatorios en corazón. Cortes histológicos de ratones control e infectados. Cortes de 5 μm , se desparafinaron, y se tiñeron con H/E por técnica convencional. A) Control; B) Ninoa 1 día pi; C) Querétaro 1 día pi; D) Ninoa 15 días pi; E) Ninoa 21 días pi; F) Ninoa 90 días pi; G) Querétaro 15 días pi; H) Querétaro 21 días pi; I) Querétaro 90 días pi. Fotos tomadas con el objetivo 20X.

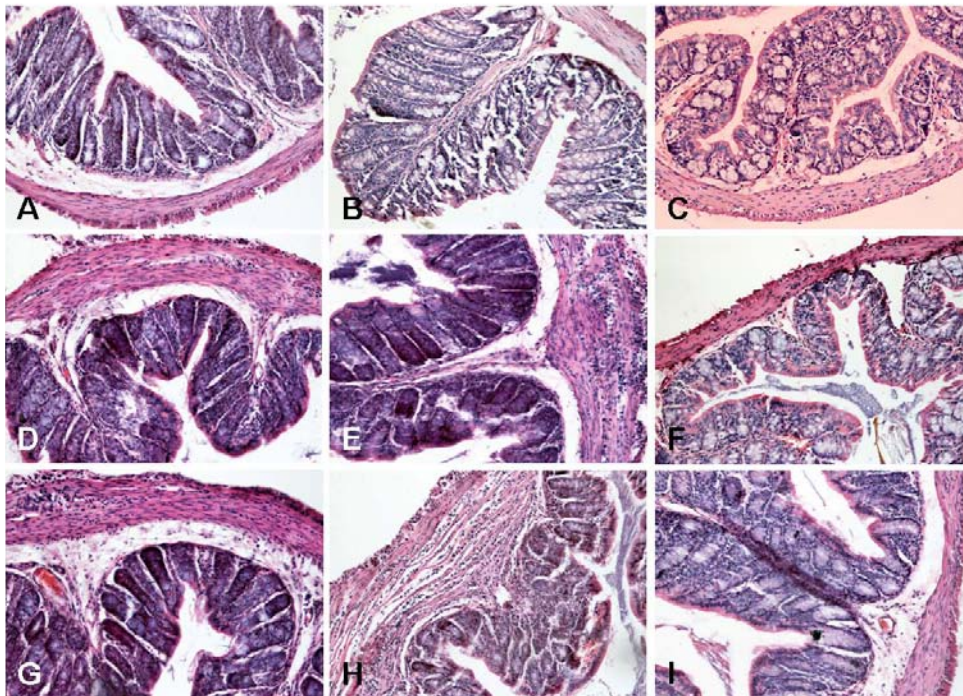


Figura 16. Infiltrados inflamatorios en colon. Cortes histológicos de ratones control e infectados. Los tejidos fueron tratados como se indica en la figura 15. A) Control; B) Ninoa 1 día pi; C) Querétaro 1 día pi; D) Ninoa 15 días pi; E) Ninoa 21 días pi; F) Ninoa 90 días pi; G) Querétaro 15 días pi; H) Querétaro 21 días pi; I) Querétaro 90 días pi. Fotos tomadas con el objetivo 20X.

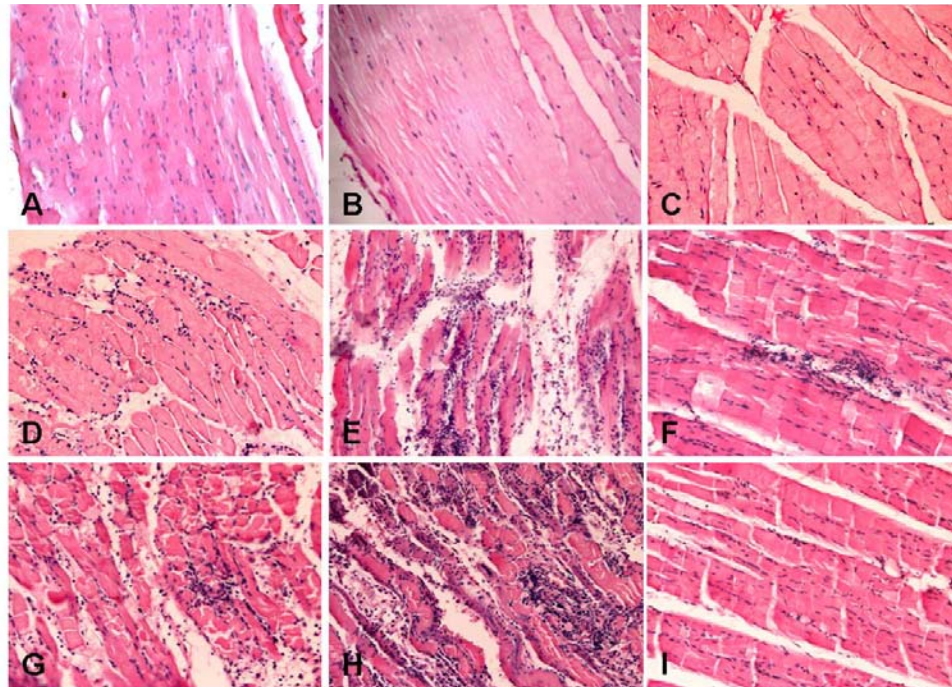


Figura 17. Infiltrados inflamatorios en músculo esquelético. Cortes histológicos de ratones control e infectados. Los tejidos fueron tratados como se indica en la figura 15. A) Control; B) Ninoa 1 días pi; C) Querétaro 1 días pi; D) Ninoa 15 días pi; E) Ninoa 21 días pi; F) Ninoa 90 días pi; G) Querétaro 15 días pi; H) Querétaro 21 días pi; I) Querétaro 90 días pi. Fotos tomadas con el objetivo 20X.

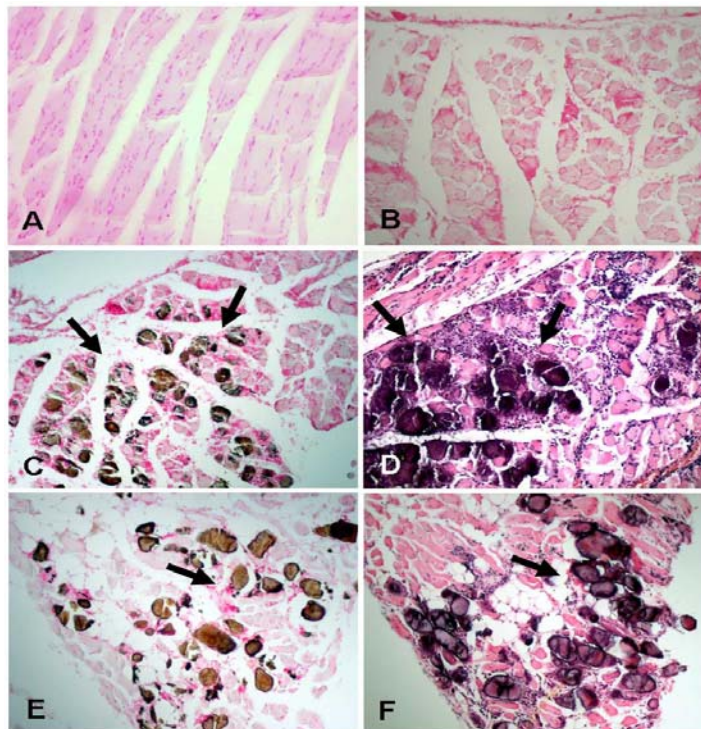


Figura 18. Zonas de calcificación (flechas) en músculo esquelético debido a infección con cepa Querétaro. Los tejidos fueron tratados como se indica en la figura 15, y teñidos con el método de von Kossa (vK) o con H/E. A) Control (vK); B) Ninoa 21 días pi (vK); C) Querétaro 21 días pi (vK); D) Querétaro 21 días pi (H/E); E) Querétaro 90 días pi (vK); F) Querétaro 90 días pi (H/E). Fotos tomadas con el objetivo 10X.

especial de von Kossa se determinó que dichas áreas correspondían a sitios de calcinosis o calcificación (Figura 18C).

Para el día 90 pi, aún existían infiltrados de células inflamatorias focales en el músculo esquelético de ratones infectados con la cepa Ninoa, pero la estructura tisular era normal. Por el contrario, aunque el infiltrado inflamatorio en este tejido en los ratones infectados con la cepa Querétaro era escaso, aún se apreciaban zonas de calcificación (Figura 18E). En las zonas adyacentes a las mismas se observaron áreas sin teñir, que podrían corresponder a células grasas pues la regeneración del músculo suele ser sustituida por tejido graso.

VII.5 MACRÓFAGOS EN LOS INFILTRADOS INFLAMATORIOS.

De las laminillas analizadas por H/E así como en los experimentos de inmunohistoquímica realizados para la detección del parásito, fue evidente que varios de los nidos de amastigotes se encontraban rodeados por células inflamatorias. Se sabe que los macrófagos son de las principales células inflamatorias involucradas en el control de este protozooario. Con la finalidad de evaluar la presencia de este tipo celular en los infiltrados inflamatorios, se estandarizó primero la técnica de inmunohistoquímica para la detección de macrófagos. Se seleccionó la dilución de trabajo 1:50 para el anticuerpo F4/80, y 1:500 para el complejo SA-PE (Figura 19).

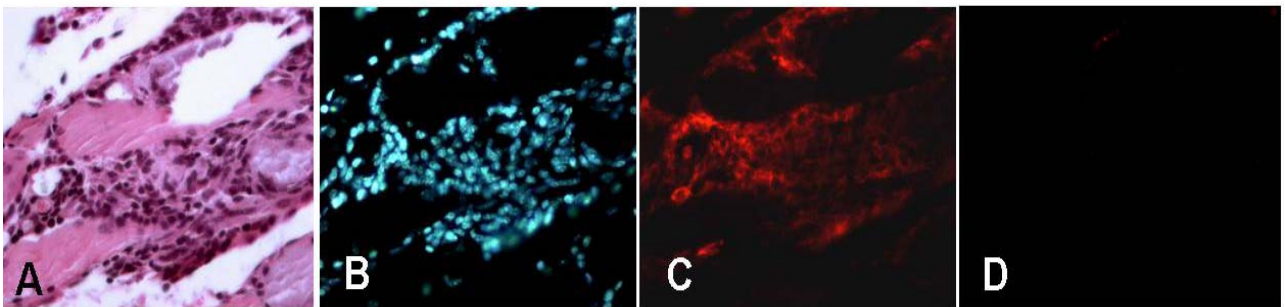


Figura 19. Inmunohistoquímica de macrófagos. Cortes de 5 μ m fueron incubadas con el anticuerpo F4/80 biotinilado o anticuerpo isotipo anti-IgGb (1:50), después con el complejo SA-PE (1:500) y contrateñidas con DAPI (1:1000). A) Tinción con H/E de músculo esquelético infectado con la cepa Querétaro, 15 días pi. B) Tinción con DAPI del mismo campo. C) Macrófagos detectados con el anticuerpo F4/80 (mismo campo). D) Control negativo. Aumento 400X.

Posteriormente, se estandarizó la técnica de inmunohistoquímica para la detección simultánea de nidos de parásitos y a los macrófagos que los rodeaban. Se decidió utilizar la incubación simultánea de anticuerpos primarios a 4°C toda la noche, y la adición también simultánea de los complejos fluorocromados, como se describe en Material y Métodos.

El primer acercamiento fue evaluar la presencia de macrófagos en las zonas de infiltración inflamatoria y su posible incremento conforme avanzaba la infección. Se observó un aumento en el número de campos con presencia de macrófagos del día 15 al día 21 pi durante la infección con ambas cepas. Esta diferencia fue significativamente mayor en la infección con la cepa Querétaro ($p < 0.05$) a los 15 y 21 días pi en el músculo esquelético, y a los 15 días pi, con respecto a la cepa Ninoá (Figura 20). También se observó que en sitios donde se apreciaba destrucción tisular, había una gran concentración de macrófagos.

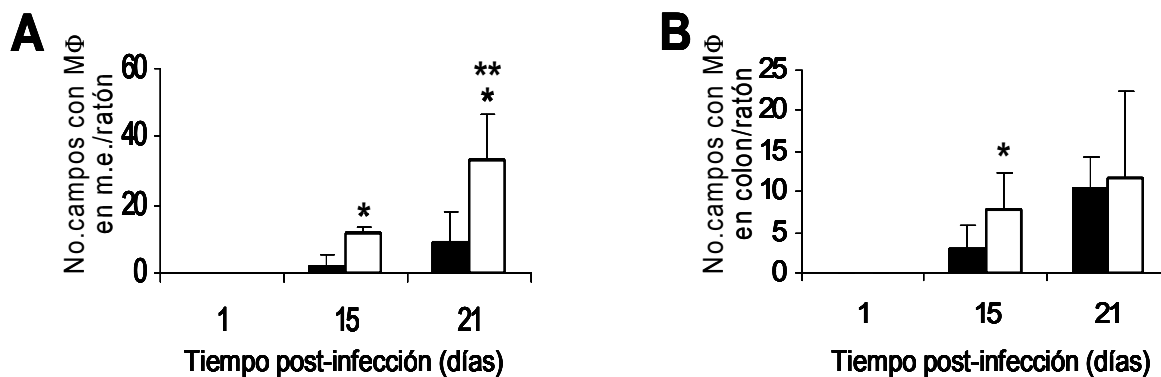


Figura 20. Presencia de macrófagos en los infiltrados inflamatorios en ratones infectados con *T. cruzi*. Se realizó el conteo de los campos en los que había macrófagos (detectados por inmunohistoquímica como se describe en la figura 19) con respecto al número total de campos contados en cada tejido. A) Músculo esquelético (m.e.). B) Colon. Las barras cerradas corresponden a lo observado durante la infección con la cepa Ninoá; las barras abiertas son las correspondientes para la infección con la cepa Querétaro. Los datos se presentan como el promedio \pm DE de 6 ratones de 2 experimentos independientes. Se usó la prueba t de Student: * entre cepas; ** entre la misma cepa en los diferentes días pi, $p < 0.05$.

Sin embargo, a pesar de observarse infiltrados inflamatorios en el tejido cardiaco, la tinción para detectar macrófagos resultó ser negativa (Figura 21).

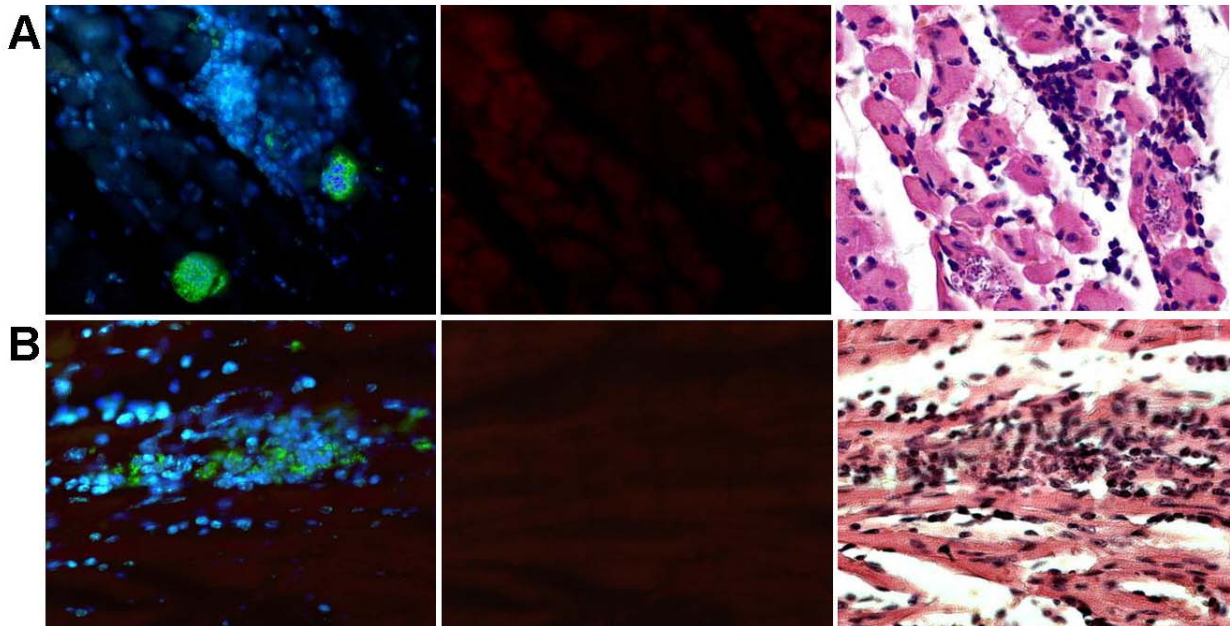


Figura 21. Ausencia de macrófagos en el tejido cardíaco. Cortes de 5 μm fueron incubados simultáneamente con el anticuerpo F4/80 (1:50) y el suero anti-*T. cruzi* (1:1000). Después se incubaron con una mezcla de anti-IgG-FITC (1:100) + SA-PE (1:500), y se contratiñeron con DAPI (1:1000). Se muestran dos campos diferentes (A y B) de ratones infectados con la cepa Querétaro a los 15 días pi. En cada ejemplo, se observa a la izquierda la sobreposición del marcaje de parásitos (en verde) con la contratiñición de núcleos con DAPI (en azul); al centro, el mismo campo, con el marcaje para macrófagos; a la derecha, la tinción con H/E de los campos anteriores. Aumento 400X.

Para corroborar que esta ausencia fuera real y no un artefacto debido a la autofluorescencia del corazón, se realizaron inmunohistoquímicas con reacción enzimática usando el complejo SA-HRP. Sin embargo, tampoco fue posible visualizar este tipo celular en dicho órgano, aunque se observó marca positiva en los demás tejidos (bazo, músculo esquelético y colon) (Figura 22).

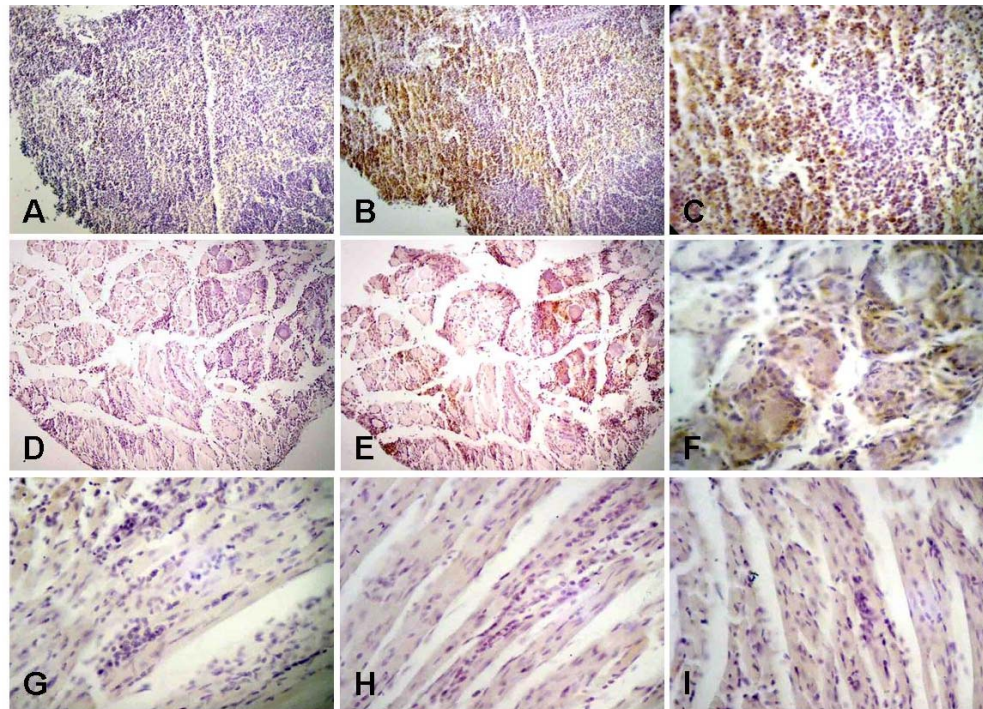


Figura 22 . Detección de macrófagos en bazo y músculo esquelético, pero no en corazón. Los cortes fueron incubados con el anticuerpo F4/80 durante toda la noche a 4°C, tratados con H₂O₂ 3%, e incubados con el complejo SA-HRP. Se reveló usando el sustrato DAB, y se contratiñó con hematoxilina de Harris 10%. A) Bazo, Qro 21 días pi, isotipo (10X). B) Bazo, Qro 21 días pi, anticuerpo F4/80, (10X). C) Bazo, Qro 21 días pi, anticuerpo F4/80, (40X). D) Músculo esquelético, Qro 21 días pi, isotipo (10X). E) Músculo esquelético, Qro 21 días pi, anticuerpo F4/80 (10X). F) Músculo esquelético, Qro 21 días pi, anticuerpo F4/80 (40X). G) Corazón, Qro 21 días pi, isotipo (40X). H, I) Corazón, Qro 21 días pi, anticuerpo F4/80 (40X).

Con los resultados obtenidos en los experimentos de inmunohistoquímica doble, los nidos detectados se clasificaron en tres tipos, en relación con el infiltrado celular y macrófagos presentes. Se observaron nidos de amastigotes que no presentaban infiltrado inflamatorio a los tiempos analizados. Otros nidos se encontraban claramente infiltrados, pero no se detectaron macrófagos presentes en esos infiltrados. El tercer tipo de nidos mostraba infiltrado celular que contenía algunos o varios macrófagos formando parte del mismo (excepto en corazón) (Figura 23).

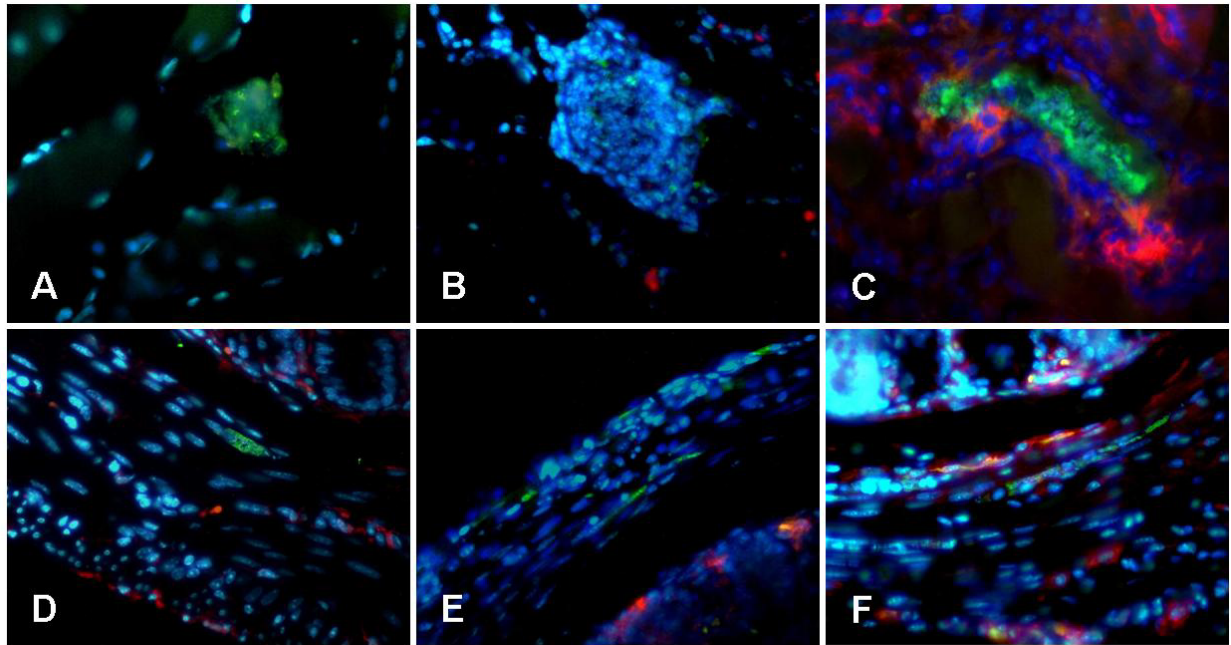


Figura 23. Clasificación de nidos según el infiltrado celular y la presencia de macrófagos. Los tejidos fueron tratados como se describe en la figura 21. Se muestran nidos sin infiltrar (A,D); nidos infiltrados sin la presencia de macrófagos (B,E), y nidos infiltrados con macrófagos formando parte del infiltrado (C,F), en cortes de músculo esquelético (A-C) y de corazón (D-F). A) Músculo esquelético, Ninoa 15 días pi. B) Músculo esquelético, Qro 21 días pi. C) Músculo esquelético, Qro 21 días pi. D) Colon, Qro 15 días pi. E) Colon, Qro 15 días pi. F) Colon, Ninoa 15 días pi. (Aumento 400X).

Con la cepa Querétaro hubo una mayor cantidad de nidos infiltrados en los tejidos de los ratones infectados que con la cepa Ninoa a los 15 días pi. Sin embargo, a los 21 días pi, el porcentaje de nidos infiltrados es similar entre ambas cepas. El número de nidos que presentaban infiltrado se incrementó del día 15 al 21 pi, particularmente con la cepa Ninoa (de 10% a 48% en corazón, de 28.6% a 61.2% en músculo esquelético, y de 40% a 79.3% en colon). En el caso de la cepa Querétaro, los porcentajes se mantienen iguales en el corazón, y se incrementan ligeramente de un tiempo pi a otro en músculo esquelético (de 78.7% a 81.1%) y en colon (de 64.2% a 73.8%).

La proporción de macrófagos en los infiltrados que rodeaban a estos nidos varió entre 20 y 55%, según el tejido y la cepa infectante. Por ejemplo, en el músculo esquelético infectado con la cepa Ninoa, 61.2% de los nidos presentaban infiltrado inflamatorio alrededor de ellos a los 21 días pi contra 81.1% con la cepa Querétaro. Sin embargo, el porcentaje de nidos infiltrados con presencia de macrófagos sólo fue ligeramente mayor en la

infección con la cepa Querétaro con respecto a la cepa Ninoa: 32.7 y 42.8%, respectivamente. En colon, el porcentaje de nidos infiltrados fue similar entre ambas cepas, pero la proporción de macrófagos resultó ser mayor en la infección con la cepa Ninoa (55.2%, contra 27% con la cepa Querétaro). Este análisis no se realizó a los 90 días pi debido a la ausencia de nidos (Figura 24).

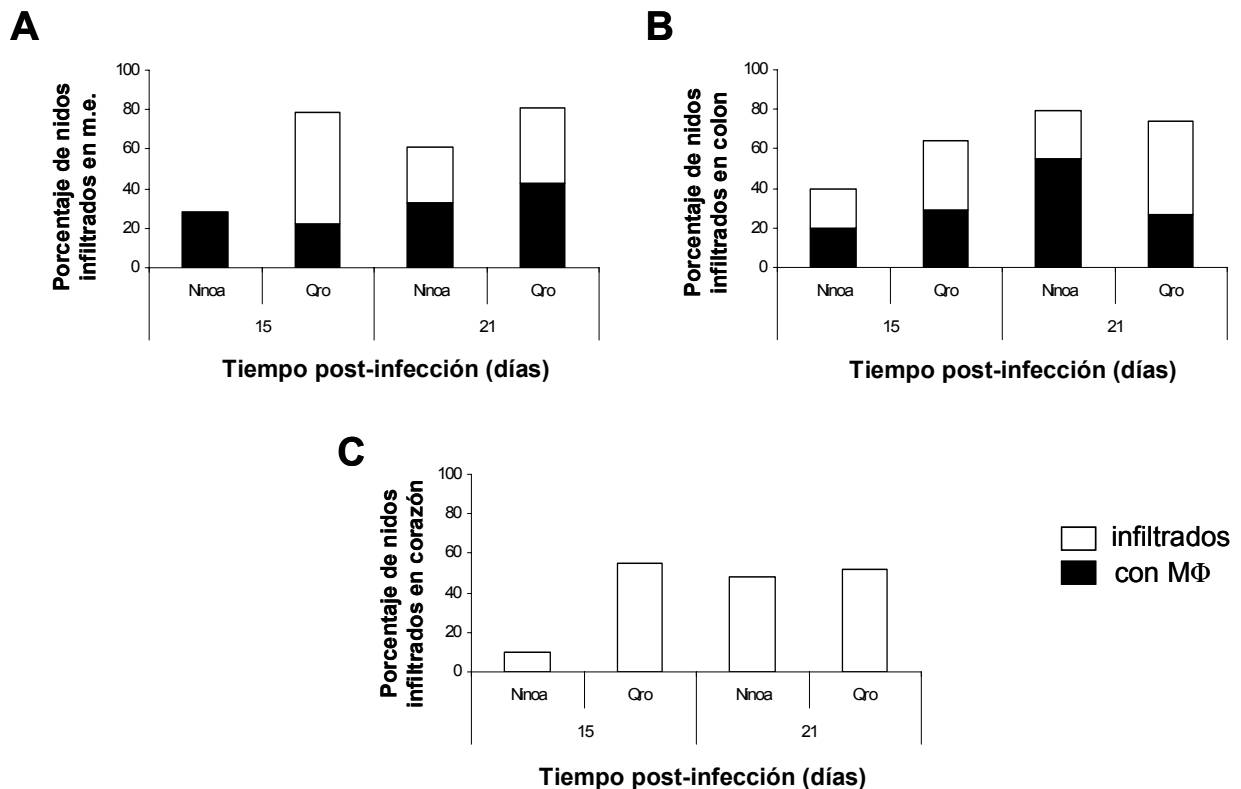


Figura 24. Porcentaje de nidos de amastigotes infiltrados en tejidos infectados con dos cepas mexicanas de *T. cruzi* a los 15 y 21 días pi. Los tejidos fueron tratados como se describe en la figura 21. De los nidos observados, se calculó el porcentaje de nidos infiltrados (barra blanca), así como el porcentaje de nidos infiltrados con presencia de macrófagos (barras negras). A) Músculo esquelético. B) Colon. C) Corazón.

Dado que se observó que no todas las células de los infiltrados inflamatorios eran macrófagos, e inclusive hubo infiltrados con ausencia total de este tipo celular, se decidió investigar la presencia de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺, también reportados como efectores importantes en el control de la infección, particularmente en corazón. Para ello, se hicieron pruebas de estandarización de la inmunohistoquímica para detectar dichos linfocitos en los infiltrados inflamatorios. A diferencia de la técnica utilizada para la detección de macrófagos, era necesario realizar un paso de desenmascaramiento de antígenos para estas células. Se

probaron diversas soluciones comúnmente utilizados en este proceso sin éxito: buffer de citratos, buffer de EDTA, tratamiento con enzimas (proteínasa K y tripsina). También se probaron las condiciones óptimas para desenmascarar estos antígenos en muestras de tejidos humanos descritas por Kim, *et al* (2004) en las que se utiliza un buffer de boratos adicionado con EDTA y NaCl. No se observaron resultados positivos.

VII.6. PCR EN TIEMPO REAL.

Se analizó mediante PCR en tiempo real (PCR-tr) si existía una expresión diferencial *in situ* de las citocinas IL-4, IL-10, IL-12, IFN- γ , TNF- α , pues su expresión podría correlacionarse con las diferencias observadas tras la infección con las cepas mexicanas de *T. cruzi*. Primero se extrajo RNA total de corazón y músculo esquelético, verificando su integridad después de ser tratados con DNasa (Figura 25). Después se llevó a cabo la transcripción reversa a cDNA como se menciona en Material y Métodos.

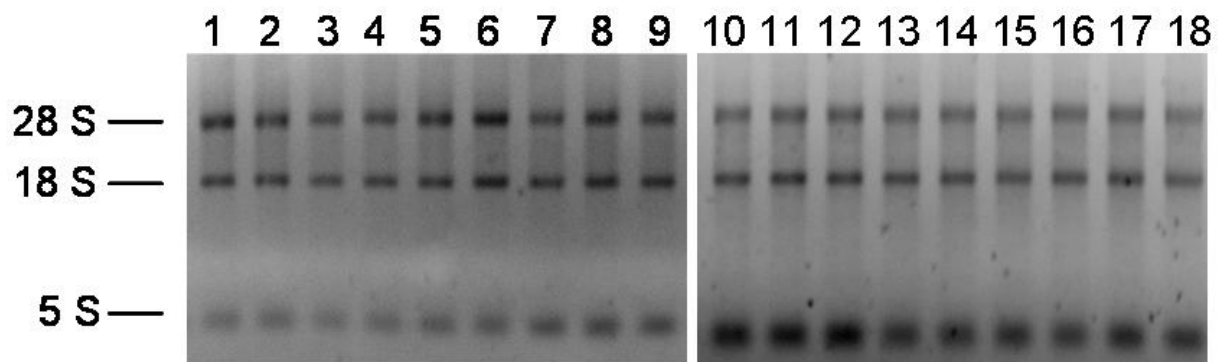


Figura 25. RNA total de corazón y músculo esquelético. El RNA total fue extraído utilizando un reactivo comercial (TRIzol) siguiendo las recomendaciones del fabricante, y 2 μ g de RNA fueron tratados con rDNasa I previo a la transcripción reversa a cDNA. Se muestran dos gels representativos con muestras de RNA tratado de corazón y músculo esquelético, teñidos con bromuro de etidio. Cada carril corresponde al RNA extraído de un animal diferente. RNA de corazón de 21 días pi de: Ninoa (1,2,3), Querétaro (4,5,6), control (7,8,9). RNA de músculo esquelético de 90 días pi de: control (10,11,12), Ninoa (13,14,15) y Querétaro (16,17,18).

Después de la estandarización de las condiciones óptimas para amplificación ($T_m=60^\circ\text{C}$, $C_f=300$ nM de primers; ver Material y Métodos) se realizaron las pruebas para

verificar que el gen constitutivo elegido (HPRT) pudiera ser usado como gen de referencia interno para nuestro modelo.

Primero se evaluó si la expresión de este gen se veía afectada por la infección. Se utilizó el cDNA de músculo esquelético y corazón de ratones control e infectados con las cepas Ninoa y Querétaro a 21 días pi. El análisis por ANOVA no mostró diferencias significativas en la expresión de este gen entre los tres grupos (control, Ninoa, Querétaro) (Figura 26).

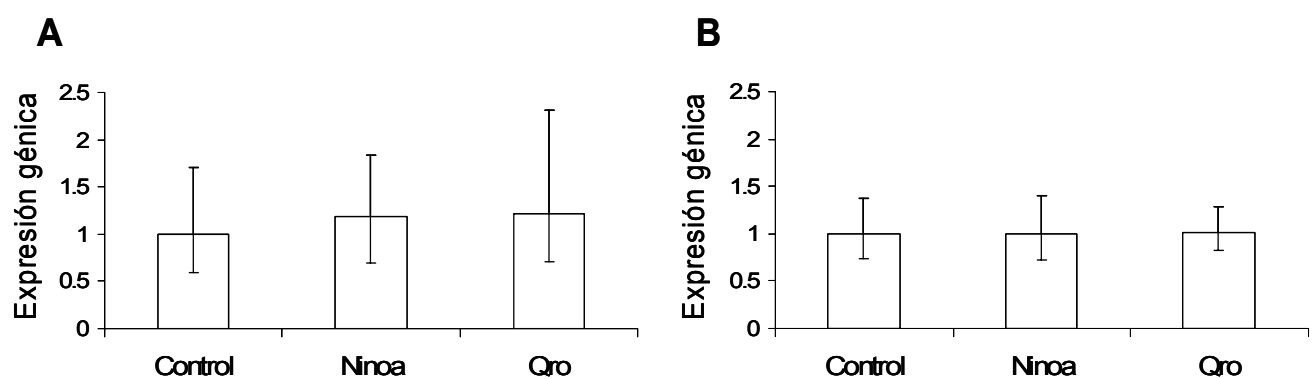


Figura 26. Efecto de la infección con *T. cruzi* sobre el gen de referencia interno, HPRT. Se extrajo RNA total (2 µg) de órganos sin infectar o con 21 días pi con las cepas Ninoa o Querétaro y se trató como se menciona en la figura 25. Cinco µL de RNA tratado se transcribieron reversamente para obtener cDNA usando oligo d(I)₆ y se amplificó el gen constitutivo HPRT por PCR-tr mediante primers específicos. Cada reacción contenía cDNA derivado de 50 ng de RNA total. Se utilizó la fórmula $2^{-\Delta Ct}$ para medir el cambio en la expresión génica debido a la infección (ver Anexo III). A) Músculo esquelético. B) Corazón. Los datos se muestran como el promedio de 6 muestras; las barras indican el rango de error. Se usó la prueba estadística de ANOVA; $p < 0.05$.

VII.6.1. Curvas de eficiencia de amplificación.

Posteriormente, se elaboraron curvas estándar a partir de diluciones seriadas de cDNA y a partir de ellas calcular las eficiencias de amplificación para cada gen. Los valores de Ct resultaron ser similares en las curvas obtenidas con el cDNA de músculo esquelético y de corazón, por lo que sus valores se promediaron para obtener las curvas de eficiencia (Figura 27).

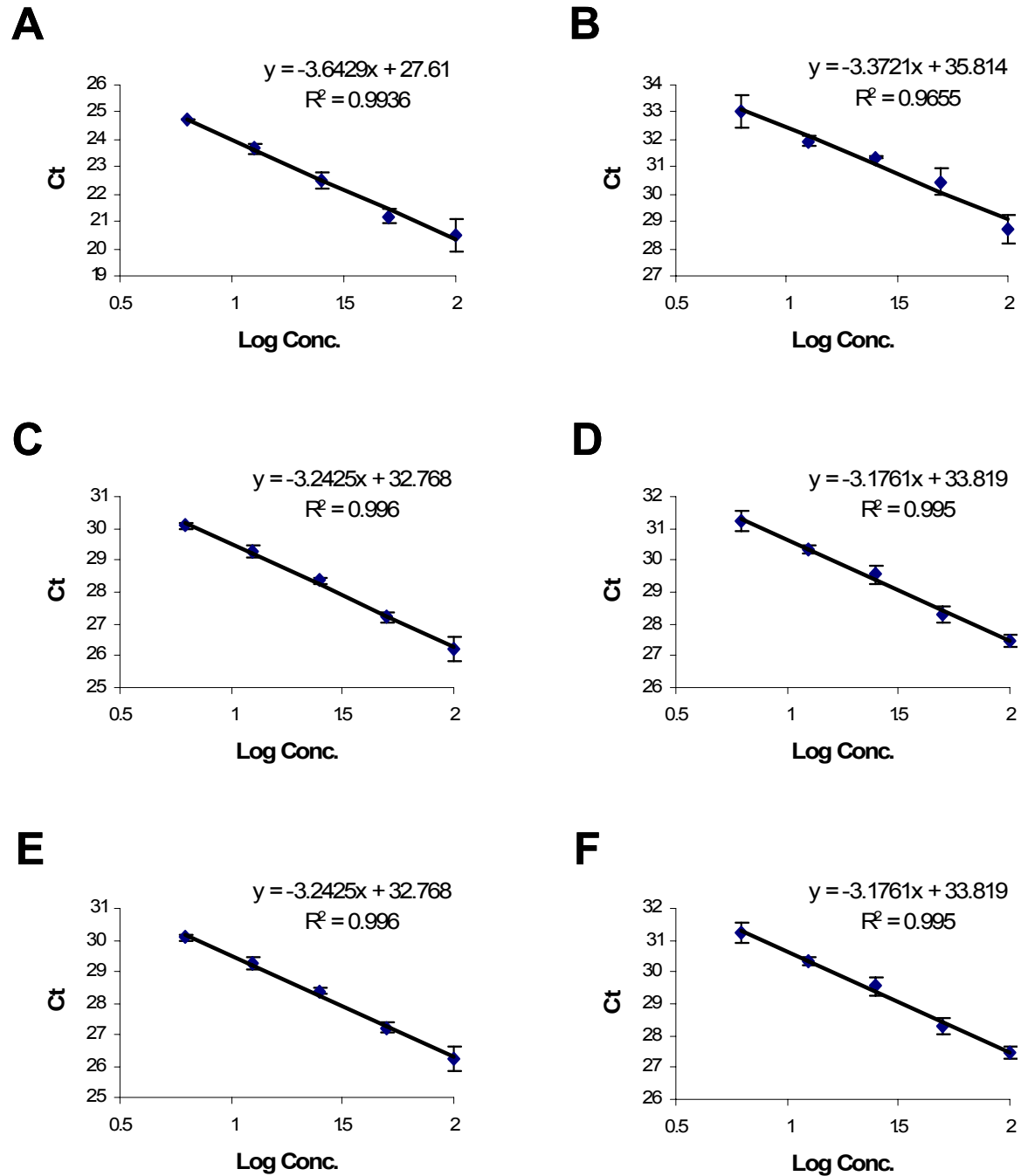


Figura 27. Eficiencias de amplificación. Se utilizó RNA extraído de corazón y músculo esquelético con 21 días pi con la cepa Querétaro. La obtención de cDNA y las reacciones de PCR se llevaron a cabo como se menciona en la figura 26, utilizando primers específicos para cada uno de los genes. En cada gráfica se muestra la ecuación de la recta correspondiente. A) HPRT. B) IL-4. C) IL-10. D) IL-12. E) IFN-g. F) TNF-a.

Las eficiencias de amplificación de cada gen fueron: HPRT= 1.8815, IL-4= 1.9795, IL-10= 2.0342, IL-12= 2.0647, IFN-g= 2.0342, TNF-a= 2.0647.

VII.6.2 Expresión de mRNA de citocinas IL-4, IL-10, IL-12, IFN- γ , TNF- α en corazón de ratones infectados.

En los corazones de los ratones infectados con cualquiera de las dos cepas resultó evidente el incremento en mRNA de las citocinas con respecto al control (Figuras 28 y 29). Los valores que se presentan son el número de veces que se expresa más el gen, con respecto al control.

La expresión de mRNA de IL-12 fue similar con ambas cepas a los 15 días pi (38.6 veces, para Ninoa y 31.6 veces, para Querétaro). Para el día 21 pi hubo un incremento significativo en los niveles de mRNA con respecto al control en la infección con ambas cepas. Dicha variación fue casi 7 y 13 veces mayor en la infección con la cepa Ninoa y con Querétaro, respectivamente, en relación con lo observado al día 15 pi. Sin embargo, en la etapa crónica de la infección, la expresión se redujo a 45.1 y 11.9 veces, para Ninoa y Querétaro, respectivamente (Figura 28A).

En el caso de la expresión de mRNA de IFN- γ , se observó un incremento notable en los niveles de expresión desde los 15 días pi (258 y 303 veces, para Ninoa y Querétaro, respectivamente). Al día 21 pi los niveles de expresión de esta citocina se vieron casi triplicados durante la infección con la cepa Ninoa, mientras que con la cepa Querétaro, el incremento fue 3.3 veces mayor, con respecto al punto experimental anterior. Al día 90 pi la expresión de mRNA se vio notablemente disminuida a niveles incluso menores que los observados a los 15 días pi, particularmente con la cepa Querétaro que se expresó 27 veces menos que durante el pico de la parasitemia (Figura 28B).

La expresión de mRNA de TNF- α mostró una tendencia similar a lo observado con las otras dos citocinas proinflamatorias. A los 15 días pi los niveles de expresión del mRNA fueron iguales entre ambas infecciones, pero significativamente mayores con respecto al control (11 veces más). Para el día 21 pi los valores se incrementaron 1.7 veces durante la infección con la cepa Ninoa, pero se triplicaron con la cepa Querétaro, con respecto a los 15 días pi. Esta diferencia resultó estadísticamente significativa con respecto al control así como

entre las dos cepas. Al día 90 pi se observó una expresión de mRNA igual a lo observado a los 15 días pi con la cepa Ninoa, pero con la cepa Querétaro sólo fue 4 veces mayor con respecto al control (Figura 28C).

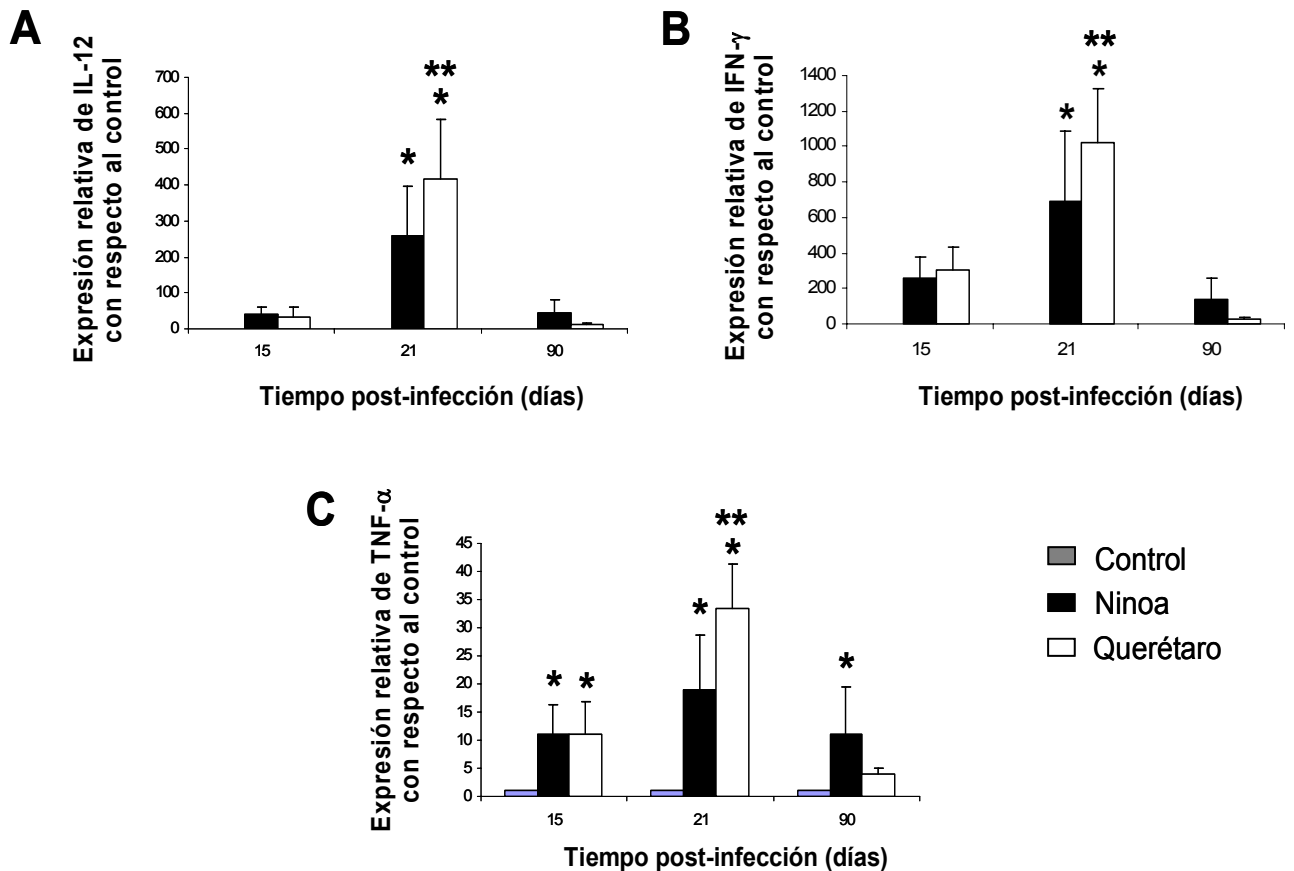


Figura 28. Expresión de mRNA de citocinas proinflamatorias en corazón de ratones infectados. La obtención de cDNA y las reacciones de PCR en tiempo real se llevaron a cabo como se menciona en la figura 26, utilizando primers específicos para cada uno de los genes. A)IL-12, B)IFN- γ , C)TNF- α . Los datos están expresados como la media \pm DE de seis ratones por grupo experimental de dos experimentos independientes realizados. Se usó la prueba estadística de ANOVA con post-test de Bonferroni: * vs control; ** entre cepas, $p < 0.05$.

Mientras que con las citocinas pro-inflamatorias se observaron niveles similares de expresión de mRNA a los 15 días pi, la expresión de mRNA de IL-10 fue mayor con la cepa Querétaro (68.4 veces) que con la cepa Ninoa (28.7 veces) con respecto al control desde ese tiempo post-infección. Al día 21 pi los niveles de expresión en la infección con la cepa Ninoa aumentaron poco más del doble, mientras que los de Querétaro se triplicaron. Además,

estos niveles fueron significativamente mayores que los observados con la cepa Ninoa (3 veces más). Para el día 90 pi, la expresión del mRNA de la citocina disminuyó notablemente en la infección con ambas cepas. Nuevamente, los niveles fueron mayores con la infección con la cepa Ninoa (30 veces más que el control) que con la cepa Querétaro, la cual disminuyó casi 29 veces con respecto al día 21 pi (sólo 7.4 veces mayor que el control) (Figura 29A).

A diferencia de lo observado con las demás citocinas, la expresión de mRNA de IL-4 fue mayor en la infección con la cepa Ninoa durante todos los puntos experimentales analizados. Al día 15 pi se observó el máximo de expresión (56.7 veces mayor que el control) y los valores con la cepa Ninoa fueron 2 veces lo observado con la cepa Querétaro. Al día 21, los niveles de expresión disminuyeron a la mitad en la infección con Ninoa; con la cepa Querétaro también hubo un decremento que fue menor con respecto a la cepa Ninoa. Los valores continuaron en descenso hasta valores de expresión similares a los del control (7 y 2.5 veces mayores que el control, con las cepas Ninoa y Querétaro, respectivamente), como pudo observarse a los 90 días pi (Figura 29B).

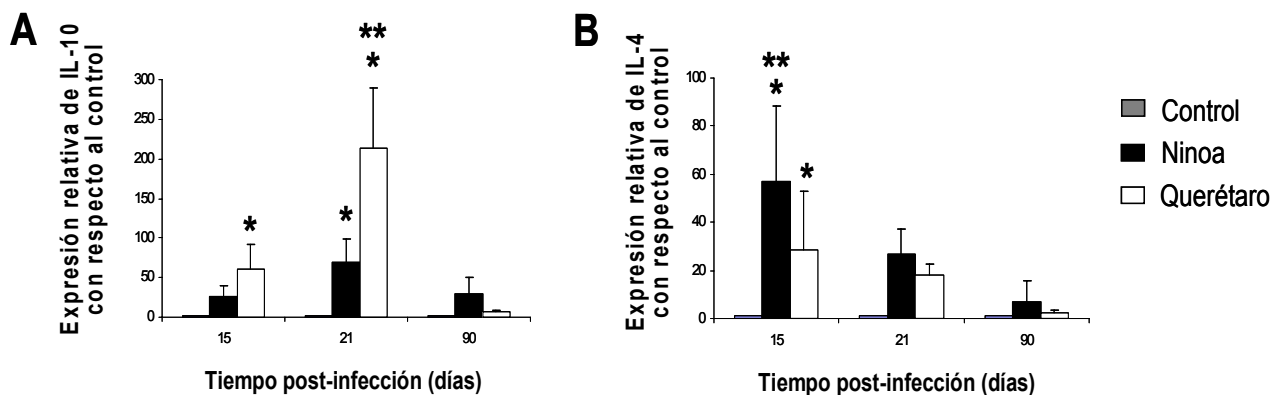


Figura 29. Expresión de mRNA de citocinas reguladoras en corazón de ratones infectados. La obtención de cDNA y las reacciones de PCR se llevaron a cabo como se menciona en la figura 26, utilizando primers específicos para cada uno de los genes. A)IL-10, B)IL-4. Los datos están expresados como la media \pm DE de tres ratones por grupo experimental. Se muestra un experimento representativo de 2 experimentos independientes realizados. Se usó la prueba estadística de ANOVA con post-test de Bonferroni: * vs control; ** entre cepas, $p < 0.05$.

VII.6.3 Expresión de mRNA de citocinas IL-4, IL-10, IL-12, IFN- γ , TNF- α en músculo esquelético de ratones infectados.

Al igual que con los tejidos cardiacos, la expresión de mRNA de las citocinas mencionadas en el músculo esquelético de los ratones control es mínima. El incremento en mRNA en el músculo esquelético de ratones infectados con cualquiera de las dos cepas fue notable (Figuras 30 y 31).

Los niveles de expresión de IL-12 fueron similares entre la infección con ambas cepas durante los tres puntos experimentales estudiados. Sólo hubo diferencia significativa con respecto al control, a los 21 días pi, donde la expresión del mRNA fue 20 y 22.5 veces mayor que el control, con las cepas Ninoa y Querétaro, respectivamente. Estos valores se redujeron a los 90 días pi a valores similares que los detectados a los 15 días pi (7.5 veces con la cepa Ninoa y 5 veces con la cepa Querétaro) (Figura 30A).

En el caso de la detección de IFN- γ , la expresión de este gen durante la infección con la cepa Ninoa fue relativamente constante durante los tres puntos experimentales analizados, con una ligera tendencia a ir incrementando (56.6, 68.2 y 78.5 veces, a los 15, 21 y 90 días pi, respectivamente). Con la cepa Querétaro se observaron niveles similares a los de la cepa Ninoa a los 15 días pi, que se incrementaron significativamente para el día 21 pi (de 71 a 125.3 veces mayor con respecto al control). Al día 90 pi, los niveles disminuyeron a valores menores que los detectados para la cepa Ninoa (Figura 30B).

Aunque la expresión de la citocina TNF- α se vio aumentada desde los 15 días pi, fue durante el pico de parasitemia (21 días pi) cuando se detectaron los niveles más altos de expresión (146 veces y 349 veces más que el control, con las cepas Ninoa y Querétaro, respectivamente). La diferencia no sólo fue estadísticamente significativa con respecto al control, sino también entre la infección con las dos cepas. Se observó una reducción dramática en los niveles de TNF- α con ambas cepas a los 90 días pi. Sin embargo, mientras los niveles con la cepa Ninoa 22.6 veces mayores que los del control, durante la infección con la cepa Querétaro la expresión del mRNA fue sólo 3 veces mayor que lo detectado en los ratones control (Figura 30C).

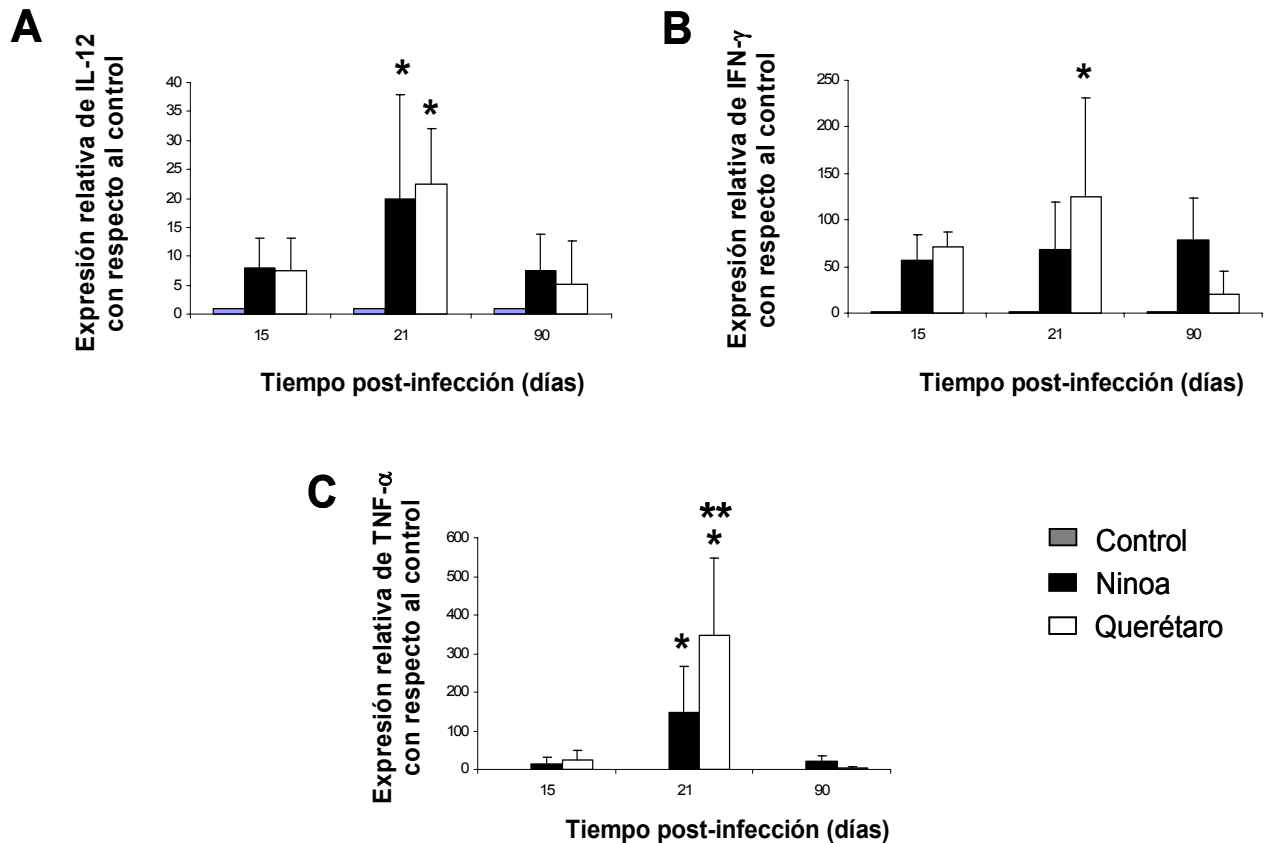


Figura 30. Expresión de mRNA de citocinas proinflamatorias en músculo esquelético de ratones infectados. La obtención de cDNA y las reacciones de PCR en tiempo real se llevaron a cabo como se menciona en la figura 26, utilizando primers específicos para cada uno de los genes. A)IL-12, B)IFN- γ , C)TNF- α . Los datos están expresados como la media \pm DE de seis ratones por grupo experimental de dos experimentos independientes realizados. Se usó la prueba estadística de ANOVA con post-test de Bonferroni: * vs control; ** entre cepas, $p < 0.05$.

La expresión de mRNA de la citocina reguladora IL-10 en músculo esquelético fue significativamente mayor en la infección con la cepa Querétaro que con la cepa Ninoia a los 21 días pi (161.5 y 470 veces mayor que el control, respectivamente). A los 15 y 90 días pi los valores de expresión resultan ser similares entre las cepas y mínimos con respecto a lo observado a los 21 días pi (Figura 31A).

La expresión de IL-4 en músculo esquelético no presentó variaciones entre las cepas, aunque si se observó un pequeño incremento de los 15 a los 21 días pi (de 5.2 a 10.6 veces con la cepa Ninoia, y de 2.6 a 10 veces con la cepa Querétaro, con respecto al control), con una ligera disminución a los 90 días pi. Sólo los valores cuantificados a los 21 días pi

resultaron estadísticamente significativos con respecto al control en la infección con ambas cepas, y a los 90 días pi solamente en la infección con la cepa Ninoa. (Figura 31B).

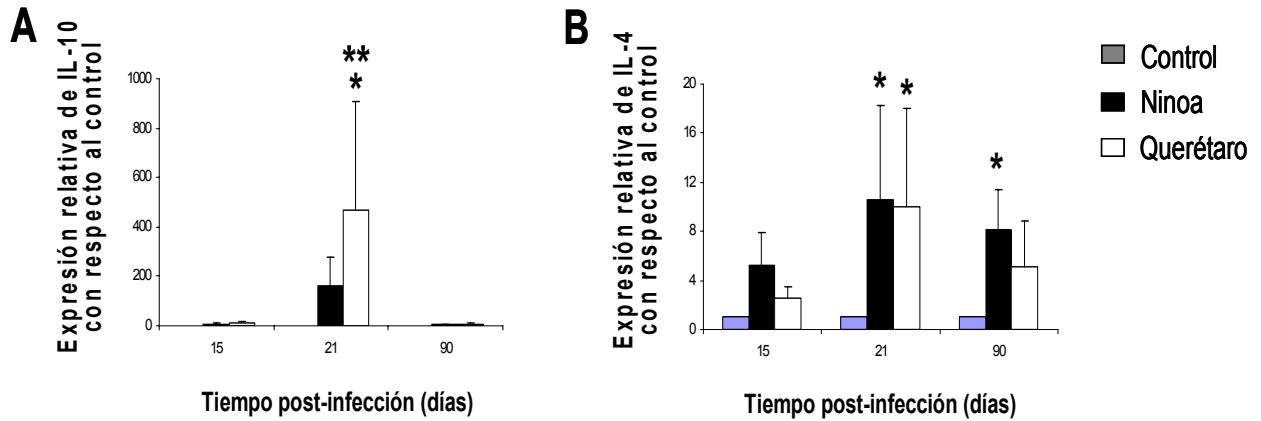


Figura 31. Expresión de mRNA de citocinas reguladoras en músculo esquelético de ratones infectados. La obtención de cDNA y las reacciones de PCR se llevaron a cabo como se menciona en la figura 26, utilizando primers específicos para cada uno de los genes. A)IL-10, B)IL-4. Los datos están expresados como la media \pm DE de tres ratones por grupo experimental. Se muestra un experimento representativo de 2 experimentos independientes realizados. Se usó la prueba estadística de ANOVA con post-test de Bonferroni: * vs control; ** entre cepas, $p < 0.05$.

IX. CONCLUSIONES

- La cepa Querétaro presenta una mayor capacidad para invadir y replicarse en las células del hospedero mamífero, induciendo con esto una enfermedad más severa que la cepa Ninoa, a pesar de que ambas cepas pertenecen al mismo grupo de *T. cruzi*.
- La participación de los macrófagos es necesaria para el control de la infección, siendo mayor su presencia en los infiltrados inflamatorios observados en la infección con la cepa Querétaro. Sin embargo, no se pudo detectar su presencia en los infiltrados localizados en corazón con ninguna de las cepas, usando el marcador F4/80.
- Es evidente el aumento en la expresión de mRNA de citocinas proinflamatorias y reguladoras con ambas cepas, demostrando su participación en el desarrollo de la enfermedad. Dentro del grupo de citocinas estudiadas, destacaron:
 - 1) TNF- α . Sólo la infección con la cepa Querétaro produjo calcificación distrófica del músculo esquelético, como posible consecuencia de un daño necrótico asociado con una inflamación *in situ* exacerbada. En esto podrían estar involucrados los elevados niveles de TNF- α detectados en este tejido.
 - 2) IL-4 e IL-10. Estas citocinas están asociadas a susceptibilidad, pero la expresión temprana de IL-4 y la disminución de IL-10 en la fase crónica en este modelo podrían contribuir con una mejor resolución de la enfermedad en los ratones infectados con la cepa Ninoa.

X. REFERENCIAS

- Abbas AK y Lichtman AH (2004). Inmunología celular y molecular. Ed. Elsevier. 5° edición. España. p.247.
- Aherrahrou Z, Axtner SB, Kackzmarek PM, Jurat A, Korff S, Doehring LC, Weichenhan D, Katus HA, Ivandic BT (2004). A locus on chromosome 7 determines dramatic up-regulation of osteopontin in dystrophic cardiac calcification in mice. *Am J Pathol* 164: 1379-1387.
- Alba Soto CD, Mirkin GA, Solana ME, González Cappa SM (2003). *Trypanosoma cruzi* infection modulates *in vivo* expression of major histocompatibility complex class II molecules on antigen-presenting cells and T-cell stimulatory activity of dendritic cells in a strain-dependent manner. *Infect Immun* 71: 1194-1199.
- Albareda MC, Laucella SA, Alvarez MG, Armenti AH, Bertochi G, Tarleton RL, Postan M (2006). *Trypanosoma cruzi* modulates the profile of memory CD8⁺ T cells in chronic Chagas' disease patients. *Int Immunol* 18: 465-471.
- Aliberti JCS, Cardoso MAG, Martins GA, Gazzinelli RT, Vieira LQ y Silva JS (1996). Interleukin-12 mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* in mice and is produced by murine macrophages in response to live trypomastigotes. *Infect Immun* 64: 1961-1967.
- Aliberti JCS, Souto JT, Marino APMP, Lannes-Vieira J, Teixeira MM, Farber J, Gazzinelli RT, Silva JS (2001). Modulation of chemokine production and inflammatory responses in interferon- γ and tumor necrosis factor-R1-deficient mice during *Trypanosoma cruzi* infection. *Am J Pathol* 158: 1433-1440.
- Andersson J, Örn A, Sunnemark D (2003). Chronic murine Chagas' disease: the impact of host and parasite genotypes. *Immunol Lett* 86: 207-212.
- Andrade SG, Rassi A, Magalhaes JB, Ferrioli Filho F y Luquetti AO (1992). Specific chemotherapy of Chagas disease. A comparison between the response in patients and experimental animal inoculated with the same strains. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 86: 624-626.
- Andrade LO, Machado CRS, Chiari E, Pena SDJ, Macedo AM (1999). Genetic variability of *Trypanosoma cruzi*: implications for the pathogenesis of Chagas disease. *Mol Biochem Parasitol* 100: 163-172.
- Andrade LO, Machado CRS, Chiari E, Pena SDJ, Macedo AM (2002). *Trypanosoma cruzi*: role of host genetic background in the differential tissue distribution of parasite clonal populations. *Exp Parasitol* 100: 269-275.
- Anonymous (1999). Recommendations from a satellite meeting. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94: 429-432.
- Antúnez MI, Cardoni RL (2000). IL-12 and IFN- γ production, and NK cell activity, in acute and chronic experimental *Trypanosoma cruzi* infections. *Immunol Lett* 71: 103-109.
- Austyn JM, and Gordon S. (1981). F4/80, a monoclonal antibody directed specifically against the mouse macrophage. *Eur J Immunol* 11: 805-815.
- Bafica A, Costa Santiago H, Goldzmid R, Ropert C, Gazzinelli RT, Sher A (2006). TLR9 and TLR2 signaling together account for MyD88-dependent control of parasitemia in *Trypanosoma cruzi* infection. *J Immunol* 177: 3515-3519.

- Barrett MP, Burchmore RJS, Stich A, Lazzari JO, Frasch AC, Cazzulo JJ, Krishna S (2003). The trypanosomiasis. *The Lancet* 362: 1469-1480.
- Bosseno MF, Barnabé C, Magallón Gastélum E, Lozano Kasten F, Ramsey J, Espinoza B, Brenière SF (2002). Predominance of *Trypanosoma cruzi* lineage I in Mexico. *J Clin Microbiol* 40: 627-632.
- Brisse S, Dujardin JC, Tibayrenc M (2000). Identification of six *Trypanosoma cruzi* lineages by sequence-characterised amplified region markers. *Mol Biochem Parasitol* 111: 95-105.
- Buscaglia CA y Di Noia JM (2003). *Trypanosoma cruzi* clonal diversity and the epidemiology of Chagas' disease. *Microbes Infect* 5: 419-427.
- Caballero ML. 1996. Respuesta inmune humoral de *Trypanosoma cruzi* en modelo murino. Tesis Prof. Facultad de Ciencias. UNAM. p: 96.
- Calabrese KS, Paradela ASRC, Zaverucha do Valle T, Tedesco RC, Silva S, Mortara RA, Gonçalves da Costa SC (2000). Study of acute chagasic mice under immunosuppressive therapy by cyclosporin A: modulation and confocal analysis of inflammatory reaction. *Immunopharmacology* 47: 1-11.
- Campbell MJ, Machin D (1993). Medical statistics. A commonsense approach. Ed. Wiley. 2ª edición. Gran Bretaña. pp: 69-85.
- CENAVECE (2006). Enfermedad de Chagas en México. En: http://www.alcuh.org/esp/pdf/ponencias_rio/mex_chagas_mendez-galvan.pdf.
- Chen SE, Gerken E, Zhang Y, Zhan M, Mohan RK, Li AS, Reid MB, Li YP (2005). Role of TNF- α signaling in regeneration of cardiotoxin-injured muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* 289: C1179-C1187.
- Coura JR, Junqueira ACV, Fernandes O, Valente ASA, Miles MA (2002). Emerging Chagas disease in Amazonian Brasil. *Trends Parasitol* 18: 171-176.
- Cummings KL, Tarleton RL (2003). Rapid quantitation of *Trypanosoma cruzi* in host tissue by real-time PCR. *Mol Biochem Parasitol* 129: 53-59.
- Cunha-Neto E, Dzau VJ, Allen PD, Stamatiou D, Benvenuti L, Higuchi ML, Koyama NS, Silva JS, Kalil J, Liew CC (2005). Cardiac gene expression profiling provides evidence for cytokinopathy as a molecular mechanism in Chagas' disease cardiomyopathy. *Am J Pathol* 167: 305-313.
- Da Silveira ABM, Lemos EM, Adad SJ, Correa-Oliveira R, Furness JB, D'Avila Reis D (2007). Megacolon in Chagas disease: a study of inflammatory cells, enteric nerves, and glial cells. *Human Pathol*. Artículo en prensa.
- De Araújo-Jorge T (1999). Biology and ultra-structure of *Trypanosoma cruzi*: a 90-years old challenge for scientists. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94 (Suppl 1): 131-134.
- De Souza W (2002). Basic cell biology of *Trypanosoma cruzi*. *Curr Pharm Des* 8: 269-285.
- Doherty TM, Asotra K, Fitzpatrick LA, Qiao JH, Wilkin DJ, Detrano RC, Dunstan CR, Shah PK, Rajavashisth TB (2003). Calcification in atherosclerosis: Bone biology and chronic inflammation at the arterial crossroads. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 11201-11206.

- Dos Santos PVA, Roffe E, Santiago HC, Torres RA, Marino APMP, Paiva CN, Silva AA, Gazzinelli RT, Lannes-Vieira J (2001). Prevalence of CD8+ $\alpha\beta$ T cells in *Trypanosoma cruzi*-elicited myocarditis is associated with acquisition of CD62L^{Low}LFA-1^{High}VLA-4^{High} activation phenotype and expression of IFN- γ -inducible adhesion and chemoattractant molecules. *Microbes Infect* 3: 971-984.
- Dutra WO, Rocha MOC, Teixeira MM (2005). The clinical immunology of human Chagas disease. *Trends Parasitol* 21: 581-587.
- Ezekowitz RAB, Austyn J, Stahl PD, Gordon S (1981). Surface properties of bacillus Calmette-Guérin-activated mouse macrophages. Reduced expression of mannose-specific endocytosis, Fc receptors, and antigen F4/80 accompanies induction of Ia. *J Exp Med* 154: 60-76.
- Fabrino DL, Leon LL, Parreira GG, Genestra M, Almeida PE, Melo RCN (2004). Peripheral blood monocytes show morphological pattern of activation and decreased nitric oxide production during acute Chagas' disease in rats. *Nitric Oxide* 11: 166-174.
- García BA, Moriyama EN y Powell JR (2001). Mitochondrial DNA sequences of triatomines (Hemiptera : Reduviidae) : phylogenetic relationships. *J Med Entomol* 38: 675-683.
- Garzon E, Genna F, Bosseno MF, Simony-La Fontaine J, Radal M, Sereno D, Mathieu-Daude F, Ouaisi A, Brenière F (2005). Differential infectivity and immunopathology by two natural clones belonging to the *Trypanosoma cruzi* I lineage. *Parasitology* 131: 109-119.
- Gazzinelli RT, Oswald IP, Hieny S, James L, Sher A (1992). The microbicidal activity of interferon- γ -treated macrophages against *Trypanosoma cruzi* involves an L-arginine-dependent, nitrogen oxide-mediated mechanism inhibitable by interleukin-10 and transforming growth factor β . *Eur J Immunol* 22: 2501-2506.
- Giachelli CM (1999). Ectopic calcification. Gathering hard facts about soft tissue mineralization. *Am J Pathol* 154: 671-675.
- Giordano R, Chammas R, Veiga SS, Colli W, Alves MJM (1994). An acidic component of the heterogeneous Tc-85 protein family from the surface of *Trypanosoma cruzi* is a laminin binding glycoprotein. *Mol Biochem Parasitol* 65: 85-94.
- Golden JM, Tarleton RL (1991). *Trypanosoma cruzi*: cytokine effects on macrophage trypanocidal activity. *Exp Parasitol* 72: 391-402.
- Golgher D, Gazzinelli RT (2004). Innate and acquired immunity in the pathogenesis of Chagas disease. *Autoimmunity* 37: 399-409.
- Guiñazú N, Pellegrini A, Giordanengo L, Aoki MP, Rivarola HW, Cano R, Rodrigues MM, Gea S (2004). Immune response to a major *Trypanosoma cruzi* antigen, cruzipain, is differentially modulated in C57BL/6 and BALB/c mice. *Microbes Infect* 6: 1250-1258.
- Guzmán-Bracho C, García-García L, Floriani-Verdugo J, Guerrero-Martínez S, Torres-Cosme M, Ramírez-Melgar C, Velasco-Castrejón O (1998). Riesgo de transmisión de *Trypanosoma cruzi* por transfusión de sangre en México. *Rev Panam Salud Pública* 4: 143-148.
- Guzmán-Bracho C (2001). Epidemiology of Chagas disease in Mexico: an update. *Trends Parasitol* 17: 372-376.
- Hamano S, Himeno K, Miyazaki Y, Ishii K, Yamanaka A, Takeda A, Zhang M, Hisaeda H, Wak TW, Yoshimura A y Yoshida H (2003). WSX-1 is required for resistance to *Trypanosoma cruzi* infection by regulation of proinflammatory cytokine production. *Immunity* 19: 657-667.

- Hardison JL, Wrightsman RA, Carpenter PM, Kuziel WA, Lane TE, Manning JE (2006). The CC chemokine receptor 5 is important in control of parasite replication and acute cardiac inflammation following infection with *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun* 74: 135-143.
- Hernández-Becerril N, Mejía AM, Ballinas-Verdugo MA, Garza-Murillo V, Manilla-Toquero E, López R, Trevethan S, Cardenas M, Reyes PA, Hirayama K, Monteón VM (2005). Blood transfusion and iatrogenic risks in Mexico city. Anti-*Trypanosoma cruzi* seroprevalence in 43,048 blood donors, evaluation of parasitemia, and electrocardiogram findings in seropositive. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 100: 111-116.
- Hiyama K, Hamano S, Nakamura T, Nomoto K, Tada I (2001). IL-4 reduces resistance of mice to *Trypanosoma cruzi* infection. *Parasitol Res* 87: 269-274.
- Hume DA, Robinson AP, Macpherson GG, Gordon S (1983). The mononuclear phagocyte system of the mouse defined by immunohistochemical localization of antigen F4/80. Relationship between macrophages, Langerhans cells, reticular cells, and dendritic cells in lymphoid and hematopoietic organs. *J Exp Med* 158: 1522-1536.
- Hunter CA, Elis-Nies LA, Slifer T, Kanaly S, Grunig G, Fort M, Rennick D, Araujo FG (1997). IL-10 is required to prevent immune hyperreactivity during infection with *Trypanosoma cruzi*. *J Immunol* 158: 3311-3316.
- Jiménez Marín AR (2005). Análisis de la respuesta de macrófagos ante la infección de dos cepas de *Trypanosoma cruzi* con distinta virulencia. Tesis que para obtener el título de Bióloga presenta. Facultad de Ciencias. UNAM. pp: 30-36.
- Kim SH, Kook MC, Song HG (2004). Optimal conditions for the retrieval of CD4 and CD8 antigens in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *J Mol Histol* 35: 403-408.
- Laucella SA, Postan M, Martin D, Hubby Fralish B, Albareda MC, Alvarez MG, Lococo B, Barbieri G, Viotti RJ, Tarleton RL (2004). Frequency of interferon- γ -producing T cells specific for *Trypanosoma cruzi* inversely correlates with disease severity in chronic human Chagas disease. *J Infect Dis* 189: 909-918.
- Leavey JK, Tarleton RL (2003). Dysfunctional CD8⁺ T cells reside in nonlymphoid tissues during chronic *Trypanosoma cruzi* infection. *J Immunol* 170: 2264-2268.
- Lima ES, Andrade ZA, Andrade SG (2001). TNF- α is expressed at sites of parasite and tissue destruction in the spleen of mice acutely infected with *Trypanosoma cruzi*. *Int J Exp Path* 82: 327-336.
- Lima VS, Mangia RHR, Carreira JC, Marchewski RS, Jansen AM (1999). *Trypanosoma cruzi*: correlation of biological aspects of the life cycle in mice and triatomines. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94: 397-402.
- Lin HH, Faunce DE, Stacey M, Terajewicz A, Nakamura T, Zhang-Hoover J, Kerley M, Mucenski ML, Gordon S, Stein-Streilein J (2005). The macrophage F4/80 receptor is required for the induction of antigen specific efferent regulatory T cells in peripheral tolerance. *J Exp Med* 201:1615-1625.
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} method. *Methods* 25: 402-408.
- López-Olmos V, Pérez-Nasser N, Piñero D, Ortega E, Hernández R y Espinoza B (1998). Biological characterization and genetic diversity of Mexican isolates of *Trypanosoma cruzi*. *Acta Trop* 69: 239-254.
- Macedo AM, Machado CR, Oliveira RP y Pena SDJ (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.

- Macedo AM, Oliveira RP y Pena SDJ (2002). Chagas disease: role of parasite genetic variation in pathogenesis. *Expert Rev Mol Med* 4: 1-16
- Machado FS, Martins GA, Aliberti JCS, Mestriner FLAC, Cunha FQ, Silva JS (2000). *Trypanosoma cruzi*-infected cardiomyocytes produce chemokines and cytokines that trigger potent nitric oxide-dependent trypanocidal activity. *Circulation* 102: 3003-3008.
- Machado FS, Koyama NS, Carregaro V, Ferreira BR, Milanezi CM, Teixeira MM, Rossi MA, Silva JS (2005). CCR5 plays a critical role in the development of myocarditis and host protection in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *J Infect Dis* 191: 627-636.
- Magalhães-Santos IF, Souza MM, Costa Lima CS, Andrade SG (2004). Infection of *Calomys callosus* (Rodentia cricetidae) with strains of different *Trypanosoma cruzi* biotopes: pathogenicity, histotropism, and fibrosis induction. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 99: 407-413.
- Maldonado IRSC, Ferreira ML, Camargos ERS, Chiari E, Machado CRS (2004). Skeletal muscle regeneration and *Trypanosoma cruzi*-induced myositis in rats. *Histol Histopathol* 19: 85-93.
- Marinho CRF, Bucci DZ, Dagli MLZ, Bastos KRB, Grisotto MG, Sardinha LR, Baptista CRGM, Penha Gonçalves C, D'Império Lima MR, Álvarez JM (2004). Pathology affects different organs in two mouse strains chronically infected by a *Trypanosoma cruzi* clone: a model for genetic studies of Chagas' disease. *Infect Immun* 72: 2350-2357.
- Marino APMP, da Silva A, dos Santos P, de Oliveira Pinto LM, Gazzinelli RT, Teixeira MM, Lannes-Vieira J (2004). Regulated on activation, normal T cell expressed and secreted (RANTES) antagonist (Met-RANTES) controls the early phase of *Trypanosoma cruzi*-elicited myocarditis. *Circulation* 110: 1443-1449.
- Martínez F, Alejandre-Aguilar R, Hortelano Moncada Y, Expinoza B (2005). Molecular taxonomic study of Chagas disease vectors from the Phyllosoma, Lenticularia, and Rubrofasciata complexes. *Am J Trop Med Hyg* 73: 321-325.
- Mejía AM, Triana O (2005). Análisis por LSSP-PCR de la variabilidad genética de *Trypanosoma cruzi* en sangre y órganos de ratones. *Biomédica* 25: 76-86.
- Miles MA, Lanhan SM, de Souza AA, Povoá DG (1980). Further enzymatic characters of *Trypanosoma cruzi* and their evaluation for strain identification. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 74: 221-242.
- Monteón VM, Furuzawa-Carballeda J, Alejandre-Aguilar R, Aranda-Fraustro A, Rosales-Encina JL, Reyes PA (1996). American Trypanosomiasis: *in situ* and generalizad features of parasitism and inflammation kinetics in a murine model. *Exp Parasitol* 83: 267-274.
- Monteón-Padilla V, Hernández-Becerril N, Ballinas-Verdugo MA, Aranda-Fraustro A, Reyes PA (2001). Persistence of *Trypanosoma cruzi* in chronic chagasic cardiopathy patients. *Arch Med Res* 32: 39-43
- Montes CL, Acosta-Rodríguez EV, Mucci J, Zuniga EI, Campetella O, Gruppi A (2006). A *Trypanosoma cruzi* antigen signals CD11b⁺ cells to secrete cytokines that promote polyclonal B cell proliferation and differentiation into antibody-secreting cells. *Eur J Immunol* 36: 1474-1485.
- Morato MJF, Colley DG, Powell MR (1998). Cytokine profiles during experimental Chagas' disease. *Braz J Med Biol Res* 31: 123-125.

- Morel C, Chiari E, Camargo E, Mattei D, Romanha A, Simpson L (1980). Strains and clones of *Trypanosoma cruzi* can be characterized by pattern of restriction endonuclease products of kinetoplastid DNA minicircles. *Proc Natl Acad Sci USA* 77: 6810-6814.
- Muller PY, Janovjak H, Miserez AR, Dobbie Z (2002). Processing of gene expression data generated by quantitative real-time RT-PCR. *Biotechniques* 32: 1372-1379.
- Murry CE, Giachelli CM, Schwartz SM, Vracko R (1994). Macrophages express osteopontin during repair of myocardial necrosis. *Am J Pathol* 145: 1450-1462.
- Nagaraju K (2001). Immunological capabilities of skeletal muscle. *Acta Physiol Scand* 171: 215-223.
- Navarro MC, de Lima AR, Askue J, Contreras VT (2003). Morphological comparison of axenic amastigogenesis of trypomastigotes and metacyclic forms of *Trypanosoma cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98: 83-91.
- Neira I, Silva FA, Cortez M, Yoshida N (2003). Involvement of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigote surface molecule gp82 in adhesion to gastric mucin and invasion of epithelial cells. *Infect Immun* 71: 557-561.
- Nylén S, Sacks D (2007). Interleukin-10 and the pathogenesis of human visceral leishmaniasis, *Trends Immunol* doi:10.1016/j.it.2007.07.004.
- Oaxaca Hernández E (2005). Expresión de quimiocinas en modelo murino de infección con cepas de *Trypanosoma cruzi* que exhiben diferentes grados de virulencia. Tesis que para obtener el título de Biólogo presenta. Facultad de Estudios Superiores, Campus Iztacala. UNAM. pp: 36-63.
- Oliveira AC, Peixoto JR, de Arruda LB, Campos MA, Gazzinelli, Golenbock DT, Akira S, Previato JO, Mendonça-Previato L, Nóbrega A, Bellio M (2004). Expression of functional TLR4 confers proinflammatory responsiveness to *Trypanosoma cruzi* glycoinositolphospholipids and higher resistance to infection with *T. cruzi*. *J Immunol* 173: 5688-5696.
- OMS (WHO) Expert Committee on the Control of Chagas Disease (2002: Brasilia, Brazil). Control of Chagas disease: second report of the WHO expert committee. pp: 1-12.
- Ouaissi A, Guilvard E, Delneste Y, Caron G, Magistrelli G, Herbault N, Thieblemont N, Jeannin PP (2002). The *Trypanosoma cruzi* Tc52-released protein induces human dendritic cell maturation, signals via Toll-like receptor 2, and confers protection against lethal infection. *J Immunol* 168: 6366-6374.
- Pacheco D (2000). Evaluación de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) como prueba de diagnóstico de la enfermedad de Chagas en pacientes mexicanos. Tesis que para obtener el título de Licenciada en Biología presenta. Universidad Simón Bolívar. pp: 30-31
- Pérez Brandán C, Padilla AM, Diosque P, Basombrío MA (2006). *Trypanosoma cruzi*: infectivity modulation of a clone alter passages through different hosts. *Exp Parasitol* 114: 89-93.
- Petray P, Corral R, Cabeza Meckert P, Laguens R (2002). Role of macrophage inflammatory protein-1 α (MIP-1 α) in macrophage homing in the spleen and heart pathology during experimental infection with *Trypanosoma cruzi*. *Acta Trop* 83: 205-211.
- Prata A (2001). Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *Lancet Infect Dis* 1: 92-100.

- Rangel-Flores H, Sánchez B, Mendoza-Duarte J, Barnabé C, Breniere FS, Ramos C, Espinoza B (2001). Serologic and parasitologic demonstration of *Trypanosoma cruzi* infections in an urban area of central Mexico: correlation with electrocardiographic alterations. *Am J Trop Med Hyg*; 65: 887-895.
- Rico Ramírez D (2004). Respuesta inmune celular contra cepas mexicanas de *Trypanosoma cruzi*: papel de las citocinas. Tesis que para obtener el título de Biólogo presenta. Facultad de Ciencias. UNAM.
- Risso MG, Garbarino GB, Mocetti E, Campetella O, González Cappa SM, Buscaglia CA, Leguizamón MS (2004). Differential expression of a virulence factor, the *trans*-sialidase, by the main *Trypanosoma cruzi* phylogenetic lineages. *J Infect Dis* 189: 2250-2259.
- Sánchez-Guillén MC, Bernabé C, Tibayrenc M, Zavala-Castro J, Totolhua JL, Méndez-López J, González-Mejía ME, Torres-Rasgado E, López-Colombo A, Pérez-Fuentes R (2006). *Trypanosoma cruzi* strains isolated from human, vector, and animal reservoir in the same endemic region in Mexico and typed as *T. cruzi* I, discrete typing unit 1 exhibit considerable biological diversity. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 101: 585-590.
- Savino W, Villa-Verde DMS, Mendes-da-Cruz DA, Silva-Monteiro E, Perez AR, Aoki MP, Bottasso O, Guiñazú N, Silva-Barbosa SD, Gea S (2007). Cytokines and cell adhesion receptors in the regulation of immunity to *Trypanosoma cruzi*. *Cytokine Growth Factor Rev* 18: 107-124.
- Scharfstein J, Morrot A (1999). A role for extracellular amastigotes in the immunopathology of Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94: 51-63.
- Sheehan D, Hrapchak B (1980). Theory and Practice of Histotechnology, 2nd Ed, Battelle Press, Ohil. E.U.A. pp: 226-227.
- Sierra-Johnson J, Olivera-Mar A, Monteón-Padilla VM, Reyes PA, Vallejo M (2005). Epidemiological and clinical outlook of chronic Chagas' heart disease in Mexico. *Rev Saude Publica* 39: 754-760.
- Silva JS, Morrissey PJ, Grabstein KH, Mohler KM, Anderson D, Reed SG (1992). Interleukin 10 and interferon γ regulation of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *J Exp Med* 175: 169-174.
- Silva JS, Vespa GNR, Cardoso MAG, Aliberti JCS, Cunha FQ (1995). Tumor necrosis factor alpha mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* infection in mice by inducing nitric oxide products in infected gamma interferon-activated macrophages. *Infect Immun* 63: 4862-4867.
- Soares MBP, Silva-Mota KN, Lima RS, Bellintani MC, Pontes-de-Carvalho L, Riebeiro-dos-Santos R (2001). Modulation of chagasic cardiomyopathy by interleukin-4. Dissociation between Inflammation and Tissue Parasitism. *Am J Pathol* 159: 703-709.
- Sosa S. (2003). Respuesta inmune celular contra cepas mexicanas de *Trypanosoma cruzi*. Tesis que para obtener el título de Biólogo presenta. Facultad de Ciencias. UNAM. pp: 7, 23.
- Sosa-Jurado F, Mazariego-Aranda M, Hernández-Becerril N, Garza-Murillo V, Cárdenas M, Reyes PA, Hirayama K, Monteón VM (2003). Electrocardiographic findings in Mexican chagasic subjects living in high and low endemic regions of *Trypanosoma cruzi* infection. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98: 605-610.
- Steindel M, Dias Neto E, Menezes C, Romanha A, Simpson AJG (1993). Random amplified polymorphic DNA analysis of *Trypanosoma cruzi* strains. *Mol Biochem Parasitol* 60: 71-80.
- Stempin CC, Tanos TB, Coso OA, Cerbán FM (2004). Arginase induction promotes *Trypanosoma cruzi* intracellular replication in Cruzipain-treated J774 cells through the activation of multiple signaling pathways. *Eur J Immunol* 34: 200-209.

- Suckow MA, Weichbrod RH, Douglas FA (2001). Management of laboratory animals care and use programs. CRC Press. Washington, E.U.A. p: 147.
- Sun J, Tarleton RL (1993). Predominance of CD8⁺ T lymphocytes in the inflammatory lesions of mice with acute *Trypanosoma cruzi* infection. *Am J Trop Med Hyg* 48: 161-169.
- Talvani A, Ribeiro CS, Aliberti JCS, Michailowsky V, Santos PVA, Murta SMF, Romanha AJ, Almeida IC, Farber J, Lannes-Vieira J, Silva JS, Gazzinelli RT (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 Infect* 2: 851-866.
- Takeda K, Kaisho T, Akira S (2003). Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol* 21: 335-376.
- Tarleton RL, Sun J, Zhang L, Postan M (1994). Depletion of T-cell subpopulations results in exacerbation of myocarditis and parasitism in experimental Chagas' disease. *Infect Immun* 62: 1820-1829
- Tarleton RL (2003). Chagas disease: a role for autoimmunity? *Trends Parasitol* 19: 447-451.
- Teixeira MM, Gazzinelli RT, Silva JS (2002). Chemokines, inflammation and *Trypanosoma cruzi* infection. *TRENDS Parasitol* 18(6): 262-265.
- Thomson RG (1984), Anatomía patológica general veterinaria. Ed. Acribia S.A. España. pp: 46-87.
- Tyler KM, Engman DM (2001). The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. *Int J Parasitol* 31: 472-481.
- Vago AR, Andrade LO, Leite AA, d'Ávila Reis D, Macedo AM, Adad SJ, Tostes Jr S, Moreira MCV, Brasileiro Filho G, Pena SDJ (2000). Genetic characterization of *Trypanosoma cruzi* directly from tissues of patients with chronic Chagas disease. *Am J Pathol* 156: 1805-1809.
- Van Overtvelt L, Andrieu M, Verhasselt V, Connan F, Choppin J, Vercruyssen V, Goldman M, Hosmalin A, Vray B (2002). *Trypanosoma cruzi* down-regulates lipopolysaccharide-induced MHC class I on human dendritic cells and impairs antigen presentation to specific CD8⁺ T lymphocytes. *Int Immunol* 14: 1135-1144.
- Velasco CO (1991). La enfermedad de Chagas: una revisión suscita y parcial de lo que ocurre en México y el Mundo. I.N.D.R.E. México: 3-6.
- Vera-Cruz JM, Magallón-Gastelum E, Grijalva G, Rincón AR, Ramos-García C, Armendáriz-Borunda J (2003). Molecular diagnosis of Chagas' disease and use of an animal model to study parasite tropism. *Parasitol Res* 89: 480-486.
- Whiteland JL, Nicholls SM, Shimeld C, Easty DL, Williams NA, Hill TJ (1995). Immunohistochemical detection of T-cell subsets and other leukocytes in paraffin-embedded rat and mouse tissues with monoclonal antibodies. *J Histochem Cytochem* 43: 313-320.
- Yamauchi LM, Aliberti JC, Baruffi MD, Portela RW, Rossi MA, Gazzinelli RT, Mineo JR, Silva JS (2006). The binding of CCL2 to the surface of *Trypanosoma cruzi* induces chemo-attraction and morphogenesis. *Microbes Infect* 9: 111-118.
- Yoshida N (2006). Molecular basis of mammalian cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *An Acad Bras Cienc* 78: 87-111.

Páginas de internet consultadas:

www.who.int/int/ctd/chagas/geo.htm

www.iqb.es/icd10/k23.1.htm

www.ovpr.uga.edu/researchnews/winter2000/immunity.html

www.itg.be/itg/DistanceLearning/LectureNotesVandenEndenE/04_Chagas_diseasep8.htm

www.biof.ufrj.br/laminario.html

www.uga.edu/cellbio/tarleton.html

www.uta.edu/chagas/html/biolTru.html

www.dpd.cdc.gov/dpdx

ANEXO I. REACTIVOS

Reactivos usados para Histología e Inmunohistoquímica

PBS 10X

Pesar:	80 g	NaCl	(Sigma-Aldrich, MO, EUA; No. Cat. S-9888)
	2 g	KCl	(JT Baker, México; No. Cat. 3040)
	14.4 g	Na ₂ HPO ₄	(JT Baker, México; No. Cat. 3828)
	2.4 g	KH ₂ PO ₄	(JT Baker, México; No. Cat. 3246)

Disolver en 800 mL de agua bidestilada.

Ajustar pH a 7.2-7.4

Aforar a 1 L

Esterilizar

PARAFORMALDEHÍDO 4%

(Sigma-Aldrich, MO, EUA; No. Cat. P6148)

Pesar 8 g de p-formaldehído

Disolver en 150 mL de PBS, calentando hasta 65-70°C, con agitación constante, en la campana de extracción (no dejar que la temperatura sobrepase los 70°C).

Adicionar gota a gota NaOH 5M hasta que se disuelva completamente el p-formaldehído (cuando ya se vea clara la solución).

Dejar enfriar, ajustar pH a 7.2-7.4 y aforar a 200 mL.

Hacer alícuotas de 30 y 10 mL. Congelarlas.

PARAPLAST EMBEDDING MEDIA, Paraplast X-tra

(Sigma-Aldrich, MO, EUA; No. Cat. P3808)

XILOL

(J.T. Baker, México; No. Cat. 1330-20-7)

ETANOL ABSOLUTO

(Merck, Darmstadt, Alemania; No. Cat. K34118383)

- o 96%: Medir 96 mL de EtOH absoluto y completar a 100 mL con agua bidestilada
- o 80%: Medir 80 mL de EtOH absoluto y completar a 100 mL con agua bidestilada
- o 70%: Medir 70 mL de EtOH absoluto y completar a 100 mL con agua bidestilada
- o 50%: Medir 50 mL de EtOH absoluto y completar a 100 mL con agua bidestilada

TESPA (3-aminopropiltriethoxi-silano) 2%

(TESPA: Sigma-Aldrich, MO, EUA; No. Cat. A-3648)

(Acetona: J.T. Baker, México; No. Cat. 9006-02)

Mezclar 2.041 mL de TESPA con 198 mL de acetona. Preparar en el momento y almacenarlo en un frasco ámbar a 4°C mientras se usa durante la silanización.

HEMATOXILINA DE HARRIS

(Sigma Diagnostics, St. Louis, MO, EUA; No. Cat. HHS-16)

Se usa el preparado comercial: 7.5 g/L

EOSINA 0.5%

(Merck, Darmstadt, Alemania; No. Cat. 1345)

Disolver 0.5 g de eosina en 100 mL de EtOH 90%

ALCOHOL ÁCIDO

(Alcohol: Merck, Darmstadt, Alemania; No. Cat. K34118383)

(Ácido clorhídrico fumante 37%: Merck, Darmstadt, Alemania; No. Cat. 32970717)

Disolver 5 mL de HCl concentrado en 1 L de EtOH 70% (0.5 mL HCl/100 mL EtOH 70%)

NITRATO DE PLATA ACUOSA 1%

Pesar 1 g de nitrato de plata y disolverlo en 100 mL de agua destilada

TIOSULFATO DE SODIO 5%

Pesar 1 g de tiosulfato de sodio y disolverlo en 100 mL de agua destilada

ROJO NÚCLEO-RESISTENTE (NUCLEAR FAST RED) 0.1%

Rojo núcleo resistente (de Kernechtrot) 0.1 g

Sulfato de aluminio 5 g

Agua destilada 100 mL

Disolver el sulfato de aluminio en el agua destilada, mediante calentamiento (solución de sulfato de aluminio 5%). Agregar el rojo núcleo-resistente, llevar a hervor lentamente. Enfriar, filtrar y añadir un grano de timol como preservativo.

REACTIVO GEL/MOUNT

(Biomedica Corp., Foster City, CA, EUA; No. Cat.17985-10)

BSA 2%/PBS

Disolver 2 g de BSA en 100 mL de PBS 1X pH 7.2-7.4

Esterilizar por filtración

ANTICUERPOS PRIMARIOS:

- **F4/80** (Caltag Laboratories, CA, EUA)
- **Anticuerpo isotipo IgG2b** (Caltag Laboratories, CA, EUA)
- **Suero policlonal anti-*T. cruzi*** (producido en conejos, en el laboratorio)
- **Suero preimmune** (obtenido de conejos previos a inmunizar, en el laboratorio)

ANTICUERPOS SECUNDARIOS Y CONJUGADOS:

- **anti-IgG-fluoresceína de conejo (anti-IgG-FITC)** (Sigma Immuno Chemicals, MO, EUA; No. Cat. F0382)
- **Conjugado estreptavidina-ficoeritrina (SP-PE)** (Caltag Laboratories, CA, EUA; No. Cat. SA1004-1)
- **Conjugado estreptavidina-peroxidasa (SP-HRP)** (Amersham Biosciences; No. Cat. RPN 1231 V)

DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol, lactato)

(Molecular Probes, Eugene, Oregon, EUA; No. Cat. D-3571)

Disolver 10 mg (liofilizado) en 2 mL de agua bidestilada, filtrada y estéril (5 mg/mL, 10.9 mM, stock).

Hacer alícuotas.

Congelar.

Utilizar a una dilución 1:1000

H₂O₂ 30%

(Sigma-Aldrich, MO, EUA; No. Cat. UN2014)

DAB (3,3'-diaminobenzidina tetrahidrocloruro) (solución de trabajo)

(Sigma-Aldrich, MO, EUA; No. Cat. D5637)

Pesar 1 mg de DAB y disolver en 2 mL de PBS perfectamente.
Agregar 1 μ L de H₂O₂ 30%. Mezclar muy bien y usar inmediatamente.
Para desechar, agregar hipoclorito de sodio 30%.

Reactivos usados para la extracción de RNA

DEPC (dietilpirocarbonato)

(Sigma-Aldrich, MO, EUA; No. Cat. D-5758)

SOLUCIÓN DEPC 0.1%

Disolver 1 mL de DEPC por cada litro de agua ultrapura milli-Q que se desee preparar.

NOTA: Esta solución se utiliza para inhibir la actividad de las RNAsas. Todo material que se utilice para la extracción de RNA debe ser tratado con esta solución, durante al menos 2 h. Después se esteriliza en autoclave para inactivar el DEPC.

H₂O/DEPC 0.1%

Agua tratada con DEPC al 1% durante al menos 2 h, y esterilizada por autoclave.
Se utiliza para disolver el RNA extraído.

H₂O/DEPC para PCR

Esterilizar un frasco de vidrio de 100 mL.

Preparar 50 mL de H₂O/DEPC 0.1% (dejar reposar al menos 3 h).

Filtrar el H₂O/DEPC 0.1% en el frasco estéril (se puede usar una pirinola de filtración).

Esterilizar en autoclave el frasco con el H₂O/DEPC 0.1% filtrada (para inactivar el DEPC).

Alicuotar aproximadamente 1 mL de H₂O/DEPC 0.1% en tubos eppendorf libres de RNAsas, DNAsas y pirógenos.

Tratar con luz UV, durante 15 min, dejando los tubos destapados.

Tapar los tubos rápidamente (usar guantes y cuidar de no tocar la parte interna de las capuchas).

Almacenar a -20°C.

NOTA: de preferencia, realizar los pasos 3, 5-7 en una campana de cultivo, con el flujo encendido.

TRIzol® Reagent

(Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA; No. Cat. 151596-026)

ISOPROPANOL

(Sigma-Aldrich, MO, EUA; No. Cat. S-9888)

ETANOL 75% (Ethanol, absolute, 200 proof, for molecular biology)

(Sigma-Aldrich, MO, EUA; No. Cat. E7023)

Tratar una probeta de vidrio con solución H₂O DEPC 0.1% mínimo durante 2 horas, y esterilizar por autoclave.

Medir 75 mL de EtOH grado Biología Molecular, y aforar a 100 mL con H₂O tratada con DEPC 0.1%

*Reactivos usados en electroforesis en geles de agarosa***AGAROSA (gel de agarosa 1%)**

(Gibco BRL; No. Cat. 9012-36-6)

Pesar 1 g de agarosa y disolverlo en 100 mL de buffer TAE 0.5X mediante calentamiento en parrilla o en horno de microondas hasta que no se observen grumos o granos de agarosa (mover ocasionalmente el matraz).

Dejar enfriar un poco y verter en la base para geles. Utilizar hasta que haya solidificado por completo.

TAE 50X

Pesar:

242 g	Tris base	(Gibco BRL; No. Cat. 15504-020)
57.1 mL	Ácido acético glacial	(JT Baker, México; No. Cat. 9507-05)
100 mL	EDTA 0.5 M pH 8	(Sigma, MO, EUA; No. Cat. E-7889)

Aforar a 1L con agua milli-Q

TAE 0.5X

Tomar 10 mL de TAE 50X y llevarlo a 1L con agua milli-Q (990 mL)

AZUL DE BROMOFENOL 6X (buffer de carga)

Preparar una solución 0.25% de azul de bromofenol y 40% de sacarosa en agua bidestilada.

Almacenar a 4°C.

MARCADORES MOLECULARES DE 100 pb (100 ng/5 µL)

(Gibco BRL, No. Cat. 15628-019)

Usar 5-7 µL para geles pequeños.

*Reactivos usados para transcripción reversa y PCR en tiempo real***Kit DNA-free® (DNase Treatment and Removal Reagents)**

(Ambion, Inc.,EUA; No. Cat. 1906)

Kit TaqMan® Reverse Transcription Reagents

(For Applied Biosystems by Roche, New Jersey, EUA; No. Cat. N808-0234)

Kit SYBR® Green PCR

(Applied Biosystems, Warrington, Reino Unido; No. Cat. 4309155)

PRIMERS (ver secuencias y nombres en Material y Métodos)

(Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA)

ANEXO II. TÉCNICAS CONVENCIONALES

OBTENCIÓN DE ÓRGANOS PARA EXTRACCIÓN DE RNA

MATERIAL

Pinzas, tijeras, base para disección.
Cámara de éter, éter
Agujas (para clavar el ratón a la base de disección)
Tubos eppendorf 1.5 mL libres de RNAsas
Gradilla(s)
Hielo seco
Jeringas 3 mL (opcionales)
Cajitas de Petri (opcionales)
Sanitas, gasas
Envase con cloro

NOTA: limpiar perfectamente el sitio donde se realizará la disección antes y después de la misma.

PRECAUCIÓN: si se trabaja con ratones infectados, utilizar bata, doble guante, y careta.

PROCEDIMIENTO

1. Anestesiarse al ratón con éter, hasta que casi muera.
2. Bañarlo con alcohol 70%.
3. Colocarlo en la cama de disección (tabla de unicel forrada con aluminio) y clavarlo a ella usando agujas (las agujas de jeringas limpias son útiles), una en cada pata.
4. Obtener toda la sangre del corazón usando una jeringa de 3 mL y colocarla en un eppendorf de 1.5 mL (puede omitirse este paso)
5. Sacrificarlo por dislocación cervical (si no ha muerto aún).
6. Realizar un corte en la base del abdomen, separar la piel del ratón (enjuagar con agua DEPC 0.1% si es necesario para eliminar restos de pelo) y retirar la membrana del peritoneo.
7. Extraer los órganos deseados lo más rápido posible.^a
8. Colocar cada órgano o fragmento de tejido en un tubo eppendorf de 2 mL libre de RNAsas, perfectamente etiquetado.^b
9. Congelar inmediatamente en hielo seco.^c
10. Rociar al ratón con hipoclorito de sodio 30% y desecharlo en una bolsa para material biológico.

NOTAS:

- a. Músculo esquelético se puede obtener de la espalda o la extremidad anterior del ratón (“pelar” la pata del ratón con las pinzas y tomar la cantidad requerida). Si se desea pesar los órganos, usar mini cajas de Petri previamente tratadas con agua DEPC 0.1% (ver “Extracción de RNA”).
- b. Datos: órgano, cepa infectante, número o clave asignada, fecha, o cualquier otra información que sea necesaria para su identificación.
- c. Acomodar después los tubos en una caja bien etiquetada (con nombre del propietario, y contenido general de la misma) y almacenarlos a -70°C hasta su uso.

OBTENCIÓN DE ÓRGANOS Y PREINCLUSIÓN**Se puede realizar junto con la obtención de órganos para extracción de RNA****MATERIAL**

Pinzas, tijeras, base para disección.
Viales
Envase con cloro
Gradillas
Sanitas, gasas
Jeringas 3 mL (opcionales)
Cajitas de Petri (opcionales)
Tubos eppendorf 1.5 mL (opcionales)
Paraformaldehído (descongelar en el momento)
PBS

NOTA: limpiar perfectamente el sitio donde se realizará la disección antes y después de la misma.

PRECAUCIÓN: si se trabaja con ratones infectados, utilizar bata, doble guante, y careta.

PROCEDIMIENTO

1. Distribuir el paraformaldehído en los viales (por ejemplo, aprox. 60 mL para 8 viales)
2. Anestesiarse al ratón con éter, hasta que casi muera.
3. Bañarlo con alcohol 70%.
4. Obtener toda la sangre del corazón usando una jeringa de 3 mL y colocarla en un eppendorf de 1.5 mL (opcional)
5. Sacrificarlo por dislocación cervical (si no ha muerto aún).
6. Realizar un corte en la base del abdomen, separar la piel del ratón (enjuagar con agua DEPC 0.1% si es necesario para eliminar restos de pelo) y retirar la membrana del peritoneo.
7. Extraer los órganos deseados.^a
8. Cortar un pedazo de bazo, de colon (sección cercana al ciego), corazón y músculo esquelético.^b
9. Colocarlos en un mismo vial con paraformaldehído, previamente etiquetado.^c
10. Dejar los órganos durante 2 h, T.A. en el paraformaldehído.
11. Decantar el paraformaldehído, y agregar PBS. Incubar 15 min, T.A.
12. Transferir órganos a otro vial con PBS, durante 10 min, T.A.^d
13. Realizar otro lavado con PBS, durante 10 min (eliminar el anterior por decantación).^e
14. Transferir los órganos a otro vial con EtOH 70% recién preparado, durante 1 h.^f
15. Decantar el EtOH anterior y adicionar EtOH 90% recién preparado, durante 1 h.
16. Decantar el EtOH anterior y adicionar EtOH 96% recién preparado, durante 1 h.
17. Decantar el EtOH anterior y adicionar EtOH absoluto, durante 1 h.
18. Transferir los órganos a otro vial con xilol nuevo (X), durante 1 h.^g
19. Transferir los órganos a otro vial con xilol/paraplast (X/P), durante 1 h, a 50°C.
20. Transferir los órganos a otro vial con paraplast (P), durante toda la noche, a 50°C.

NOTAS:

- a. Músculo esquelético se puede obtener de la espalda o la extremidad anterior del ratón (“pelar” la pata del ratón con las pinzas y tomar la cantidad requerida). Si se desea pesar los órganos, usar mini cajas de Petri: pesar previamente las cajas vacías y por diferencia obtener el peso del órgano.
- b. Realizar el menor número de cortes posibles en el tejido.
- c. Identificando el ratón sacrificado, el punto experimental y número de experimento.
- d. Transferir los órganos usando unas pinzas, sin presionarlos demasiado para no dañarlos.

- e. Cuando se decanten los líquidos, cuidar de que no se vayan también los fragmentos de tejido u órganos.
- f. Durante estas incubaciones, colocar el paraplast en la incubadora a 50°C.
- g. Aproximadamente a la media hora de la incubación en xilol, adicionar a un vial que contenga paraplast derretido (estufa 50°C) un volumen igual de xilol (X/P 1:1)

INCLUSIÓN

MATERIAL

Moldes de metal
Soportes de plástico, etiquetados
Pipeta Pasteur de plástico
Pinzas
Escruidores de metal para parafina
Paraplast (parafina)
Incubadora a 50°C

PROCEDIMIENTO

1. Ajustar y controlar la temperatura de la incubadora a 50°C (no debe sobrepasar los 51°C).
2. Meter los soportes de plástico y los moldes de metal en la incubadora a 50°C.
3. Llenar las cunetas de los moldes de metal con paraplast, usando la pipeta de plástico (si es necesario, cortarle un poco la punta para que salga bien la parafina).
4. Acomodar los órganos en la cuneta, lo más juntos posible (realizar este paso con el molde dentro de la incubadora).^a
5. Sacar el molde y colocarle encima el soporte de plástico.
6. Ir agregando poco a poco el paraplast, dejando solidificar lo suficiente para que no se derrame, pero sin que se opaque.^b
7. Llenar el molde de plástico hasta aproximadamente $\frac{3}{4}$ de su capacidad.
8. Dejar solidificar totalmente.
9. Al terminar de incluir cada muestra, poner paraplast en las cunetas de otros dos moldes.
10. Esperar a que la temperatura de la incubadora llegue otra vez a 50°C antes de incluir el siguiente tejido.

NOTAS:

- a. El corazón se parte a la mitad, el corte del corazón debe quedar bocabajo; si se incluye colon, cortarlo en pequeños pedazos formando pequeños cilindros y tratar de incluirlo parado.
- b. Cuando se opaca, indica que se va solidificando y si se adiciona parafina caliente se forman capas, restándole estabilidad a la inclusión.

SILANIZACIÓN DE PORTAOBJETOS

MATERIAL

Portaobjetos

Cajas de tinción (4)

HCl 10% en EtOH 70% (para 500 mL: 135 mL HCl 37% + 365 mL EtOH 70%)

EtOH 96%

TESPA 2% en acetona

Agua bidestilada

PROCEDIMIENTO

1. Prender el horno a 150°C.
2. Colocar cada uno de los reactivos en una caja de tinción.
3. Sumergir las laminillas varias veces en HCl 10%/EtOH 70%.
4. Lavar en agua bidestilada, sumergiendo varias veces.
5. Sumergir varias veces en EtOH 96%.
6. Sacudir y meter la horno (precalentado a 150°C) durante 5 min o hasta que se sequen las laminillas.
7. Dejar enfriar.
8. Sumergir en TESPA 2% durante 10 s.
9. Lavar con agua bidestilada (sumergir varias veces).
10. Secar a 42°C.

NOTA: en lo que se secan las laminillas a 42°C, guardar el TESPA en un frasco ámbar, en el cuarto frío (4°C), ya que se oxida muy fácilmente.

DESPARAFINACIÓN

MATERIAL

4 cajas Coplin ^a

pinzas

sanitas

timer

Xilol

Etanol absoluto, 96%, 70%, 50%.

Agua bidestilada

PBS 1X pH 7.2-7.4

BSA 2%/PBS

PROCEDIMIENTO

1. Sumergir las laminillas en xilol (Xilol 1)^b durante 10 min.
2. Transferir las laminillas a otra caja con xilol (Xilol 2)^b durante 10 min.
3. Transferir las laminillas a otra caja con etanol absoluto durante 5 min.^c
4. Cambiar el etanol por etanol 96%, dejar 5 min.^d
5. Cambiar el etanol por etanol 70%, dejar 5 min.^d
6. Cambiar el etanol por etanol 50%, dejar 5 min.^d
7. Transferir las laminillas a otra caja con agua bidestilada, durante 10 min.

NOTAS:

- a. Al colocar las laminillas en las cajas, fijarse que el tejido de todas quede hacia la misma dirección, de preferencia, viendo hacia uno.
- b. El xilol debe trabajarse en la campana de extracción. Utilizar pinzas para transferir las laminillas de una caja a otra.
El xilol se hidrata muy fácilmente al contacto con el ambiente, por lo que el xilol 1 corresponde al xilol más hidratado (por el uso), mientras que el xilol 2 es el menos hidratado.
Cuidar que todos los tejidos queden impregnados; si es necesario, se completa el xilol 1 con xilol 2, y el xilol 2 con xilol nuevo. Regresar cada xilol al frasco correspondiente.
En caso de desparafinar para realizar inmunohistoquímica, utilizar xilol nuevo, el cual se podrá usar dos veces más.
Si las laminillas son desparafinadas sólo para tinción, puede usarse xilol usado.
- c. Secar la base del portaobjetos en una sanita para eliminar el exceso de xilol antes de introducirla en la caja con EtOH. Si es para inmunohistoquímica, se utilizan etanoles nuevos.
- d. Se utiliza la misma caja que se usó para el EtOH anterior transfiriendo con ayuda de un embudo el etanol usado, y guardándolo en un envase etiquetado con la concentración adecuada e indicando que es usado. Agregar inmediatamente a la caja Coplin el EtOH siguiente.

TINCIÓN DE CORTES HISTOLÓGICOS CON HEMATOXILINA/EOSINA**MATERIAL**

10 cajas Coplin^a
2 cajas Petri de vidrio
pinzas
sanitas
timer
cubreobjetos
Hematoxilina de Harris
Alcohol ácido
Agua bidestilada
Etanol absoluto, 96%, 80%, 70%.
Eosina
Xilol
Resina Permout

PROCEDIMIENTO

1. Desparafinar
2. Transferir las laminillas a una caja Coplin con hematoxilina de Harris, durante 4 min.
3. Sumergir 4 veces cada laminilla en alcohol ácido.^b
4. Inmediatamente después de las 4 inmersiones, lavar con agua bidestilada.
5. Transferir las laminillas a una caja con EtOH 70%, durante 2 min.
6. Transferir las laminillas a una caja con EtOH 80%, durante 2 min.
7. Transferir las laminillas a una caja con eosina, durante 3 min.^c
8. Transferir las laminillas a una caja con EtOH 80%, durante 2 min.
9. Transferir las laminillas a una caja con EtOH 96%, durante 2 min.^d
10. Transferir las laminillas a una caja con EtOH absoluto, durante 2 min.
11. Transferir las laminillas a una caja con xilol (Xilol 1), durante 3 min.^e
12. Transferir las laminillas a otra caja con xilol (Xilol 2), durante 3 min.
13. Montar las laminillas con Permout.^f
14. Dejar secar a temperatura ambiente, durante 24 h.

NOTAS:

- a. Se puede realizar en cajas Coplin o en cajas de vidrio para tinción, según la cantidad de laminillas a teñir. Al colocar las laminillas en las cajas, fijarse que el tejido de todas quede hacia la misma dirección, de preferencia, viendo hacia uno. Cuidar que las laminillas no estén frías, porque se retarda la tinción.
- b. Cuidar mucho los tiempos de cada uno de los pasos.
Al pasar las laminillas de la hematoxilina al alcohol ácido, escurrir el exceso del colorante y secar ligeramente la base sobre una sanita. Los pasos 3, 4 y 5 se hacen de corrido para cada laminilla antes de pasar a la siguiente.
En caso de que sean varias laminillas, el alcohol ácido y el agua pueden usarse dos veces, en caso contrario, se desechan.
- c. Al pasar las laminillas de la eosina al etanol 80%, escurrir el exceso del colorante y secar ligeramente la base sobre una sanita.
En cuanto sea posible, regresar la hematoxilina y la eosina a sus recipientes, los cuales deben guardarse envueltos en aluminio.
- d. Puede utilizarse la misma caja para el EtOH 96% y el absoluto.
En caso de que sean varias laminillas, el EtOH 96% puede usarse dos veces, en caso contrario, se desecha.
- e. Trabajar el xilol en la campana de extracción.

- f. Transportar las laminillas de una en una en una caja de Petri con xilol nuevo. Limpiar la laminilla por abajo y ponerla en otra caja de Petri. Colocar una gota de Permout sobre cada corte. Colocar un cubreobjetos, cuidando que no se formen burbujas (se presiona del centro hacia las orillas con una pinza para tratar de sacar las burbujas que se hayan formado).

MÉTODO DE VON KOSSA PARA LA TINCIÓN DE CALCIO (TINCIÓN ESPECIAL)¹

MATERIAL

10 cajas Coplin^a
 2 cajas Petri de vidrio
 pinzas
 sanitas
 timer
 cubreobjetos
 Nitrato de plata 1%
 Tiosulfato de sodio 5%
 Rojo núcleo resistente 0.1%
 Agua bidestilada
 Etanol absoluto, 96%, 80%, 70%.
 Xilol
 Resina Permout

PROCEDIMIENTO

1. Desparaafinar las laminillas e hidratar hasta agua.
2. Colocar las laminillas en una caja coplin de vidrio con la solución de nitrato de plata 1%, e incubar bajo luz ultravioleta durante 30 min (o en frente de un bulbo de luz de 60-100 watt durante 1 h o más).
3. Enjuagar en varios cambios de agua destilada.
4. Remover la plata sin reaccionar con la solución de tiosulfato de sodio durante 5 min.
5. Enjuagar con agua destilada.
6. Contrateñir con rojo núcleo-resistente durante 5 min.
7. Enjuagar con agua destilada.
8. Deshidratar en alcohol etílico 70%, 80%, 96% y absoluto, dos minutos cada uno, y aclarar en dos cambios de xileno, tres minutos en cada uno.
9. Montar (ver técnica de la tinción de hematoxilina/eosina)

Resultados:

Sales de calcio	negro o café-negro
Núcleo	rojo
Citoplasma	rosa

Notas:

1. La luz UV generalmente da una reacción más fuerte por lo que las sales de calcio suelen teñirse de negro. El bulbo de 60-100 watts da una reacción más débil, tiñendo las sales de café-negro.
2. Se cree que las sales de oxalato son negativas a esta tinción.
3. Puede necesitarse un control negativo si se duda que los depósitos negros resultantes sean de calcio. Esto se hace al tratar un laminilla en ácido fórmico durante 10 minutos antes del paso 3. La laminilla control debe dar una reacción negativa.

¹ Sheehan y Hrapchak, 1980

INMUNOHISTOQUÍMICA

MATERIAL

Cámara húmeda (caja Petri, algodón, piseta de agua)
Sanitas
Timer
Plumón PAP PEN
Micropipetas
Puntas para micropipetas
Papel aluminio
Cubreobjetos
BSA 2%/PBS
Primer anticuerpo
BSA 1%/PBS, BSA 0.5%/PBS
PBS 1X, pH 7.2-7.4
Segundo anticuerpo o conjugado de estreptavidina
Yoduro de propidio o DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol, dilactato)
Reactivo de montaje GEL/MOUNT

PROCEDIMIENTO

1. Desparafinar.
2. Se sustituye el agua bidestilada (paso 7 de la desparafinación) por PBS, se incuba durante 20 min (se usa la misma caja Coplin).
3. Se construye una cámara húmeda usando una caja Petri con pedazos de algodón colocados en las orillas, húmedos. También puede colocarse una sanita húmeda extendida en la base de la caja.
4. Se saca el portaobjetos de la caja Coplin, se seca por atrás y en las orillas, sin permitir que se seque el tejido.
5. Se hacen círculos alrededor de cada corte utilizando un plumón especial (PAP PEN).^a
6. Colocar 100 μ L de BSA 2%/PBS sobre cada corte. Incubar durante 2 horas a temperatura ambiente.^b
7. Eliminar el BSA 2%/PBS usando una micropipeta, sin dejar secar completamente y colocar 50 μ L del primer anticuerpo con la dilución adecuada.^c
8. Cubrir la cámara húmeda con papel aluminio e incubar toda la noche a 4°C^d
9. Eliminar el anticuerpo con una micropipeta.
10. Realizar tres lavados con 200 μ L de BSA 1%/PBS, de 10 min cada uno.^e
Si se usan fluorocromos, realizar los siguientes pasos con poca luz.
11. Eliminar el líquido del último lavado con una micropipeta y colocar 50 μ L del segundo anticuerpo o de conjugado (estreptavidina-fluorocromo), en oscuridad.
12. Cubrir la cámara húmeda con papel aluminio e incubarlo en oscuridad durante 1 hora a temperatura ambiente.
13. Eliminar el segundo anticuerpo o conjugado usando una micropipeta.
14. Realizar dos lavados con 200 μ L de BSA 1%/PBS, de 10 min cada uno.
15. Realizar un tercer lavado con PBS, 10 min.
16. Contrateñir (si se requiere).^f
17. Montar.^g

NOTAS:

- a. No presionar el plumón sobre la superficie, para evitar derrames.
- b. Esto se realiza para bloquear la superficie y evitar que haya uniones inespecíficas del anticuerpo.
- c. Las diluciones de los anticuerpos se preparan en BSA1%/PBS. Si es necesario, se puede extender el líquido con una punta de la micropipeta para que cubra todo el tejido, cuidando de no dañarlo.

- d. También puede realizarse una incubación de 2 h, a temperatura ambiente, pero se prefiere la incubación o.n., 4°C para aumentar la especificidad de la reacción antígeno-anticuerpo.
- e. Los lavados se realizan colocando el BSA1%/PBS sobre cada corte y dejándolo reposar durante el tiempo indicado, transcurrido el cual se retira el líquido sin dejar secar completamente el tejido.
- f. La contratinción se realiza con yoduro de propidio o DAPI, que se unen a los ácidos nucleicos. Después del lavado con PBS, se colocan 50-100 µL del agente de tinción, y se retiran casi inmediatamente con la misma punta, regresándolos a su tubo (que debe estar envuelto en aluminio). Se lava con PBS, y posteriormente con agua destilada. El yoduro de propidio o DAPI recuperados se pueden usar varias veces.
- g. Para el montaje, se seca la laminilla dejando un poco húmedos los tejidos. Se colocan dos gotas del reactivo especial para el montaje distribuidas en la laminilla. Se coloca el cubreobjetos, cuidando que quede sobre los cortes y el reactivo de montaje se distribuya sobre ellos. La laminilla ya montada se puede guardar en una cámara húmeda envuelta con aluminio a 4°C, hasta por un mes.

ANEXO III. PCR EN TIEMPO REAL

Método de $2^{-\Delta C_t}$ ⁽²⁾

La normalización con una referencia interna provee un método para corregir resultados por variaciones en las cantidades iniciales de RNA (como consecuencia de errores en pipeteo, diferencias en la eficiencia de transcripción a cDNA). Para ello, es necesario que el gen que sea utilizado como referencia interno no se vea modificado por el tratamiento experimental.

Utilizando el método $2^{-\Delta C_t}$ se puede estudiar el efecto del tratamiento experimental sobre la expresión de una referencia interna, es decir, determinar si el control interno es afectado por el tratamiento.

Sólo hay que considerar que:

$$\Delta C_t = C_{t_{\text{muestra}}} - C_{t_{\text{control}}}$$

donde $C_{t_{\text{muestra}}}$ es el valor de Ct de la referencia interna de una muestra, y $C_{t_{\text{control}}}$ es el valor de Ct de la referencia interna del control o calibrador.

Finalmente, sólo se sustituyen los valores de los Ct correspondientes y se aplica la fórmula.

² Livak y Schmittgen, 2001.

Lista de abreviaturas

anti-IgG-FITC	anticuerpo anti-IgG de conejo acoplado a fluoresceína
APCs	células presentadores de antígeno
BCG	bacilo de Calmette-Guérin
BSA	albúmina sérica bovina
CCC	cardiomiopatía chagásica crónica
CCL2/MCP-1	proteína quimioatrayente de macrófagos
CCL3/MIP-1 α	proteína inflamatoria de macrófagos 1 α
CCL4/MIP-1 β	proteína inflamatoria de macrófagos 1 β
CCL5/RANTES	factor de regulación y activación expresado y secretado por células T normales
CCR5	receptor de quimiocinas CC número 5
cDNA	copia de ácido desoxirribonucleico
Ct	ciclo umbral
CXCL10/IP10	proteína inducida por IFN- γ
CXCL9/MIG	monocina inducida por IFN- γ
DAB	diaminobenzidina
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol, lactato
DC	células dendríticas
DEPC	dietilpirocarbonato
DNA	ácido desoxirribonucleico
ECG	electrocardiograma
ELISA	ensayo de inmunoabsorción unido a enzimas
GPI	glicosilfosfatidilinositol
H/E	hematoxilina/eosina
HPRT	hipoxantina fosforribosil transferasa
IFN	interferón
Ig	inmunoglobulina
IgG	inmunoglobulina G
IgM	inmunoglobulina M
IL	interleucina
kDNA	material genético mitocondrial del parásito (DNA del cinetoplasto)
LPS	lipopolisacáridos
M Φ	macrófagos
m.e.	músculo esquelético
MHC	complejo principal de histocompatibilidad
mRNA	ácido ribonucleico mensajero
Ninoa	cepa Ninoa de <i>T. cruzi</i>
NK	células asesinas naturales
NO	óxido nítrico
PBMs	monocitos sanguíneos periféricos
PBS	solución buffer de fosfatos
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PCR-tr	reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
pi	post-infección

Qro	cepa Querétaro de <i>T. cruzi</i>
RAPD	DNA polimórfico amplificado al azar
RFLP	longitud de polimorfismos por fragmentos de restricción
RNA	ácido ribonucleico
RT-PCR	transcripción reversa seguida de reacción en cadena de la polimerasa
SA-HRP	estreptavidina acoplada a la enzima peroxidasa
SA-PE	estreptavidina acoplada a ficoeritrina
TGF	factor transformante de crecimiento
TLR	receptores tipo Toll
TNF	factor de necrosis tumoral

Glosario

ciclo umbral: ciclo en el cual la fluorescencia emitida sobrepasa el umbral fijado. El umbral se establece en la región asociada con un crecimiento exponencial del producto de PCR.

control negativo: muestra que no contiene templado. Se usa para verificar la calidad de la amplificación.

control no-rt: muestra de RNA tratado con DNasa I que no fue transcrito reversamente. Se usa para verificar la ausencia de DNA genómico.

miotrópica: cepa que presenta tropismo hacia el músculo.

pantrópica: cepa que presenta tropismo hacia muchos tipos de tejido.

parasitemia: presencia de parásitos en la sangre.

patognomónico: característico o sintomático de una condición o enfermedad en particular.

redúvido: insecto perteneciente a la familia Reduviidae, transmisor del parásito *Trypanosoma cruzi*, agente causal de la enfermedad de Chagas.

seroprevalencia: es el número de personas en una población determinada que son positivas a una enfermedad específica, basado en la presencia de anticuerpos contra esa enfermedad (seropositividad).