



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**ESTUDIO DE LA RESPUESTA INMUNE EN TUBO  
DIGESTIVO DE RATÓN INFECTADO CON  
*Trypanosoma cruzi*. DETERMINACIÓN DE  
ANTICUERPOS Y CÉLULAS DEL SISTEMA  
INMUNE.**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**B I O L O G A**

**P R E S E N T A:**

**Natalia Solórzano Domínguez.**



**DIRECTOR DE TESIS:  
DRA. BERTHA ESPINOZA GUTIERREZ.  
2010.**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

## AGRADECIMIENTOS

---

A la Dra. Bertha Espinoza Gutiérrez por el apoyo que me brindo en la realización de este proyecto y por permitirme ser parte de su equipo de trabajo.

A la Dra. Rosario Ortiz Hernández por la asesoría y comentarios a este trabajo así como por su apreciable amistad.

Al M. en C. Ignacio Martínez Martínez por su amistad y ayuda en este proyecto.

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 micrótopo.

Se agradece el apoyo otorgado por el Dr. Gabriel Gutiérrez Ospina del Instituto de Investigaciones de Biomédicas, UNAM en la utilización de las instalaciones y asesoría para realizar los cortes en el criostato.

A la UNAM por ser mi casa de estudio.

Se agradece el apoyo económico del proyecto DGAPA IN229209, UNAM.

El Jurado del examen estuvo constituido por:

|            |   |
|------------|---|
| Presidente | Dr. Erasmo Martínez Cordero.            |
| Vocal      | Dra. Gladis Fragoso González.           |
| Secretario | Dra. Bertha Espinoza Gutiérrez.         |
| Tutor      |   |
| Suplente   | M. en C. Isabel Cristina Cañeda Guzmán. |
| Suplente   | M en C. Leticia Parra Gámez.            |

## DEDICATORIAS

---

*A mi madre, el ángel que cuida mis pasos desde el cielo.*

*A mi padre, quien me enseñó la fortaleza, responsabilidad y humildad.*

*A mis hermanos los cuales siempre están en mi mente y en mi corazón.*

*A toda mi familia que siempre ha estado conmigo.*

*A Marco Antonio por formar parte importante de mi vida y a la familia Escobar Alpizar.*

*A mi amiga Pao, por estar cuando te necesito.*

*A mis queridas bichas por todo lo que hemos vivido y por lo que nos falta vivir.... salud!!!. Siempre serán mis grandes amigas.*

*A Deyanira, Wendy, Guiehdani y Fer por que le dieron el toque a mi vida en el laboratorio, queridos amigos.*

*A mis compañeros del laboratorio, por los momentos que hemos vivido: Maria Luisa, Rodrigo, Nacho, Ana Gutiérrez, Mirna, Alejandra, Diana, Julio, Frendida, Nacho, Carlos, Génesis.*

# ÍNDICE

---

|   |           |
|---|-----------|
| Índice de figuras.....  | iii       |
| Lista de abreviaturas.....  | iv        |
| Resumen.....  | v         |
| <b>I. INTRODUCCIÓN.....</b>   | <b>1</b>  |
| I.1. Generalidades.....   | 1         |
| I.2. La enfermedad de Chagas en México.....                               | 2         |
| I.3. Taxonomía.....   | 4         |
| I.4. Biología y ciclo de vida de <i>T. cruzi</i> .....                    | 5         |
| I.4.1 Organización interna.....   | 5         |
| I.4.2. Estadios morfológicos.....   | 7         |
| I.4.3. Ciclo de vida.....   | 9         |
| I.5. Variabilidad genética de <i>T. cruzi</i> .....                       | 10        |
| I.5.1. Implicaciones de la variabilidad genética de <i>T. cruzi</i> ..... | 12        |
| I.5.2. Cepas de <i>T. cruzi</i> en México.....                            | 13        |
| I.6. Transmisión.....   | 13        |
| I.7. Enfermedad de Chagas.....  | 14        |
| I.7.1. Fase aguda.....  | 14        |
| I.7.2. Fase crónica.....  | 15        |
| I.7.3. Patología.....   | 16        |
| I.7.4. Tratamiento.....   | 17        |
| I.8. Inmunología a <i>T. cruzi</i> .....                                  | 18        |
| I.8.1. Respuesta inmune en tracto digestivo.....                          | 22        |
| <b>II. JUSTIFICACIÓN.....</b>   | <b>23</b> |
| <b>III. HIPÓTESIS.....</b>  | <b>24</b> |
| <b>IV. OBJETIVOS.....</b>   | <b>24</b> |
| IV.1. General.....  | 24        |
| IV.2. Particulares.....   | 24        |
| <b>V. DISEÑO EXPERIMENTAL.....</b>  | <b>25</b> |

|   |    |
|---|----|
| <b>VI. MATERIAL Y MÉTODO</b> .....  | 26 |
| VI.1. Ratones.....  | 26 |
| VI.2. Parásitos.....  | 26 |
| VI.3. Obtención de órganos.....   | 27 |
| VI.4. Histología.....   | 28 |
| VI.5. Inmunofluorescencia.....  | 28 |
| VI.6. Inmunohistoquímica.....   | 30 |
| VI.7. Lavados intestinales.....   | 30 |
| VI.8. ELISA.....  | 31 |
| VI.9. Infiltrado inflamatorio.....  | 32 |
| VI.10. Cuantificación celular.....  | 32 |
| VI.11. Análisis estadístico.....  | 33 |
| <b>VII. RESULTADOS</b> .....  | 34 |
| VII.1. Parásitos en tejido.....   | 34 |
| VII.2. Infiltrado inflamatorio.....   | 36 |
| VII.3. Infiltrado inflamatorio en tubo digestivo de ratones infectados con distintos<br>inóculos..... | 39 |
| VII.4. Determinación de macrófagos en infiltrados inflamatorios.....                                  | 41 |
| VII.5. Cuantificación de linfocitos T CD4 <sup>+</sup> y CD8 <sup>+</sup> en tejido.....              | 44 |
| VII.6. Determinación de IgA anti- <i>T. cruzi</i> en la luz intestinal.....                           | 50 |
| <b>VIII. DISCUSIÓN</b> .....  | 52 |
| <b>IX. CONCLUSIONES</b> .....   | 60 |
| <b>X. PERSPECTIVAS</b> .....  | 61 |
| <b>XI. REFERENCIAS</b> .....  | 62 |
| <b>ANEXO I. INMUNIDAD DE MUCOSAS</b> .....  | 71 |
| <b>ANEXO II. TÉCNICAS DE HISTOLOGÍA</b> .....   | 79 |
| <b>ANEXO III. TÉCNICAS PARA CORTES EN FRÍO</b> .....  | 84 |
| <b>ANEXO IV. INMUNOHISTOQUÍMICA</b> .....   | 86 |
| <b>ANEXO V. TÉCNICAS PARA LA EVALUACIÓN DE ANTICUERPOS</b> .....                                      | 91 |
| <b>ANEXO VI. REACTIVOS</b> .....  | 93 |
| <b>ANEXO VII. SOFTWARE IMAGE J</b> .....  | 95 |

## Índice de figuras

---

|            |  |    |
|------------|--|----|
| Figura 1.  | Distribución geográfica de la enfermedad de Chagas.....  | 1  |
| Figura 2.  | Distribución del número total de casos de la enfermedad de Chagas.....   | 3  |
| Figura 3.  | Esquema general de la forma epimastigote de <i>T. cruzi</i> .....  | 6  |
| Figura 4.  | Esquemas que muestran los estadios de <i>T. cruzi</i> .....  | 7  |
| Figura 5.  | Ciclo de vida de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....  | 9  |
| Figura 6.  | Insecto vector de la infección por <i>T. cruzi</i> . Especie <i>Triatoma dimidiata</i> , Veracruz.....   | 13 |
| Figura 7.  | Principales manifestaciones y síntomas de la enfermedad de Chagas.....   | 15 |
| Figura 8.  | Microfotografías representativas de la detección de parásitos en las tres secciones del intestino delgado.....   | 34 |
| Figura 9.  | Tinción H/E en intestino delgado Ratón infectado con la cepa Ninoa, 21dpi.....   | 35 |
| Figura 10. | Presencia de amastigotes en tejido del intestino delgado de ratones infectados.....  | 35 |
| Figura 11. | Infiltrados inflamatorios en intestino delgado de ratones infectados con ambas cepas.....  | 37 |
| Figura 12. | Grado de inflamación en intestino delgado de ratones infectados con ambas cepas de <i>T. cruzi</i> .....   | 38 |
| Figura 13. | Infiltrados inflamatorios en intestino delgado de ratones infectados con distintos inóculos de ambas cepas.....  | 40 |
| Figura 14. | Grado de inflamación en intestino delgado de ratones infectados con distintos inóculos de ambas cepas.....   | 41 |
| Figura 15. | Microfotografías representativas de la presencia y distribución tanto de macrófagos como de amastigotes en las tres secciones de intestino.....  | 42 |
| Figura 16. | Inmunofluorescencia de macrófagos en intestino delgado de ratón infectado con la cepa Ninoa, 21dpi.....  | 42 |
| Figura 17. | Presencia de macrófagos en tejido del intestino delgado de ratones infectados con dos cepas de <i>T. cruzi</i> 21dpi.....  | 43 |
| Figura 18. | Caracterización de linfocitos T CD4 <sup>+</sup> en las tres secciones de intestino delgado de ratones infectados con ambas cepas de <i>T. cruzi</i> I, a los 21 días pi.....                                    | 45 |
| Figura 19. | Caracterización de linfocitos T CD8 <sup>+</sup> en las tres secciones de intestino delgado de ratones infectados con ambas cepas de <i>T. cruzi</i> I, a los 21 días pi.....                                    | 46 |
| Figura 20. | Cuantificación de linfocitos T CD4 <sup>+</sup> y CD8 <sup>+</sup> en las tres secciones del intestino delgado de ratones infectados con ambas cepas de <i>T. cruzi</i> , análisis por cada tipo celular.....    | 48 |
| Figura 21. | Cuantificación de linfocitos T CD4 <sup>+</sup> y CD8 <sup>+</sup> en las tres secciones del intestino delgado de ratones infectados con ambas cepas de <i>T. cruzi</i> , comparación entre tipos celulares..... | 49 |
| Figura 22. | ELISA. Detección de anticuerpos IgA específicos a <i>T. cruzi</i> , en lavados intestinales de ratones infectados con ambas cepas de <i>T. cruzi</i> . A distintos tiempos post-infección.....                   | 51 |
| Tabla 1.   | Clasificación taxonómica de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....   | 4  |
| Tabla 2.   | Cuantificación de linfocitos T CD4 <sup>+</sup> y CD8 <sup>+</sup> en el intestino delgado de ratones sin infectar e infectados con las cepas Querétaro y Ninoa al día 21 pi.....                                | 48 |

## Lista de abreviaturas

---

|                 |   |
|-----------------|---|
| ADN             | Ácido desoxirribonucleico.  |
| AICD            | Activación de la muerte celular inducida.                                   |
| APCs            | Célula presentadoras de antígeno.   |
| BSA             | Albúmina sérica bovina.   |
| DAPI            | 4',6-diamino-2-fenilindol, lactato.   |
| DTUs            | Unidad taxonómica discreta.   |
| ELISA           | Análisis de inmunoabsorción ligado a enzimas.                               |
| ENA-78          | Proteína que aumenta la adhesión de neutrófilos a la superficie endotelial. |
| GALT            | Tejido linfoide asociado a intestino.                                       |
| GPI             | Glicosilfosfatidilinositol.   |
| GRO alfa y beta | Proteína con actividad quimiotrayente.                                      |
| IL              | Interleucina.   |
| INF             | Interferón.   |
| iNOS            | Óxido nítrico sintasa.  |
| KO              | Knock-out.  |
| LFA-1           | Integrina leucocitaria.   |
| MAL             | Tejido linfoide asociado a mucosa.  |
| MCP-1           | Proteína quimioatrayente de macrófagos.                                     |
| MLEE            | Electroforesis de enzimas multilocus.                                       |
| MHC-I           | Complejo principal de histocompatibilidad.                                  |
| MIP-1 $\alpha$  | Proteína inflamatoria de macrófagos $\alpha$ .                              |
| MIP-1 $\beta$   | Proteína inflamatoria de macrófagos $\beta$ .                               |
| MLN             | Nódulos linfáticos mesentéricos.  |
| NK              | Células natural killer.   |
| NO              | Óxido nítrico.  |
| PBS             | Buffer salino de fosfatos.  |
| RANTES          | Factor de regulación y activación expresado y secretado por células T.      |
| RAPD            | Amplificación al azar del ADN polimorfo.                                    |
| RFLP            | Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción.                     |
| SCLN            | Nódulos linfáticos subcutáneos.   |
| SigA            | Inmunoglobulina A secretora.  |
| TcII            | <i>T. cruzi</i> II.   |
| TcIII           | <i>T. cruzi</i> III.  |
| TcIV            | <i>T. cruzi</i> IV.   |
| TcV             | <i>T. cruzi</i> V.  |
| TcVI            | <i>T. cruzi</i> VI.   |
| TCR             | Receptor de la célula T.  |
| TGF- $\beta$    | Factor de crecimiento transformante $\beta$ .                               |
| TNF             | Factor de necrosis tumoral.   |
| TLR             | Receptor tipo Toll.   |
| TS              | Transialidasa.  |
| Z1              | Zimodema 1.   |
| Z2              | Zimodema 2.   |



## RESUMEN

---

Estudios previos en nuestro laboratorio han mostrado que las cepas mexicanas de *Trypanosoma cruzi* denominadas MHOM/MX/1994/Ninoa y ITRI/MX/0000/Querétaro, pertenecientes al grupo genético TcI, presentan diferencias en su comportamiento biológico incluyendo niveles de parasitemia, capacidad de infección *in vitro* e *in vivo*, así como en la respuesta inmune que inducen en el hospedero. El presente trabajo estudia la respuesta inmune en el intestino delgado de ratones BALB/c infectados por vía intraperitoneal con estas cepas. Se analizaron las tres secciones que conforman al intestino delgado: Duodeno, Yeyuno e Íleon, a distintos días post-infección (21y 90 días pi). Comenzado con la búsqueda de amastigotes en tejido a los 21 días pi, por medio de inmunofluorescencia usando un suero anti-*T. cruzi*. Los ratones infectados con la cepa Querétaro presentaron la mayor cantidad de parásitos en la sección del Duodeno en comparación con las otras secciones o con los ratones infectados con la cepa Ninoa. Los parásitos abundaron en la mucosa y muscular externa. Por otra parte se evaluó el infiltrado inflamatorio por medio de tinción Hematoxilina-Eosina (H&E), cuantificando el grado de inflamación. Siendo los ratones infectados con la cepa Querétaro los que presentaran el mayor grado de inflamación en las tres secciones del intestino. La presencia de macrófagos se determinó, también por medio de inmunofluorescencia utilizando el anticuerpo F4/80. El número de macrófagos fue mayor en la infección con la cepa Querétaro, particularmente en la sección de Íleon en comparación al grupo control y a la infección con la cepa Ninoa. En la infección con la cepa Querétaro y con la cepa Ninoa los valores de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> no mostraron cambios en la sección de Duodeno en comparación con el grupo control. Sin embargo, predominaron CD8<sup>+</sup> en Yeyuno y CD4<sup>+</sup> en Íleon en el caso de los ratones infectados con la cepa Querétaro. En los ratones infectados con la cepa Ninoa hubo un decremento de CD4<sup>+</sup> en Yeyuno y en Íleon. Con respecto a la detección de IgA en la luz intestinal por medio de ELISA, la evaluación mostró que la presencia de IgA en los ratones infectados con la cepa Querétaro no aumentó en ninguna de las fases de la enfermedad. Por otro lado, en los ratones infectados con la cepa Ninoa, la IgA aumentó durante la fase aguda, solo en la sección de Duodeno. En conclusión, ambas cepas son capaces de infectar el intestino delgado e inducir una respuesta inmune. La cepa Querétaro mostró ser más virulenta en comparación con la cepa Ninoa, lo que derivó en una respuesta inmune exacerbada y probable daño tisular en el intestino delgado.

# I. INTRODUCCIÓN

## I.1. GENERALIDADES

La enfermedad de Chagas también conocida como Tripanosomiasis Americana. Descubierta hace un siglo por el Dr. Carlos Chagas, en 1909, es producida por el protozooario hemoflagelado *Trypanosoma cruzi*. La distribución geográfica de la infección, se extiende desde el sur de Estados Unidos al sur de Argentina y Chile (WHO 2008). Sin embargo, debido a su reciente propagación en países no endémicos como Japón, España, Alemania, Canadá y el norte de Estados Unidos, así como Australia donde hay 1067 inmigrantes potencialmente infectados, la enfermedad de Chagas se ha vuelto un problema de salud mundial (Schmunis, 2007; Dorn *et al.*, 2007) (Fig. 1). Se calcula que en todo el mundo hay entre 16 y 18 millones de individuos infectados, de los cuales mueren cada año cerca de 50 000 (WHO 2008).

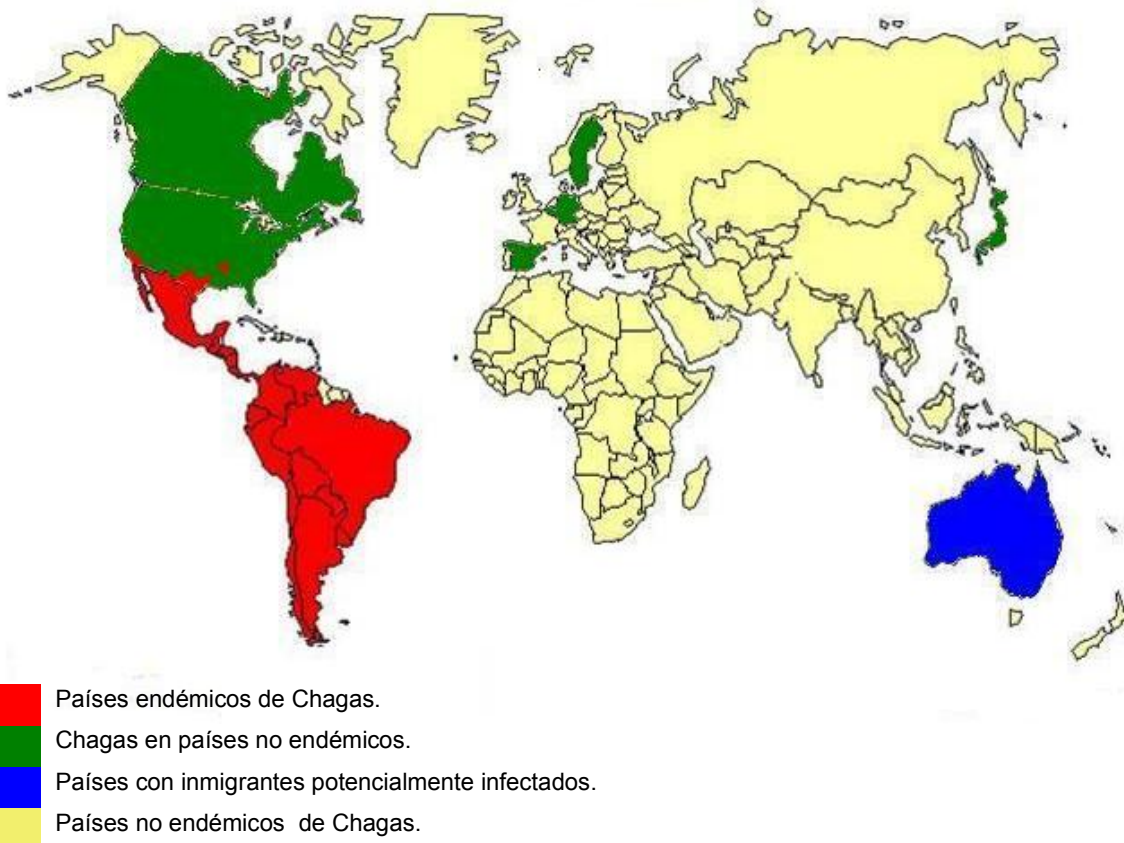


Fig. 1. Distribución geográfica de la enfermedad de Chagas. En países endémicos y no endémicos.

### I.2. LA ENFERMEDAD DE CHAGAS EN MÉXICO

La enfermedad humana presenta dos fases: en la fase aguda los síntomas aparecen poco después de la infección. Tras varios años de la infección crónica asintomática aparece la fase crónica con daños irreversibles a órganos internos, como el corazón, el esófago, el colon y el sistema nervioso periférico (WHO, 2008).

Los dos primeros casos de infección humana por *T. cruzi* en México fueron reportados en 1936 (Mazzoti, 1936); sin embargo, fue hasta 1984, cuando se reportó el primer caso vinculado al tracto digestivo siendo éste un megaesófago con serología positiva (Salazar- Schettino *et al.*, 1984).

Por lo menos un caso de Chagas ha sido reportado en cada uno de los 31 estados y el Distrito Federal (Cruz-Reyes y Pickering-Lopez, 2006), considerando a la enfermedad de Chagas como un problema de salud para México.

La situación para esta enfermedad en el país es complicada debido a que en México la biodiversidad de vectores y reservorios es numerosa. Considerando las subespecies, hay más de treinta triatomíneos presentes dentro del país. Algunos de los géneros que han sido reportados son: *Belminus*, *Dipetalogaster*, *Eratyrus*, *Panstrongylus*, *Paratriatoma*, *Rhodnius* y *Triatoma* siendo este último el género con mayor importancia vectorial (Martínez *et al.*, 2006; Salazar- Schettino, 2006).

Con respecto a los reservorios, estos se encuentran en forma silvestre y principalmente sinantrópicos, algunos de los más importantes son: tres especies de zarigüeya (*Didelphis virginiana*, *D. marsupialis*, y *Philander oposum*) (Cruz-Reyes y Pickering-Lopez, 2006); y una doméstica, considerada de gran importancia por la relación estrecha con el hombre, el perro (*Canis familiaris*) (Estrada-Franco *et al.*, 2006)

La presencia de la enfermedad en el país se ha visto relacionada con el bajo estatus económico de la población (Cruz-Reyes y Pickering-Lopez, 2006). Lo que repercute en viviendas con paredes de paja, láminas de cartón o madera, favoreciendo la convivencia con vectores y reservorios de *T. cruzi* (Sosa-Jurado *et al.*, 2004).

Es importante mencionar que también se encuentran presentes en México otras formas de transmisión como la transfusión sanguínea, congénita y trasplantes de órganos principalmente en zonas urbanas, lo que indica la dispersión de la infección de zonas rurales a urbanas (Cruz-Reyes y Pickering-Lopez, 2006).

En la literatura se han reportado diversos datos acerca de la prevalencia de la enfermedad de Chagas en el país, siendo el dato más citado el de la Encuesta Nacional de 1992 en donde se demostró una prevalencia de 1.6% (Velasco-Castrejon *et al.*, 1992); sin embargo, datos más recientes demuestran que el número de casos reportados a nivel nacional es de 16, 979 con una prevalencia de 5.88% esto desde 1928 hasta 2004 (Fig. 2) (Cruz-Reyes y Pickering-Lopez, 2006). Obviamente, se deben considerar los casos no reportados y no diagnosticados.

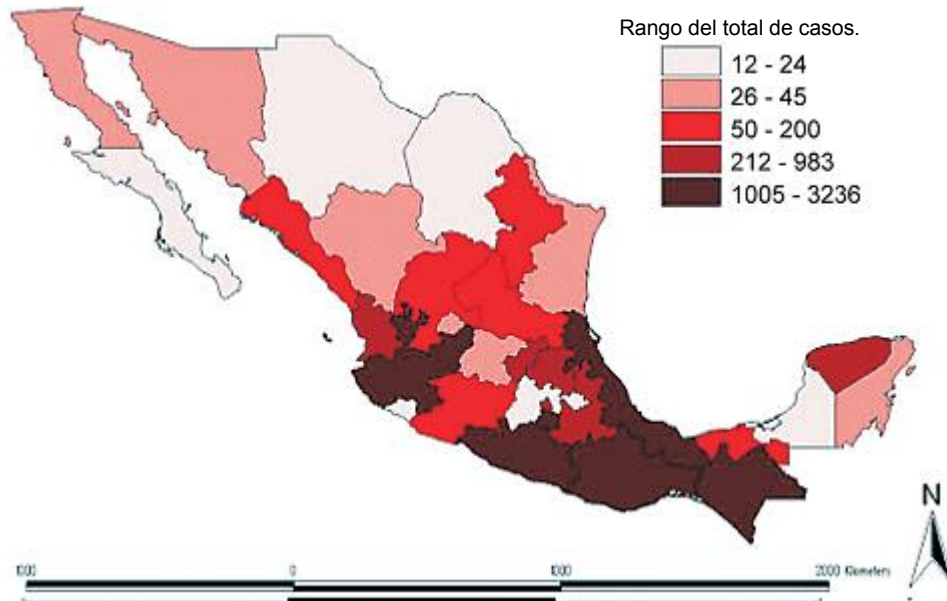


Fig. 2. Distribución del número total de casos de la enfermedad de Chagas por estado, detectados por análisis serológicos, manifestaciones clínicas y transfusión de sangre. Tomado y modificado de Cruz-Reyes y Pickering-Lopez, 2006.

Entre las formas clínicas presentes en pacientes con Chagas crónico se encuentran las cardiopatías crónicas (Sierra-Johnson *et al.*, 2005), megaviseras incluyendo megaesófago, megacolon (Sánchez-Guillén *et al.*, 2006) y hasta megaduodeno (Lozano-Kasten *et al.*, 1997).

### I. 3. TAXONOMÍA

La revisión más reciente de la clasificación de *T. cruzi* (Leedale y Vickerman, 2000) es la siguiente:

**Tabla 1.** Clasificación taxonómica de *Trypanosoma cruzi*.

|                   |   |                        |
|-------------------|---|------------------------|
| <b>Phylum.</b>    | Euglenozoa                                  | Cavalier- Smith, 1981. |
| <b>Clase.</b>     | Diplonema                                   | Cavalier- Smith, 1993. |
| <b>Orden.</b>     | Kinetoplastea.                              | Honingberg, 1963.      |
| <b>Suborden.</b>  | Trypanosomatina.                            | Kent, 1980.            |
| <b>Familia.</b>   | Trypanosomatidae.                           | Duflein, 1901.         |
| <b>Género.</b>    | Trypanosoma.                                | Gruby, 1843.           |
| <b>Subgénero.</b> | Schizotrypanum.                             | Chagas, 1909.          |
| <b>Especie.</b>   | <i>Trypanosoma cruzi</i> . (schizotrypanum) | Chagas, 1900.          |

### I. 4. BIOLOGÍA Y CICLO DE VIDA DE *T. CRUZI*

#### I. 4.1. Organización interna

*T. cruzi*, es un protozoo el cual está constituido por: pared celular, flagelo, citoesqueleto, cinetoplasto, complejo mitocondrial, glicosomas, acidocalcisomas, inclusión de lípidos, así como, componentes de la vía secretora y vía endocítica. Todas estas estructuras u organelos pueden ser fundamentales en la patogenicidad del parásito (De Souza, 2009), (Fig. 3).

Las estructuras celulares de los tripanosomátidos son únicas. La pared celular de estos parásitos intracelulares está constituida de una bicapa lipídica cuyo exterior está formado por un glicocalix. Entre las moléculas que se encuentran se incluyen mucinas, transialidasa y la familia Tc85 de glicoproteínas. Su función principal es la interacción con las superficies celulares de los hospederos vertebrados e invertebrados (De Souza, 2009).

El flagelo presenta una estructura básica, siendo revestido por una membrana flagelar y un axonema típico con un patrón de 9 + 2, cuya función es el movimiento del tripanosomatido (De Souza, 2002). Por otro lado, el citoesqueleto se encuentra constituido de microtúbulos subpeliculares

distribuidos a través del cuerpo, excepto en la región de la bolsa flagelar (De Souza, 2009). Desempeña un papel importante en el movimiento y manutención de la forma celular.

También presenta una mitocondria la cual se ramifica a través de todo el cuerpo, en este organelo encontramos gran cantidad de ADN el cual se encuentra organizado en forma de minicírculos. Particularmente se concentra (entre el 20 y el 25% del ADN total) en una región por debajo del cuerpo basal, dando origen al cinetoplasto (el cual varía de acuerdo al estadio del ciclo evolutivo), el cual es una estructura particular de los tripanosomatidos. Integrado por micicírculos y maxicírculos; formados por la concatenación del ADN (De Souza, 2002).

Otras estructuras con funciones importantes son los glicosomas cuya forma esférica y matriz homogénea contiene catalasas y enzimas involucradas en la degradación de peróxido de hidrógeno formado en las reacciones metabólicas. Así también el organelo capaz de transportar protones y calcio llamado acidocalcisoma es importante en la regulación del pH y osmorregulación. Por otro lado se encuentran las vacuolas contráctiles encargadas del transporte de agua y osmorregulación (De Souza, 2009).

La inclusión de lípidos así como proteasas sintetizadas por el parásito se lleva a cabo por un organelo denominado reservosoma, para que posteriormente sean utilizados durante el proceso de diferenciación celular.

El núcleo es similar al de otras células eucariotas. Es relativamente pequeño, midiendo cerca de 2,5  $\mu\text{m}$ . En epimastigotes y amastigotes es pequeño, mientras que en tripomastigotes es alargado y se localiza en el centro de la célula (De Souza, 2002).

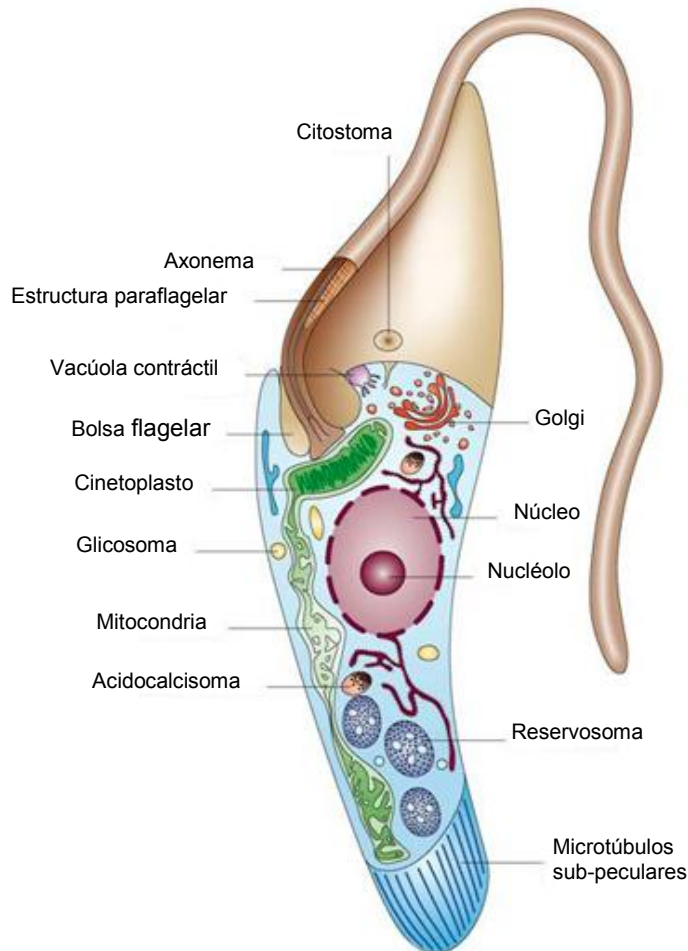


Fig. 3. Esquema general de la forma epimastigote de *T. cruzi* mostrando las principales estructuras celulares. Tomado de [http://www.fiocruz.br/chagas\\_esp/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=13](http://www.fiocruz.br/chagas_esp/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=13)

### I. 4. 2. Estadios morfológicos

En la morfología de *T. cruzi* se encuentran tres formas principales: tripomastigote, epimastigote y amastigote. Tales formas se presentan en los distintos estadios del ciclo de vida del tripanosomatido.

Los tripomastigotes son fusiformes, en forma de C, pueden medir unas 20-25  $\mu\text{m}$ . de longitud. Tienen núcleo vesiculoso, citoplasma poco granuloso y un cinetoplasto en la parte subterminal al cuerpo y posterior al núcleo. Del cuerpo basal ubicado cerca del cinetoplasto surge el flagelo donde se desarrolla la membrana ondulante que recorre todo el cuerpo, saliendo en la parte anterior el flagelo con movimiento libre. Este estadio se encuentra en forma infectante (tripomastigote metacíclico) en el intestino posterior de los triatomos infectados, y en forma hemática, en sangre de mamífero (Fig. 4 A).

Los amastigotes son de forma oval, miden de 2-2.5  $\mu\text{m}$ , un gran núcleo y cinetoplasto y un flagelo corto intracelular. Este estadio se halla en el interior de las células del hospedero donde se multiplica profusamente (Fig. 4 B).

Los epimastigotes también de aspecto fusiforme miden entre 20-25  $\mu\text{m}$  de longitud, en este estadio el cinetoplasto ha migrado cerca del núcleo pero aun se encuentra en posición anterior al cuerpo, presenta un flagelo con una pequeña membrana ondulante. Este estadio se encuentra en el intestino de los triatomíneos donde se multiplica difusamente para dar lugar a los tripomastigotes metacíclicos (Acha y Szyfres, 2003; Tay *et al.*, 2002), (Fig.4 C).

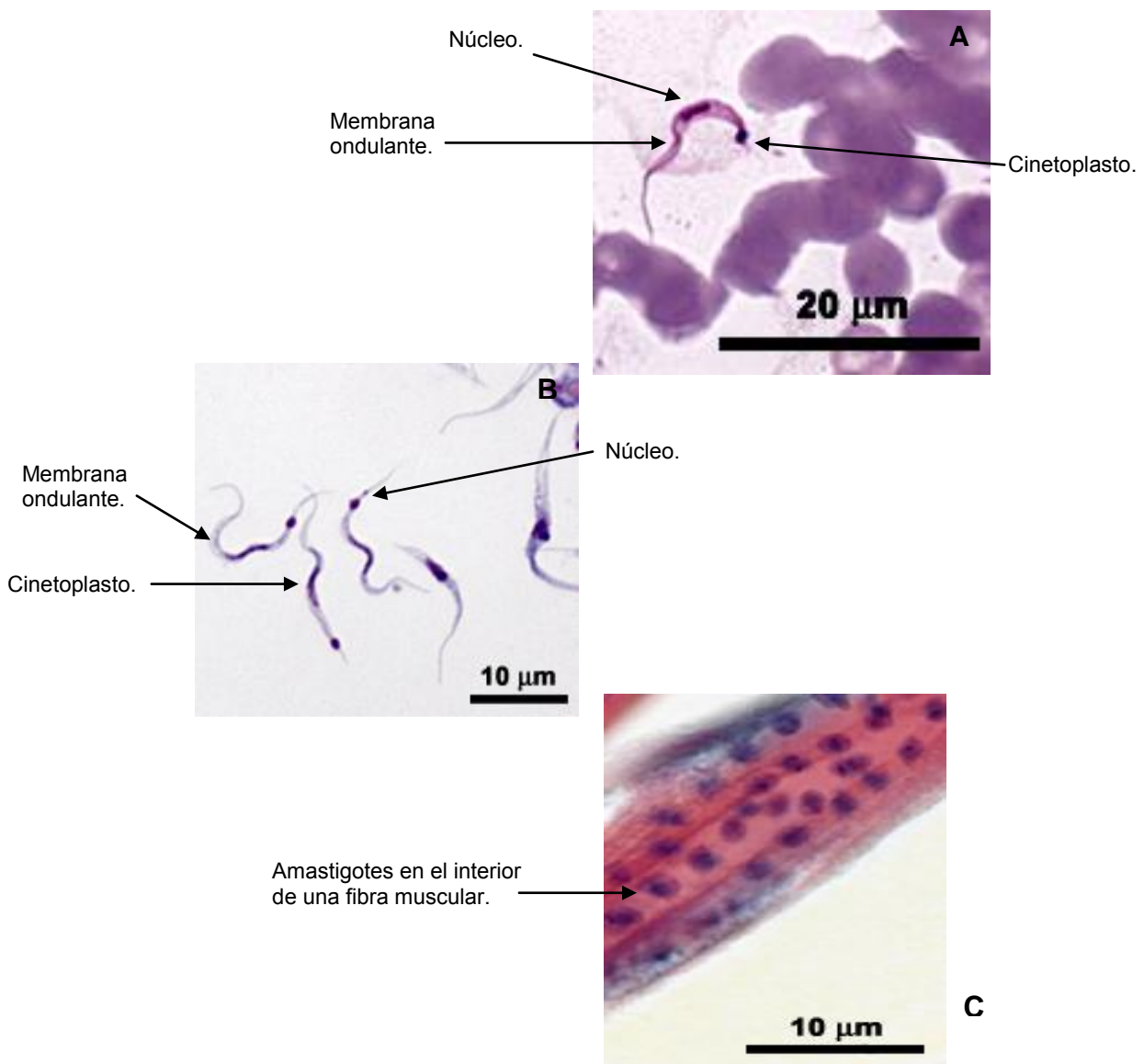


Fig. 4. Fotografías y esquemas que muestran los estadios de *T. cruzi*. A) Tripomastigote en sangre; B) Epimastigote forma replicativa en el vector; C) Amastigote forma intracelular. Tomado y modificado de: <http://www.telmeds.org/AVIM/Apara/flagelados/Trypanosoma/Trypanosoma.htm>.



### I.4. 3. Ciclo de vida

Se inicia cuando un triatomino no infectado pica y succiona sangre de un mamífero que contiene tripomastigotes circulantes, los cuales pasan al intestino del triatomino, se transforman en epimastigotes y se dividen abundantemente por fisión binaria longitudinal. Después de 15 a 30 días de la infección del vector, los tripomastigotes metacíclicos empiezan a aparecer en el intestino posterior del insecto (Acha y Szyfres, 2003). El triatomino durante la noche sale a alimentarse de la sangre de mamíferos. En el caso del humano cuando este se encuentra dormido, el insecto puede picar preferentemente el rostro cerca de la boca o del ojo además de otras áreas del cuerpo, ingiere varias veces su peso corporal en sangre y al mismo tiempo defeca sobre la piel o la mucosa depositando los tripomastigotes metacíclicos infectantes. Posteriormente, estos tripomastigotes se introducen en el mamífero cuando; atraviesan la piel, por el orificio dejado por la probóscide del triatomino o cuando la persona se rasca la picadura contaminando sus dedos con el material fecal y luego se frota los ojos, dando lugar a la infección (Acha y Szyfres, 2003).

Una vez dentro del mamífero, los tripomastigotes metacíclicos se introducen a las células del tejido cercano al sitio de entrada del parásito, dentro de las células el tripomastigote se transforma en amastigote, el cual se divide por fisión binaria hasta lisis a la célula. Saliendo a circulación se transforman rápidamente en tripomastigotes sanguíneos, propagándose a través de la sangre por todo el cuerpo. Después, entran nuevamente a células de diferentes tejidos donde se transforman en amastigotes y se vuelven a dividir, lisando las células y así repitiendo el mismo mecanismo. El ciclo se completa cuando un triatomino no infectado pica a un mamífero infectado, ingiriendo sangre y tripomastigotes circulantes (Tay *et al.*, 2002), (Fig. 5).

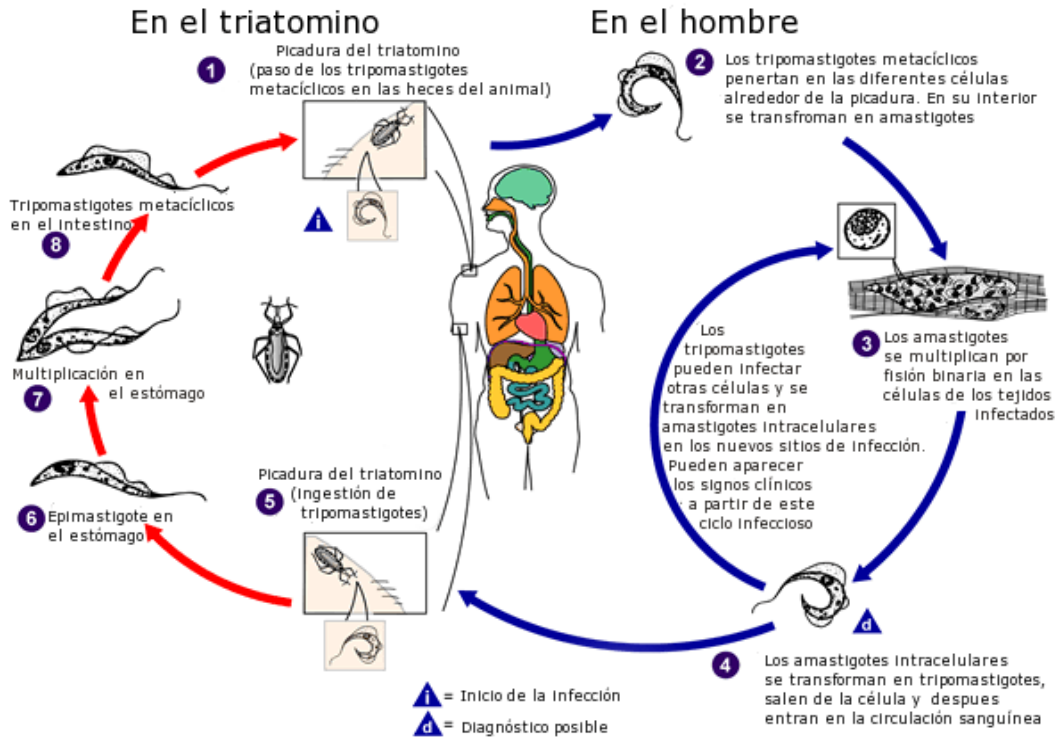


Fig. 5. Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*. El esquema muestra los distintos procesos por los que el parásito pasa hasta infectar una célula de mamífero. Este ciclo es aplicable tanto al humano como a mamíferos silvestres o domésticos. Tomado de <http://www.dcp.cdc.gov/dpdx>

### I.5. VARIABILIDAD GENÉTICA DE *T. CRUZI*

Aunque el humano es un hospedero reciente en la historia evolutiva de *T. cruzi*. Se ha encontrado evidencia molecular acerca de la presencia de ADN de *T. cruzi* en momias exhumadas en el norte de Chile y sur de Perú de hace 9,000 años (Aufderheide *et al.*, 2004).

*T. cruzi* existe en dos ecosistemas: en el primero se encuentra relacionado con la infección a triatominos y mamíferos silvestres (ciclo selvático) y el segundo donde la infección ocurre en triatominos adaptados a condiciones domésticas, pero principalmente al hombre y mamíferos domésticos (ciclo doméstico).

La estructura de la población de *T. cruzi* a sido examinada a múltiples niveles, encontrando que *T. cruzi* es un grupo heterogéneo. En un primer paso, la diversidad genética de *T. cruzi* fue revelada por el análisis de marcadores enzimáticos. Miles y colaboradores, en los 70' determinaron la presencia de tres diferentes grupos de cepas las cuales se denominaron Zimodema 1 (Z1), 2

(Z2) y 3 (Z3). El Z1 se encuentra principalmente asociado a marsupiales y triatominos silvestres mientras que Z2 se vinculó a humanos y mamíferos domiciliados. Estudios adicionales mostraron un tercer grupo el cual se nombró como Z3, asociado al ambiente silvestre (Miles *et al.*, 1977, 1980).

Mediante el análisis de los fragmentos de restricción de regiones polimórficas de ADN (RFLP) (Morel *et al.*, 1980), cariotipos moleculares (Henrikson *et al.*, 1993), huellas de ADN (Macedo *et al.*, 1992) y amplificación al azar del ADN polimórfico (RAPD) (Steindel *et al.*, 1993; Tibayrenc *et al.*, 1993) se comprobó una vez más la compleja heterogeneidad presente en este protozoo. Alternativamente, cuando los marcadores derivados de genes constitutivos comenzaron a ser usados, la amplificación de mini-exon, y el 24S<sub>r</sub> del RNA ribosomal, demostraron, que *T. cruzi* podía ser dividido en dos grupos mayores bien definidos que coincidían en lo general con la dicotomía enzimática propuesta anteriormente (Tibayrenc, 1995, Souto *et al.* 1996, Fernandes *et al.* 1998).

Las cepas de *T. cruzi* se clasificaron como *T. cruzi* I (TcI) y *T. cruzi* II (TcII), (Anonymous, 1999).

A pesar de lo anterior, cada grupo mostró ser heterogéneo, encontrando cinco subgrupos en *T. cruzi* II: Ila, IIb, IIc, IId y IIe. Tales resultados se demostraron por estudios con microsatélites (Macedo *et al.*, 2001; Oliveira *et al.*, 1998) y amplificación al azar del ADN polimórfico (RAPD) (Bernabé *et al.*, 2000, Brisse *et al.*, 2000).

Sin embargo, se observaron algunas incongruencias en las genealogías genéticas entre los subgrupos debido probablemente a un intercambio genético entre los distintos linajes de *T. cruzi*. Demostrando la presencia de cepas heterocigotas las cuales se denominaron híbridas (Machado y Ayala, 2001).

Se propuso que el origen de los subgrupos Ila, IIc, IId y IIe fue debido a dos eventos discretos de intercambio genético entre cepas de *T. cruzi*, probablemente de forma sexual. Cabe mencionar que *T. cruzi* se reproduce por fisión binaria mostrando un genotipo diploide y una progenie clonal.

De tal forma que en el primer evento hubo un intercambio genético entre las cepas parentales I y II o IIb dando a los subgrupos Ila y IIc con carácter de híbridos homocigotos. El segundo evento de intercambio genético ocurrió entre la cepa IIc y la cepa parental II, resultando en descendientes híbridos

heterocigotos (IId y Ile). Tal propuesta se basa en los resultados obtenidos tras el análisis de marcadores moleculares tanto nucleares como mitocondriales (De Freitas *et al.*, 2006; Pena *et al.*, 2009; Sturm y Campell, 2009).

Es importante considerar que la nomenclatura propuesta para los distintos grupos de *T. cruzi* suele ser discordante. Ya que en la literatura, se han denominado zimodemas, clonas, linajes, clados, haplotipos, y actualmente Unidades Taxonómicas Discretas (DTUs) (Sturm y Campell, 2009). Debido a lo anterior la comunidad científica recomendó recientemente que la nomenclatura para las cepas de *T. cruzi* debe ser clasificada en seis DTUs, *T. cruzi* I-VI, que incluyen los subgrupos de los grupos mayores, con las siguientes abreviaciones TcI, TcII, TcIII, TcIV, TcV, TcVI (Zingales *et al.*, 2009).

### I. 5. 1. Implicaciones de la variabilidad genética de *T. cruzi*

La composición genética y estructura poblacional de *T. cruzi* podría estar relacionada con una distribución geográfica y especificidad por un hospedero y cuadro clínico de la enfermedad (Sturm y Campell, 2009).

El TcI predomina principalmente en el sur de Estados Unidos de Norte América, México y América central y en la parte norte de Sudamérica. Por otra parte TcII y los grupos híbridos TcV (IId) y TcVI (Ile) se encuentran en los países del cono sur. TcIV (IIa) abunda desde Estados Unidos de Norte América hasta la amazona (Coura *et al.*, 2002, Martins *et al.*, 2008), mientras que TcIII (IIc) a sido aislado en países Sudamericanos (Lewis *et al.*, 2009).

Tales observaciones han conducido en general, pero no absolutamente, y sobre todo para Sudamérica, a la asociación de TcI con cuadros clínicos de la enfermedad poco severos y a la transmisión vía ciclo silvestre. En contraste, los grupos TcII, TcV y TcVI se han asociado con cuadros clínicos graves de la enfermedad y la transmisión vía ciclo doméstico (Fernandes *et al.*, 1999, Souto *et al.*, 1996).

### I. 5. 2. Cepas de *T. cruzi* en México

La caracterización tanto biológica como molecular de las cepas de *T. cruzi* mexicanas realizada por López-Olmos y colaboradores en 1998, por primera vez mostró de manera clara que todos los aislados analizados

mostraban un patrón isoenzimático único que las relacionaba y separaba de grupos provenientes de Brasil (Lopez- Olmos *et al.*, 1998).

En el 2002 Bosseno y colaboradores por medio del análisis de RAPD, determinó que las cepas mexicanas analizadas se agrupaban de manera bastante homogénea dentro del grupo TcI. Es importante mencionar que se observó un reducido polimorfismo entre las cepas, ya que éstas fueron colectadas de una variedad de hospederos vertebrados e invertebrados del ciclo doméstico y silvestre (Bosseno *et al.*, 2002).

Resultados que se corroboraron en el trabajo de Sánchez-Guillen y colaboradores en el 2006. En el cual, tres cepas provenientes de vectores fueron caracterizadas por electroforesis de enzimas multilocus (MLEE) y RAPD así como por biotintas, concluyendo que estas cepas pertenecen al grupo mayor de TcI (Sánchez- Guillen *et al.*, 2006).

### I. 6. TRANSMISIÓN

La infección por *T. cruzi* se puede llevar a cabo de diversas maneras. Así los mecanismos de transmisión se han dividido en dos grupos; (i) por medio de los vectores (triatominos), transfusión sanguínea, transmisión oral, y la transmisión congénita (ii) y los mecanismos que pueden ocurrir por accidentes de laboratorio, contacto con animales infectados, o trasplante de órganos (Coura y Dias, 2009).

La infección por *T. cruzi* es una zoonosis transmitida de manera natural en unidades ecológicas geográficamente bien definidas. Estas unidades ecológicas están compuestas por mamíferos selváticos o domésticos, así como por insectos vectores, ambos infectados por *T. cruzi* (Moncayo y Silveira, 2009). Debido a que el humano tiende a modificar su medio ha entrado en contacto con estos insectos vectores, por lo que la principal vía de transmisión, como se dijo, es el modo vectorial a través de las excretas de los triatominos infectados (WHO, 2002) (Fig. 6).



Fig. 6. *Triatoma dimidiata*, insecto vector de la infección por *T. cruzi*. Este insecto también es conocido como chinche besucona. Colectado en Veracruz. Tomado de <http://unibio.unam.mx/chagmex/index2.htm>

En la última década se han reportado casos de infecciones masivas en países de América central y Sudamérica, debido a la transmisión oral, la cual ocurre por el consumo de alimentos contaminados con triatominos, sus heces o productos crudos de animales infectados (Dias, 2006).

En el caso de la transmisión congénita, el riesgo depende de la cepa del parásito, de los niveles de parasitemia de la madre, de daños en la placenta o de la zona geográfica (WHO, 2002).

Los trasplantes de órganos pueden ser otro factor de riesgo para la infección por *T. cruzi*. En los países endémicos se han reportado diversos casos, donde los receptores de órganos de individuos chagasicos crónicos presentan la fase aguda de la enfermedad (WHO, 2002).

### I. 7. ENFERMEDAD DE CHAGAS

En la práctica médica y veterinaria se han asociado ciertas características de los procesos infecciosos que nos permiten reconocer las fases clínicas de la enfermedad. En la infección de mamíferos por *T. cruzi* se han considerado dos estados sucesivos denominados: fase aguda y la fase crónica (Teixeira *et al.*, 2006).

#### I. 7. 1. Fase aguda

Comienza con la entrada del parásito al hospedero, lo cual puede generar una reacción inflamatoria en la zona de entrada conocido como chagoma, o en su caso, un edema unilateral presente en el ojo denominado signo de Romaña (WHO, 2000) (Fig. 7 A).

Durante la fase aguda puede ser común que no se presenten síntomas. Si estos se llegan a presentar son caracterizados por fiebre alta, cefalea, taquicardia, crecimiento del hígado, bazo y ganglios (OPS, 2003), esta manifestación puede declinar entre las 4 y 8 semanas posteriores a la infección. En casos agudos mortales los síntomas presentes son: daños al corazón, meningitis y encefalitis (WHO, 2002). Durante esta etapa el diagnóstico de la enfermedad es difícil y a veces suele confundirse con otras enfermedades.

### I. 7. 2. Fase crónica

Los individuos infectados crónicamente pueden permanecer por largos periodos de su vida en una fase indeterminada o crónica asintomática. La fase indeterminada se caracteriza por ser positivo para la presencia de anticuerpos IgG anti-*T. cruzi* y parásitos en sangre, así también como la ausencia de síntomas y signos de la enfermedad, sin anomalías en electrocardiograma, tamaño normal del corazón, esófago y colon (Teixeira *et al.*, 2006).

Después de 20 o 30 años un 30% de los individuos infectados se verán comprometidos con problemas cardíacos que los llevarán a la muerte lo que se conoce como Cardiopatía Chagásica Crónica. Las principales manifestaciones son daños al corazón, arritmias y tromboembolismos (Fig. 7 B).

Los síntomas de la enfermedad también se ven relacionadas con desordenes gastrointestinales. Las alteraciones esofágicas al tragar, son síntomas asociados a megaesófago; por otro lado constipación y úlceras rectales que son señales de megacolon (Teixeira *et al.*, 2006) (Fig. 7 C, D). Siendo los anteriores, los principales síntomas de la enfermedad de Chagas digestiva. Cabe mencionar que también hay daños al sistema nervioso periférico, al estómago, duodeno, yeyuno e íleon debido a la denervación neurovegetativa entérica (WHO, 2002), estas manifestaciones clínicas afectan a individuos independientemente de ser asociados con daños cardíacos (Teixeira *et al.*, 2006).

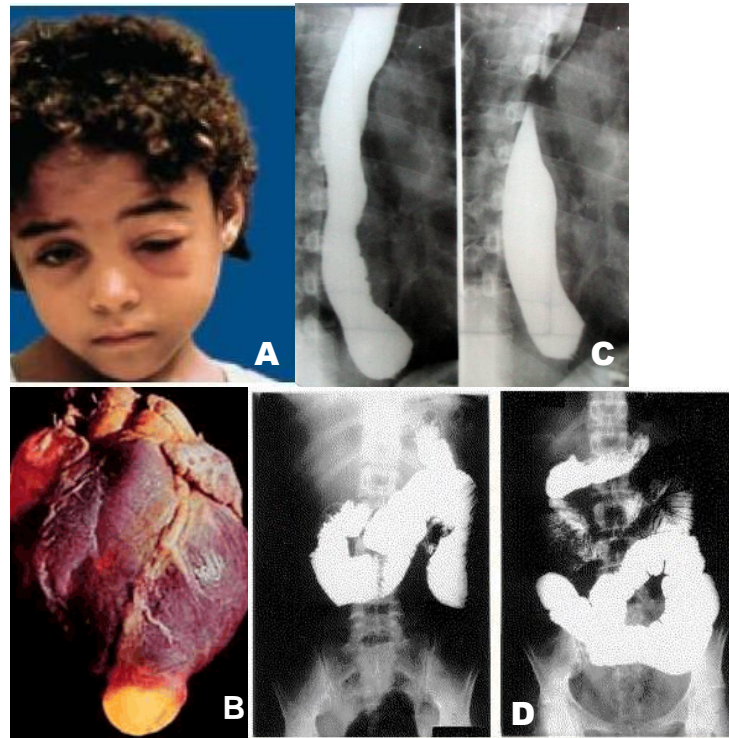


Fig. 7. Principales manifestaciones de la enfermedad de Chagas. A) Muestra edema unilateral denominado signo de Romaña; B) Aneurisma apical de ventrículo izquierdo secundario a cardiopatía chagásica; C) Dos radiografías con presencia de megaesófago y D) Dos radiografías con presencia de megaduodeno (izquierda inferior) y megayeyuno (derecha inferior).

A) Tomado y modificado de [www.msgpp.org/chagas.shtml](http://www.msgpp.org/chagas.shtml)

B) Tomado y modificado de [www.cardioaragon.com/doc.php?op=revista3&id=1...](http://www.cardioaragon.com/doc.php?op=revista3&id=1...)

C y D) Tomado de [www.enfermedadchagas.com.ar/MEGAVISCERAS.htm](http://www.enfermedadchagas.com.ar/MEGAVISCERAS.htm)

### I. 7. 3. Patología

*T. cruzi* es capaz de infectar cualquier tejido. De cualquier modo la intensidad de la infección dependerá del fondo genético del hospedero y del parásito (Teixeira *et al.*, 2006).

Durante la infección por *T. cruzi* diversas células se pueden encontrar eventualmente parasitadas por amastigotes; como fibras musculares, neuronas y células de hígado, riñones, tiroides, páncreas y otras glándulas (Teixeira *et al.*, 2006).

En la fase aguda, durante la entrada del parásito al hospedero, sólo se observa, la presencia de focos inflamatorios en la zona de infección, constituidos principalmente por leucocitos periféricos. Con respecto a los órganos por los cuales tiene tropismo *T. cruzi*, puede no haber anomalías, o hasta presentarse alteraciones en las fibras cardíacas parasitadas con amastigotes, con o sin reacción inflamatoria periférica o síntomas de



meningoencefalitis como focos microhemorrágicos e infiltrado inflamatorio (WHO, 2002).

Durante la fase indeterminada las lesiones inflamatorias en el corazón, tracto digestivo y músculo esquelético son mínimas o similares a la fase crónica (Teixeira *et al.*, 2006). Sin embargo, en la fase crónica se presenta la cardiomegalia la cual se debe a una combinación de hipertrofia, dilatación y alteración de la arquitectura muscular del corazón causado por la presencia de necrosis, fibrosis e hipertrofia de las fibras musculares asociado a los focos inflamatorios (WHO, 2002). En el caso de las formas digestivas encontramos la destrucción de las fibras musculares lisas debido al infiltrado inflamatorio, a pesar de esto los síntomas se relacionan con la pérdida de las neuronas del sistema parasimpático, es decir, los Plexus de Auerbach y Meissner. La pérdida de estas neuronas se asocia a la muerte celular de las células ganglionares causada por el infiltrado inflamatorio (Teixeira *et al.*, 2006).

Después del esófago y el colon, el duodeno es el tercer órgano más afectado por la dilatación (por la denervación parasimpática) en la enfermedad de Chagas. La dilatación puede quedar limitada al bulbo duodenal o arco duodenal, o puede estar presente en toda la región. El megaduodeno raramente aparece como manifestación aislada, sino que casi siempre se asocia a megaesófago, megacolon o a ambos.

Las dilataciones del yeyuno y del íleon son poco comunes, estas dilataciones también son resultado de la denervación del sistema nervioso entérico. Las consecuencias funcionales de estas patologías son: modificación en la motilidad del bolo, absorción acelerada de monosacáridos y alteraciones de la mucosa (WHO, 2002).

### **I. 7. 4. Tratamiento**

En el tratamiento de la enfermedad de Chagas los fármacos que han jugado un rol importante son el nifurtimox (derivado del nitrofurano), y el benznidazol (derivado del nitroimidazol). Anteriormente, estos fármacos eran aplicados solamente a individuos en fase aguda; sin embargo, se han demostrado beneficios al ser aplicados tanto en la fase aguda como en la fase crónica de la enfermedad mostrando una reducción en el daño tisular, así como en los niveles de parasitemia (WHO, 2002).

Aunque se ha demostrado que el benznidazol y el nifurtimox son fármacos potentes en la eliminación de *T. cruzi*, es relevante la búsqueda de nuevos fármacos que puedan ser administrados durante menos tiempo y con menos efectos secundarios. Así se ha determinado que los inhibidores de la síntesis de esteroides, inhibidores de la prenilación de proteínas, inhibidores de proteasas y análogos de fosfolípidos sean agentes quimioterapéuticos potencialmente importantes (WHO, 2002).

### I. 8. INMUNIDAD A *T. CRUZI*

La respuesta inmune a la infección por *T. cruzi* es compleja, y diferentes patrones de la respuesta pueden ocurrir en distintos compartimentos del sistema inmune, incluyendo expansión celular, producción de citocinas, y muerte celular (De Meis *et al.*, 2009).

Durante la fase aguda de la infección, la respuesta inmune es dependiente de la respuesta innata y adquirida. La cual es mediada por macrófagos, células NK y linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, así como linfocitos B. Por otro lado las citocinas IL-12, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  juegan un rol crítico en la inmunidad protectora.

Las citocinas anti-inflamatorias (Th2) IL-4 e IL-10 regulan al sistema inmune, evitando la patología por la intensa actividad de las citocinas Th1. Por lo que un desbalance entre las células Th1/Th2 pueden conducir a un incremento y persistencia de parásitos en el tejido, así como daño tisular (Abrahamsohn, 1998).

En un inicio IL-12 media la inmunidad aumentando la producción de IFN- $\gamma$  por las células NK el cual es requerido para la producción de NO por los macrófagos, así como la subsecuente inducción de la respuesta Th1 (Reyes *et al.*, 2006). Otra citocina importante en la inducción de la respuesta inmune innata es MIF, que al contrario de lo observado en otras enfermedades como la colitis crónica o la artritis reumatoide donde desempeña un rol inhibitorio en la actividad de los macrófagos y células T, durante la infección con *T. cruzi* se ha demostrado que es capaz de inducir la secreción de citocinas pro-inflamatorias como TNF- $\alpha$  y por tanto aumentar la actividad microbicida de los macrófagos (Reyes *et al.*, 2006).

TLR4, TLR2 y TLR9 han sido implicados en el reconocimiento de los antígenos GPI de *T. cruzi*, la activación de los macrófagos por estos receptores es esencial en la inducción de la respuesta innata (Melo, 2009). En conjunto TNF- $\alpha$  y IFN- $\gamma$  estimulan la fagocitosis, la inflamación y la producción de óxido nítrico (NO), contribuyendo así al control del parásito. También, favorecen la diferenciación de las células T CD4<sup>+</sup> hacia la respuesta tipo Th1 la cual es considerada protectora ante la infección por *T. cruzi* (Abrahamsohn, 1998, Gutiérrez *et al.*, 2009).

Durante la activación clásica de los macrófagos se induce a cambios metabólicos tales como el aumento en la actividad de la óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS), estallido respiratorio y una respuesta secretora en la cual se producen tanto citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-12, IL-1, IL-6) como quimiocinas (MIP-1 $\alpha$ , MCP-1) (Taylor *et al.*, 2005). También exhiben cambios morfológicos como: aumento de tamaño, presencia de núcleos irregulares, incremento en el número de vesículas, lisosomas y pseudopodos (Melo *et al.*, 2003).

En la interacción entre macrófagos-*T. cruzi*, se ha visto que los macrófagos son capaces de expresar receptores de sialoadhesina. Este receptor reconoce ácido sialico, presente en altas cantidades en la superficie del parásito, por lo que tiene un importante papel en los procesos de adherencia de *T. cruzi* durante la fagocitosis (Monteiro *et al.*, 2005).

Por otra parte los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> son cruciales en el desarrollo de la respuesta inmune adaptativa y por lo tanto, de la evolución de la infección en el hospedero. Los eventos para el control de la infección se ven dirigidos por el perfil de citocinas que establecen una respuesta tipo Th1 (Kumar y Tarleton, 2001). Los linfocitos T CD8<sup>+</sup> son esenciales en el control del parásito. Estos linfocitos reconocen péptidos foráneos por MCH I, tales como transialidasa y GPI las cuales son moléculas de superficie presentes en el parásito. Permitiendo que inicie la respuesta, cuya función es la muerte de células infectadas por el parásito, por lo que controla el crecimiento de éste. También actúan sobre otras células por medio de la secreción de IFN- $\gamma$ , como puede ser la activación de macrófagos el cual ejercerá la actividad tripanocida vía NO (Martín y Tarleton, 2004).

Durante la fase crónica, la carga parasitaria se ve controlada principalmente por linfocitos T CD8<sup>+</sup>, los cuales en su mayoría exhiben

fenotipos de células T efectoras o de memoria (Martín y Tarleton, 2005). Sin embargo, la proliferación de estas células de memoria se puede ver afectada por la persistencia del parásito en algunos tejidos, principalmente en el timo y en los tejidos linfoides secundarios con una disfunción asociada al parasitismo en estos tejidos (De Meis *et al.*, 2008).

Los linfocitos T CD4<sup>+</sup> que producen las citocinas IL-2 e IFN- $\gamma$  han demostrado ser importantes en la protección sistémica contra un amplio rango de patógenos. Estos linfocitos tienen la capacidad de activar macrófagos para la eliminación del parásito. Es importante mencionar que linfocitos T CD4<sup>+</sup> Th1 pueden ser directamente citolíticos a células infectadas, así como ayudar a la expansión de los linfocitos T CD8<sup>+</sup>. Por lo que los linfocitos T CD4<sup>+</sup> Th1 son importantes en la protección contra *T. cruzi*. La producción de IFN- $\gamma$  por los linfocitos T CD4<sup>+</sup> ha demostrado que es esencial en el control de *T. cruzi* principalmente durante la fase aguda (Hoft *et al.*, 2000).

Ahora bien, los linfocitos T reguladores (Treg) también se encuentran involucrados en la dinámica de la respuesta inmune en la infección por *T. cruzi*.

Se ha propuesto que la expansión de las células Treg durante la fase indeterminada limita el daño al tejido, por lo tanto, se han asociado al mantenimiento de un estado indeterminado en individuos (Sathler-Avelar *et al.*, 2009). Sin embargo, durante la fase aguda Kotner y Tarleton, (2007) demostraron que las células Treg no juegan un rol pivotal en la supresión de una respuesta inmune benéfica o perjudicial, en beneficio del parásito o del hospedero, respectivamente. Ya que en sus experimentos se observó que no hay diferencias entre ratones control y ratones a los cuales se inhibió la actividad de las células Treg. De esta manera se presume que *T. cruzi* ha adoptado otros mecanismo de evasión de la respuesta inmune independiente de la supresión mediada por las células Treg en una respuesta inmune específica a *T. cruzi*. También, se ha averiguado que las células Treg no juegan un rol en la regulación de las células CD8<sup>+</sup> residente en el músculo de ratones crónicamente infectados.

Otros linfocitos involucrados en la respuesta inmune a *T. cruzi* son los linfocitos B que al poder funcionar como células presentadoras de antígeno pueden contribuir a la generación y mantenimiento de las células T efectoras (Cardillo *et al.*, 2007).

Se ha observado que tras la infección experimental con *T. cruzi* en ratones depletados (KO) para linfocitos B hay un decremento en la generación de células T CD4<sup>+</sup> efectoras y de memoria siendo igual para las células T CD8<sup>+</sup> por lo que hubo altas parasitemias en sangre y tejido. De tal manera que los linfocitos B son importantes para la expansión y mantenimiento de las células T efectoras y de memoria durante la fase aguda y crónica de la enfermedad (Cardillo *et al.*, 2007).

Cabe mencionar que los linfocitos B también interactúan con los linfocitos T  $\gamma\delta$ . Por lo que los linfocitos B podrían mediar sus efectos sobre los linfocitos T convencionales a través de los linfocitos T  $\gamma\delta$  (Spanner y Cohen, 1995).

Durante la infección el isotipo de anticuerpo predominante es IgG en sangre el cual muestra ser muy eficiente en la fijación del complemento y eliminación del parásito, lo que sugiere que es un importante componente de la respuesta inmune durante la fase crónica (Cardillo *et al.*, 2007).

Algunos estudios sobre los títulos de IgG se han asociado a pacientes que presentan formas cardíacas de la enfermedad. En México se ha observado en pacientes chagasicos que las subclases IgG1 e IgG2 predominan sobre IgG3, mientras que los niveles de IgG4 fueron los más bajos en la infección por *T. cruzi*. La expresión de las cuatro subclases de anticuerpos anti-*T. cruzi* sugiere una mezcla de las respuestas Th1 y Th2, tal vez debido a la continua estimulación por el antígeno. Ya que las subclases IgG1 y 2 son inducidas por la respuesta Th1, mientras que IgG3 y 4 se asocian con Th2 (Hernández-Becerril *et al.*, 2001).

Dos Santos y colaboradores (2009) han asociado la variación en el perfil de inmunoglobulinas a la diversidad genética presente en *T. cruzi*. Por otro lado, se ha visto que antígenos como la cruzipaina inducen particularmente la secreción de IgG y tras una inoculación oral estimula a la IgA secretora (SIgA) (Schnap *et al.*, 2002). Así, los perfiles de anticuerpos se ven influidos por diversos factores propios de la infección y del parásito.

La detección de otros anticuerpos como IgA en suero se ha asociado a formas digestivas (Primavera *et al.*, 1988). Así, como en recién nacidos cuyas madres están infectadas, siendo importante en la protección congénita (Di Pentima y Edwards, 1999).

Una vez que se han descrito las funciones efectoras de los linfocitos es importante mencionar que *T. cruzi* es capaz de evadir la respuesta inmune al regular de manera negativa a los linfocitos T activados, por medio de mecanismos que inducen apoptosis (DosReis y Lopez, 2009) como la activación de la muerte celular inducida (AICD, por sus siglas en inglés) (Kramer *et al.*, 2007), el exceso en la producción de NO (Martins *et al.*, 1998), la activación policlonal de linfocitos y la liberación de antígenos por parte del parásito como TS y HSP70 (Marañón *et al.*, 2000). Favoreciendo el crecimiento de *T. cruzi*.

Ahora bien, el papel que juega cada tejido del sistema inmune en la respuesta a la infección por *T. cruzi* es diferente. En el caso del timo se ha demostrado que puede ser poblado por el parásito y que durante la fase aguda de la infección se atrofia. La pérdida de timocitos aparentemente no es solo por la muerte celular, sino también por la migración a tejidos periféricos y posterior proliferación en éstos. También se observa un decremento de la citosina IL-12 y un incremento en la producción de IL-4, IL-5, IL-6 e INF- $\gamma$  (De Meis *et al.*, 2009).

En el caso de los nódulos linfáticos mesentéricos (MLN, por sus siglas en inglés) y placas de Peyer es poca la información disponible. En ratones se observa una reducción en el tamaño y número de MLN y placas de Peyer, así como, en el número de células que las componen debido a la eliminación de linfocitos T y B (Antunez *et al.*, 1997). Por lo que hay una reducción en la producción de citocinas por linfocitos T activados durante la fase aguda. Pero en la fase crónica se ha visto que las células de los MLN juegan un papel protector contra la infección, ya que se presenta cierta recuperación en el número de células presentes.

Sin embargo, no es el mismo fenómeno observado en el bazo y en los nódulos linfáticos subcutáneos (SCLN, por sus siglas en inglés), donde hay un incremento en la activación policlonal de los linfocitos T/B, en la proliferación, así como un incremento de IL-2, IL-4, IL-10 e INF- $\gamma$  para el caso de SCLN, mientras que en el bazo hay un decremento IL-2 y un incremento de IL-4, IL-10 e IFN- $\gamma$  (De Meis *et al.*, 2009).

### I. 8. 1. Respuesta inmune en el tracto digestivo

El tracto gastrointestinal es el sitio con mayor estimulación antigénica en el cuerpo, mostrando estructuras especializadas del sistema inmune que hacen frente a diversos patógenos (Ver anexo I).

Son pocos los estudios acerca del papel que juega el sistema inmune asociado a intestino en la infección por *T. cruzi*; sin embargo, estudiar este tipo de respuesta es importante, debido a que: 1) la prognosis de la fase crónica depende la evolución de la fase aguda y además el parásito es capaz de infectar intestino y 2) como se sabe pacientes crónicos pueden manifestar formas digestivas.

La respuesta inmune en el tracto digestivo durante la infección por *T. cruzi*, se encuentra constituida por células como: macrófagos, eosinófilos, linfocitos T CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> y B así como células NK (Da Silveira *et al.*, 2007 a). Diversos estudios han encontrado que la patología gástrica se debe al daño causado por la denervación de los ganglios (sistema nervioso enterico) presentes en el tracto gastrointestinal provocado por los linfocitos T, NK, (los linfocitos B no se encuentran asociados al daño), eosinófilos y en particular a la producción de NO por macrófagos (Corbett *et al.*, 2001, Da Silveira *et al.*, 2007 b). Estas células también se encuentran involucradas en la formación de fibrosis por lo menos en colon de individuos chagasicos (García *et al.*, 1999, Arantes *et al.*, 2004, Da Silveira *et al.*, 2007 a).

## II. Justificación

---

La enfermedad de Chagas debe ser considerada de importancia para la salud pública debido al cuadro clínico y patología que presenta. Además, en nuestro país *T. cruzi* presenta diferencias genéticas, biológicas y por lo tanto también diferencias en el grado de infectividad, parasitemia, tropismo y en la respuesta inmune desencadenada en el hospedero. *T. cruzi* también, puede infectar cualquier órgano incluyendo el intestino. Sin embargo, no hay datos sobre la capacidad de las cepas mexicanas de infectar este órgano.

Cabe mencionar que hay reportes en la literatura acerca del estudio inmunológico hecho a diferentes cepas en Sudamérica. Sin embargo, son pocos los reportes realizados a cepas mexicanas, por lo que es necesario realizar estudios más profundos, en particular por que las cepas mexicanas presentan mayoritariamente el genotipo TcI, al contrario de lo observado en las cepas sudamericanas las cuales presentan además los genotipo TcII al TcVI.

Por los motivos anteriores se decidió llevar a cabo la investigación en un modelo experimental para averiguar las diferencias en la producción y tipo de anticuerpos, así como los fenotipos celulares *in situ* que desempeñan papeles importantes en la respuesta inmune durante la invasión a intestino por dos cepas mexicanas del genotipo TcI con alta variabilidad biológica lo que probablemente implica diferencias en la patología y respuesta inmune inducida en el hospedero vertebrado.



### III. HIPÓTESIS

---

Si hay diferencias biológicas entre las cepas mexicanas de *T. cruzi*, entonces, estas pueden inducir diferencias en el grado de respuesta inmune por parte del ratón, por lo que se esperaría encontrar diferencias en la producción de anticuerpos y tipos celulares del sistema inmune durante la infección del intestino delgado del ratón.

### IV. OBJETIVOS

---

#### IV. 1. Objetivo general.

Estudiar la respuesta inmune en el tubo digestivo de ratones infectados con dos cepas mexicanas de *T. cruzi*.

#### IV. 1. 2. Objetivos particulares.

Evaluar la presencia de parásitos en las diferentes secciones del intestino delgado.

Determinar la diferencia y el grado de inflamación en la infección inducida por ambas cepas con inóculos iguales.

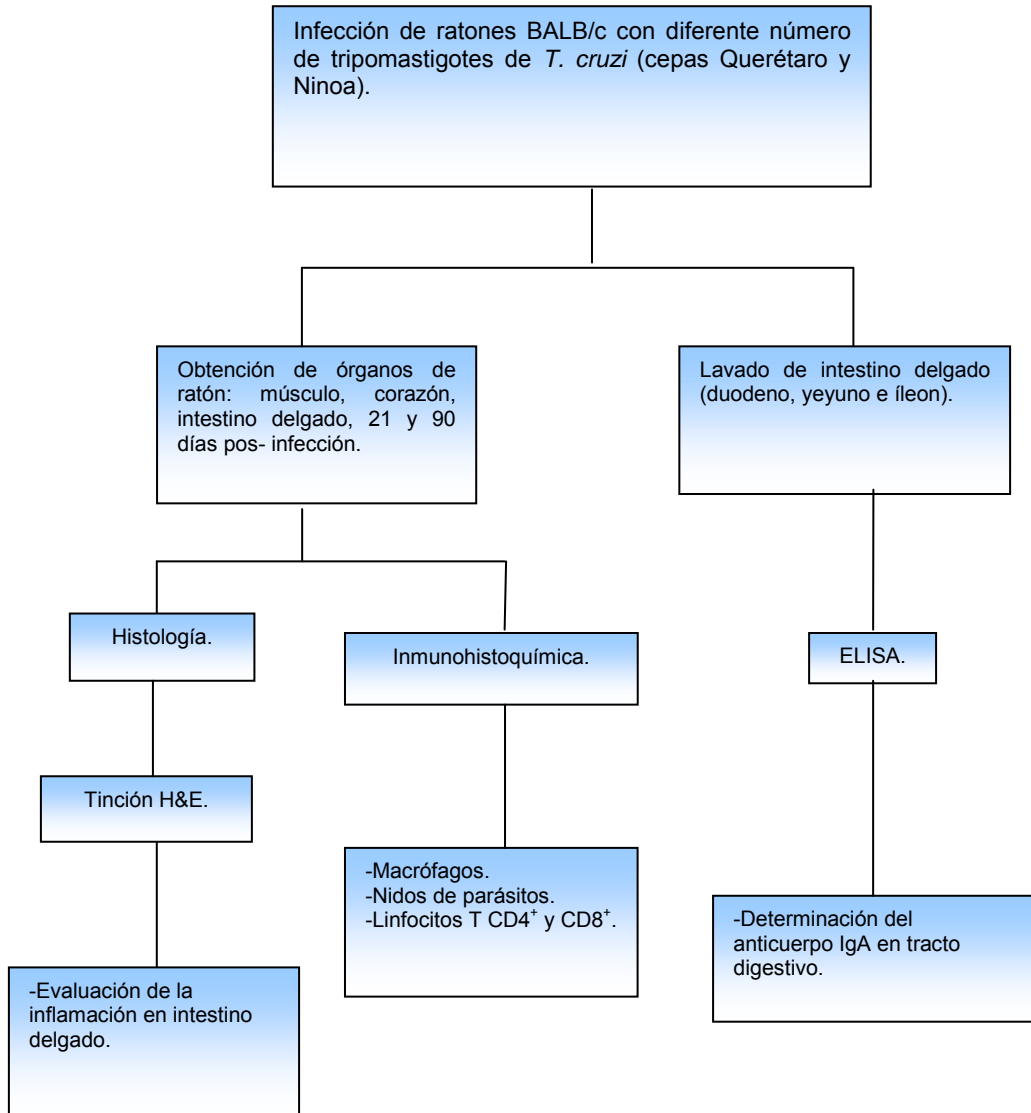
Determinar la presencia de macrófagos en las diferentes secciones del intestino delgado.

Evaluar las poblaciones de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>.

Determinar la presencia del anticuerpo IgA contra *T. cruzi* en la luz intestinal para cada una de las cepas.

## V. DISEÑO EXPERIMENTAL.

---



## VI. MATERIAL Y MÉTODOS

---

### VI. 1. RATONES

Se utilizaron ratones hembras de la cepa BALB/c de entre 7-8 semanas de vida, proporcionadas por el bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas Básicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Estos fueron mantenidos en condiciones de luz y temperatura controlada, así como de alimentación y agua *ad libitum* (Suckow *et al.*, 2001).

Se llevo a cabo un experimento en el que se utilizo un grupo de 24 ratones, los cuales se dividieron en tres grupos experimentales de la siguiente forma; 8 ratones infectados con la cepa virulenta Querétaro, 8 ratones infectados con la cepa no virulenta Ninoa y 8 ratones utilizados como grupo control. Se tomaron 4 ratones por cada grupo infectado y 2 ratones del grupo control para ser utilizados en cada punto experimental, 21 y 90 días post-infección (pi). Los días de evaluación están basados en datos previos de nuestro laboratorio que indican que estos días son representativos de la fase aguda (21días pi.) y crónica (90 días pi.) en el modelo murino (Espinoza *et al.*, 2010).

En un segundo experimento independiente se utilizó un grupo de 12 ratones, los cuales fueron divididos en tres grupos de 4 ratones, un grupo de ratones se infecto con la cepa Querétaro, otro con la cepa Ninoa y el tercer grupo se utilizo como grupo control. Los tres grupos fueron analizados en el punto experimental de 21 días pi; por ser representativo de la fase aguda y por que ha demostrado ser el día con niveles similares de parasitemía entre los grupos con estas cepas.

### VI. 2. PARÁSITOS

Las cepas empleadas en estos experimentos fueron elegidas con base a las diferencias que presentan en el grado de infectividad tanto *in vitro* como en el modelo murino en estudios previos efectuados en el laboratorio (Lopez-Olmos *et al.*, 1998, Espinoza *et al.*, 2010). Ambas cepas pertenecen al cepario del laboratorio de Inmunología de la Dra. Bertha Espinoza, conformado por más de cien aislados mexicanos. La cepa MHOM/MX/1994/Ninoa, la cual será llamada Ninoa con fines prácticos fue aislada de un caso agudo de la

enfermedad de Chagas en humano (Monteón *et al.*, 1996; Bosseno *et al.*, 2002). La cepa ITRI/MX/0000/Querétaro, la cual se llamará Querétaro; fue aislada del vector (Lopez-Olmo *et al.*, 1998). Por estudios previos se ha determinado que ambas cepas pertenecen al genotipo *T. cruzi* I, (actualmente DTU TcI) (Lopez-Olmo *et al.*, 1998; Bosseno *et al.*, 2002).

En el primer experimento, la inoculación de los ratones fue por vía intraperitoneal con 10,000 tripomastigotes sanguíneos en 200 µl de PBS estéril. El grupo control fue inyectado por vía intraperitoneal con el mismo volumen de PBS estéril.

En la realización del segundo experimento independiente, la inoculación de los ratones también se efectuó por vía intraperitoneal, el primer grupo de ratones se inoculó con 1000 tripomastigotes sanguíneos de la cepa Querétaro en 200 µl de PBS estéril, el segundo grupo de ratones fue inoculado con 10,000 tripomastigotes sanguíneos de la cepa Ninoa en 200 µl de PBS estéril y el grupo control se inyectó con un volumen igual de PBS estéril.

### VI. 3. OBTENCIÓN DE ÓRGANOS

Para la obtención de tejido en condiciones de asepsia el material quirúrgico utilizado fueron tijeras y pinzas las cuales previamente se lavaron en agua bidestilada y esterilizado por autoclave. Los ratones del primer experimento fueron sacrificados a los 21 y 90 días pi. En condiciones de esterilidad se extrajeran los órganos requeridos, se comenzó a disectar por la cavidad abdominal realizando una incisión longitudinal al eje de simetría del espécimen; una vez descubierta la cavidad se obtuvieron los siguientes órganos: del intestino delgado; las secciones correspondientes al duodeno en la parte próxima al estómago, el yeyuno en la parte media del intestino delgado y por último el íleon en la parte cercana al ciego anterior al colon (colectando 2 cm de tejido por sección). Los órganos se fijaron en paraformaldehído (Sigma Cat. P-6148) al 4% por una hora, posteriormente se deshidrataron en distintos grados de etanol (70%, 90%, 96%, 100%), se aclararon en xilol y se incluyeron en paraplast (Ver Anexo II).

En el segundo experimento, se llevó a cabo un procedimiento similar al anterior, obteniendo las mismas secciones del intestino delgado; sin embargo,

estos tejidos fueron incluidos inmediatamente en el medio Tissue Teck (OCT compound, Sakura Finetec Cat. 4583) y sometidos a congelación en hielo seco para ser almacenados a  $-70^{\circ}\text{C}$  y realizar cortes por congelación (Ver Anexo III).

### VI. 4. HISTOLOGÍA

Se realizaron cortes de  $5\ \mu\text{m}$  de los tejidos incluidos en paraplast los cuales se colocaron en portaobjetos silanizados (Ver Anexo II) y se dejaron secar a  $40^{\circ}\text{C}$  durante toda la noche. Posteriormente, se desparafinaron en xilol y se rehidrataron en un tren de etanol (100%, 96%, 70%, 50%) seguido por un lavado en agua bidestilada, para después realizar la tinción Hematoxilina/Eosina (H&E). Una vez terminada la técnica se fijaron en resina (Clarion TM Mounting Medium, Sigma Cat. C0487), se dejaron secar toda la noche a temperatura ambiente para posteriormente ser observados al microscopio óptico Nikon modelo 022893 (Japón) (Ver Anexoll).

El tejido incluido en Tissue Tek se atempero de  $-70$  a  $-20^{\circ}\text{C}$  para la realización de cortes de  $7\ \mu\text{m}$  los cuales fueron colocados en portaobjetos cargados positivamente (Fisherbrand, Mocoscope slides. Fisher scientific Cat. 12-550-15, USA). Estos cortes se dejaron secar a temperatura ambiente por dos días, luego fueron almacenados a  $-70^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente se fijaron en paraformaldehído al 4% por 10 min para después realizar la tinción H&E (Ver Anexo III).

### VI. 5. INMUNOFLUORESCENCIA

Para la búsqueda de nidos de amastigotes y macrófagos en las tres secciones de intestino delgado, se llevó a cabo la técnica de inmunofluorescencia indirecta de doble marcaje de manera simultanea (Vizcaíno, 2007).

Laminillas no consecutivas, cuyos cortes tenía una separación de  $100\ \mu\text{m}$  entre sí, fueron desparafinados y rehidratados. Fueron incubados en PBS con albúmina sérica bovina (BSA) 2% durante 1 h para bloquear uniones inespecíficas. Posteriormente estos cortes fueron incubados de manera

simultánea con una mezcla de 50 µl de anticuerpo primario F4/80 biotinilado para la detección de macrófagos (1:50; Caltag Laboratories Cat. MF48015, CA, EUA), más el anticuerpo anti-*T. cruzi* para la detección de amastigotes (1:1000; suero anti- *T. cruzi*), o en el caso del control negativo 50 µl del isotipo IgG2b (1:50; Caltag Laboratories Cat. R2b15), más suero preinmune de conejo (1:1000) preparados en PBS/BSA al 0.5%, durante toda la noche a 4°C en el interior de una cámara húmeda (Ver Anexo IV). Posteriormente, se realizaron lavados con PBS para luego ser incubados de manera simultánea con 50 µl de una mezcla que contenía el conjugado estreptavidina-ficoeritrina (1:500; SA-PE, Caltag Laboratories Cat. SA1004-1), para la detección de macrófagos, más un anticuerpo secundario anti-IgG de conejo acoplado a fluoresceína (1:100; anti-IgG, Sigma Immuno Chemical Cat. F-1262, MO, EUA) para la detección de los amastigotes (preparados en PBS/BSA 0.5%). Tal incubación se llevó a cabo en la oscuridad a temperatura ambiente por 1 h, para luego realizar lavados con PBS. Al término de los lavados se procedió a contrateñir el núcleo celular con el fluorocromo DAPI (1:1000; Molecular Probes. Oregon, EUA) diluido en PBS, después se lavaron con abundante agua destilada para finalmente montarlas utilizando gel para montar (Gel/Mount; Biomedica Corp. Cat. 17985-1, CA, EUA), todo el proceso anterior se realizó bajo la menor cantidad de luz. La fluorescencia fue observada en el microscopio de epifluorescencia, Nikon modelo 022893 (Japón) (Ver Anexo IV).

La cuantificación de nidos de amastigotes y macrófagos se realizó a los 21 días pi, contando el número de campos en los que se observó la presencia de nidos de amastigotes o macrófagos, con respecto al número de campos totales analizados por cada tejido de cada ratón. Las evaluaciones se realizaron con el objetivo 20X (amplificación total de 200X) y se estudiaron 96 campos por cada sección que conforma al intestino delgado para la detección de nidos de amastigotes. Para el caso de macrófagos se estudiaron 144 campos por cada sección del intestino delgado, considerando al grupo control.

### VI. 6. INMUNOHISTOQUÍMICA

La detección de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> se realizó en cortes por congelación, aplicando la técnica de inmunohistoquímica indirecta con revelación enzimática.

Laminillas con series de doce cortes consecutivos fueron atemperadas de -70°C a -20°C por 20 min, al término de este tiempo las laminillas se introdujeron en una caja couplin y se fijaron en acetona fría (-20°C) por 20 min. Después se dejaron secar, y se realizaron tres lavados con PBS para eliminar el Tissue Tek restante, luego los cortes se colocaron en el interior de una cámara húmeda y se incubaron con una solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0.3% por 10 min, nuevamente se realizaron lavados con PBS para posteriormente bloquear uniones inespecíficas incubando el corte con BSA al 2% en PBS durante 1 h. Una vez bloqueado el tejido, se procedió a la colocación de los anticuerpos primarios; anti-CD4<sup>+</sup> (1:50; BD Pharmingen Cast. 550280, USA), un anti-CD8<sup>+</sup> (1:50; AbD serotec Cat. MCA609GA, USA) y un IgG2a (1:50; AbD serotec Cat. MCA1212, USA) como control negativo, éstos se incubaron durante 16 hrs a 4°C, nuevamente se realizaron tres lavados con PBS. Se prosiguió a incubar con el anticuerpo secundario goat anti-IgG-b de rata por 1:30 h a temperatura ambiente (1:2000, Santa Cruz Biotechnology Cat. Sc-2041), se realizaron nuevamente lavados con PBS. Después se incubaron con estreptavidina-peroxidada (1:300, Amersham Biosciences Cat. RPN1231) diluida en PBS, durante 1 h a temperatura ambiente, para finalmente revelar con DAB (SIGMA Cat. D5637-5G) durante 10 min, se contratiñeron con Hematoxilina y se fijaron en resina (Ver Anexo IV).

### VI. 7. LAVADOS INTESTINALES

La obtención de lavados intestinales para el análisis de anticuerpos anti-*T. cruzi* se llevó a cabo al obtener las secciones de Duodeno, Yeyuno e Íleon del intestino delgado, las cuales se colocaron en una caja petri de cristal la cual contenía PBS e inhibidores de proteasa (Ver Anexo VI), se disectaron segmentos libres de heces los cuales se tomaron con unas pinzas y se les colocó una cánula conectada a una jeringa la cual contenía 500 µl de PBS e

inhibidores de proteasas, esta solución se hizo pasar por el interior del segmento de intestino y al salir se colectó en un tubo de 1.5 ml eppendorf etiquetado, posteriormente se centrifugaron a 2500 rpm a 4°C por 10 min. Se colectó el sobrenadante y se almacenó a -20°C para su posterior uso (Ver Anexo V).

### VI. 8. ELISA

De acuerdo a protocolos ya establecidos en el laboratorio para la detección de anticuerpos anti-*T. cruzi* en suero (Sánchez *et al.*, 2001), se establecieron las condiciones para llevar a cabo la técnica de ELISA para la detección de anticuerpos anti-*T. cruzi* en la luz intestinal.

En primer lugar se modificó la concentración a 50 µg/µl de antígeno (extracto total de epimastigote, cepa Querétaro) de acuerdo a datos establecidos en la tesis de Rico-Ramírez, (2004). Así mismo, se probaron distintas diluciones de la muestra problema; 1:10, 1:20, 1:50 en base a trabajos en donde se determinaron títulos de anticuerpos en intestino (Moreno-Fierro *et al.*, 2002) (Ver Anexo V).

Una vez establecidas las condiciones para realizar la técnica de ELISA, se procedió a la detección de anticuerpos en lavados intestinales procedentes de ratones infectados con *T. cruzi*. Placas para ELISA EIA/RIA (Costar 3590) fueron cubiertas con 100 µL de una solución que contenía 50 µg/mL de extracto total de antígeno de epimastigote de *T. cruzi* en buffer de carbonatos 0.1 M, pH 9.6. Después de dos horas de incubación a 37°C, las placas fueron lavadas tres veces con PBS/ 0.05% Tween 20 y bloqueadas por 1 h a 37°C con BSA al 1% en PBS. Posteriormente, se colocaron 50 µL de cada muestra problema en una dilución 1:20 en PBS/Tween 20 incubando a 4°C durante toda la noche. Luego, se lavaron nuevamente las placas como se mencionó anteriormente. Entonces, se agregaron 50 µL/pozo del conjugado peroxidada anti- IgA ratón (1: 2000, Santa Cruz Biotechnology Cat. SC-3791) en PBS/Tween 20, las placas fueron incubadas a 37°C por 2 h. Después se lavaron y la reacción enzimática se llevo a cabo con Orto- fenilendiamina (SIGMA Cat. P-1526) como sustrato. La reacción se paró con 50 µL/pozo de ácido sulfúrico al



2.5 N. Una vez parada la reacción, la absorbancia fue determinada en un lector para ELISA (Bio Rad Modelo 3550) a 490 nm (Ver Anexo V).

### VI. 9. INFILTRADO INFLAMATORIO

La evaluación del grado de inflamación en intestino delgado para ambos experimentos independientes se realizó a los 21 y 90 días pi. Laminillas en series de cuatro cortes consecutivos, fueron teñidas con H&E, la evaluación se hizo basada en el score determinado en los trabajos previos de Sun y Tarleton (1993) y Vizcaíno (2007) cuyos valores son: 0=normal; 1=leve, pocos infiltrados celulares en la muscular externa; 2=moderado, infiltrados celulares difusos en la muscular externa y submucosa; 3=severo, infiltrados celulares abundantes en la muscular externa, submucosa y mucosa. La observación de estas laminillas se realizó en un microscopio de luz (campo claro) Nikon modelo 022893 (Japón). La cámara Nikon Coolpix 4300 (Tokio, Japón) acoplada al microscopio, fue usada para la captura de las imágenes digitales. Se evaluaron 236 campos por cada sección del intestino delgado.

### VI. 10. CUANTIFICACIÓN CELULAR

La cuantificación de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> se realizó a los 21 días pi. Considerando todas las tunicas que forman al intestino delgado (mucosa, submucosa y muscular externa). Laminillas con series de tres cortes consecutivos fueron evaluadas, seleccionando 18 campos por laminilla para cada sección de intestino por ratón. Contabilizando un total de 648 campos para cada tipo celular. La cuantificación celular se llevó a cabo midiendo el área que mostraba la señal en color marrón observada en las fotos obtenidas de las inmunohistoquímicas realizadas para la detección de los linfocitos T, esto se realizó utilizando el software Image J versión 1.42q; Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA, obtenido de la página. <http://rsb.info.nih.gov/ij/index.html> sin costo, (Ver Anexo VII).

### VI. 11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La elección de la prueba estadística se basó en el tipo de datos manejados por experimento, así como, en el tipo de distribución y escala de medición utilizada.

Los resultados de todos los experimentos se expresaron como la media aritmética  $\pm$  desviación estándar de cuatro ratones por cada punto experimental en dos experimentos independientes. La excepción fue la detección de anticuerpos en lavados intestinales los cuales se expresaron como la media aritmética.

Para el caso del infiltrado inflamatorio en ambos experimentos independientes, las diferencias fueron analizadas mediante una prueba de ANOVA de una vía con un post-test Tukey de comparación múltiple (Siegel y Castellan, 2001).

Los resultados obtenidos en la determinación semicantitativa de parásitos y macrófagos, así como en la cuantificación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> se evaluaron estadísticamente por medio de una prueba de ANOVA de una vía con un post-test Tukey de comparación múltiple (Siegel y Castellan, 2001).

Por otro lado, la detección de IgA en lavados intestinales se analizó estadísticamente con la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis con el post-test Dunn de comparación múltiple (Siegel y Castellan, 2001).

Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas con una  $P < 0.05$ .

## VII. RESULTADOS

### VII. 1. PARÁSITOS EN TEJIDO

La carga parasitaria en el intestino fue analizada mediante el conteo de campos con nidos de amastigotes. Observando parásitos en las tres secciones del intestino delgado, tanto en las vellosidades como en la submucosa y en la muscular externa, cabe mencionar que también se llegaron a observar parásitos en folículos linfoides (Fig. 8 C). Estos parásitos se encontraron principalmente en pequeños nidos (Fig. 8 B, C), sólo en un campo se observó la presencia de un nido grande de amastigotes en la muscular externa de la sección de duodeno en la infección con la cepa Ninoa (Fig. 8 A y 9).

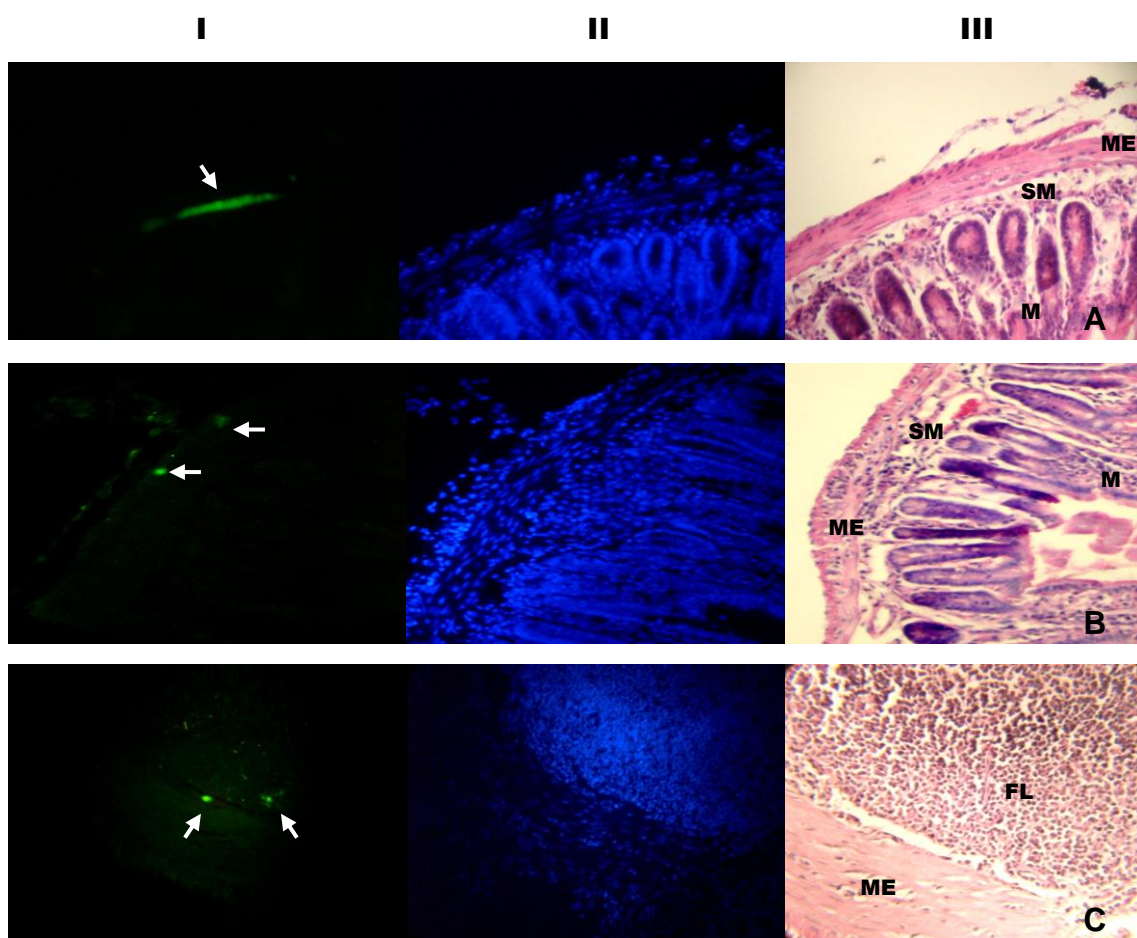


Fig. 8. Microfotografías representativas de la detección de parásitos en las tres secciones del intestino delgado. Cortes de 5  $\mu\text{m}$  fueron incubados con el suero anti-*T. cruzi* (1:1000), después con el anticuerpo secundario anti-IgG-FITC (1:100) y contrateñidas con DAPI (1:1000). A) duodeno, B) yeyuno, C) íleon. Se muestra la presencia de amastigotes en verde teñidos con Isotiocianato de fluoresceína (FITC) (I), la contratinción en azul (DAPI) (II) y por último una tinción de rutina H&E (III). Las flechas muestran la presencia de nidos de amastigotes. Muscular externa (ME), submucosa (SM), mucosa (M), folículo linfóide (FL). Figura A y B aumento 200X y C aumento a 400X.

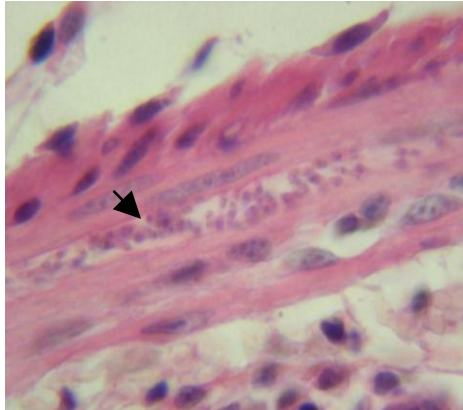


Fig. 9. Tinción H/E en intestino delgado ratón infectado con la cepa Ninoa, 21dpi. Se muestra la presencia de un nido de amastigotes en duodeno (indicado por la flecha). Aumento 1000X.

Al analizar semicuantitativamente se encontró que el número de campos con nidos de amastigotes en la sección de duodeno, durante la infección con la cepa Querétaro, fue significativamente mayor que los encontrados en la sección de duodeno en la infección con la cepa Ninoa (Fig.10).

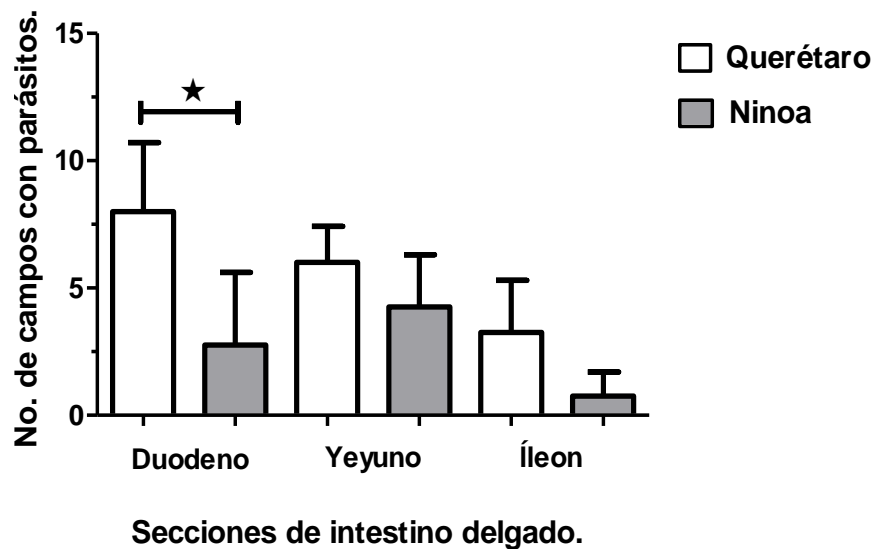


Fig. 10. Presencia de nidos de amastigotes en tejido del intestino delgado de ratones infectados con dos cepas de *T. cruzi* 21dpi. Datos expresados como el promedio  $\pm$  DS de cuatro ratones por cada punto experimental. Se usó una prueba de ANOVA de una vía con un post-test Tukey de comparación múltiple, teniendo diferencias significativas entre cepas  $\star$ ,  $p < 0.05$ .

Qro. D      ninoa D.  
 Qro Y      Ninoa Y.  
 Qro IL.    Ninoa IL.

### VII. 2. INFILTRADO INFLAMATORIO

Diversas células del sistema inmune tienen la capacidad de migrar hasta los sitios donde se presenta el estímulo antigénico. En las secciones teñidas con H&E pertenecientes al grupo control, el cual estaba compuesto de ratones no infectados, no se encontró ningún proceso inflamatorio, observando una morfología normal (Fig. 11 A, B y C). Por otro lado, en los tejidos de ratones infectados se observaron diversos grados de infiltrado desde pequeños focos inflamatorios en la mucosa y parte de la submucosa, hasta grandes acumulaciones de células inmunes que se extendían desde la submucosa hasta el interior de las capas musculares externas provocando daño tisular y deformación de las estructuras del intestino (Fig. 11 D, E y F). Este fenómeno inflamatorio se observó principalmente en el intestino de ratones infectados con la cepa Querétaro al día 21 pi.

Un menor infiltrado se observó en las tres secciones del intestino delgado de ratones infectados con la cepa Ninoa. Las células inmunes se distribuyeron particularmente en la submucosa y en la capa de la muscular externa (Fig. 11 G, H, I), en este caso no se observaron daños tisulares debido al infiltrado inflamatorio.

Los procesos inflamatorios en las tres secciones del intestino fueron mínimas a los 90 días pi. Solo en algunos casos se observaron focos inflamatorios difusos ubicados en la submucosa y muscular. Esto para las infecciones causadas por ambas cepas (Fig. 11 J-O.).

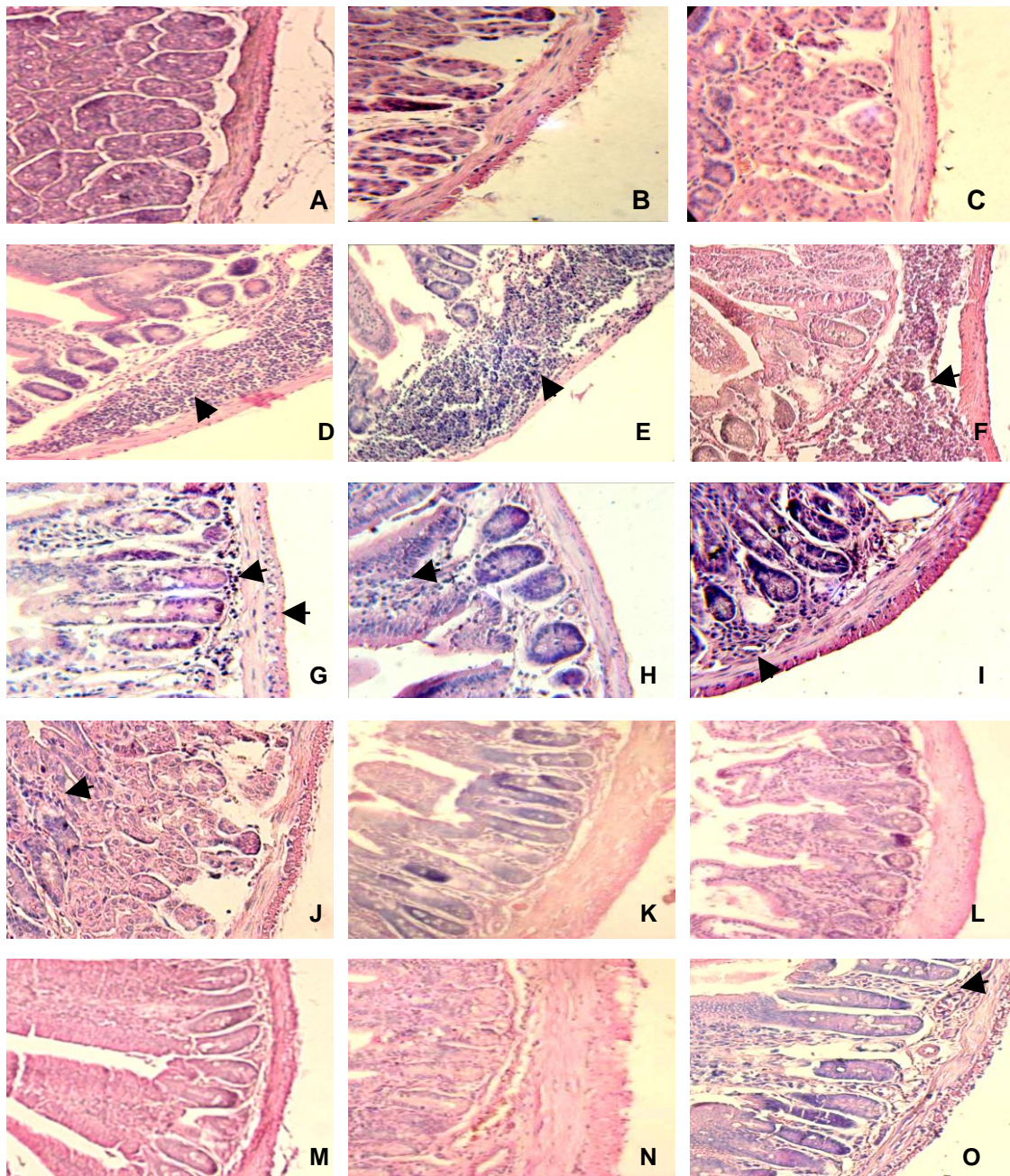


Fig. 11. Infiltrados inflamatorios en intestino delgado de ratones infectados con 10,000 tripomastigotes de la cepa Querétaro y 10,000 de la cepa Ninoa, a diferentes tiempos pos-infección. Cortes histológicos, teñidos con H&E. A) duodeno, B) yeyuno, C) íleon de ratones sin infectar (Control); D) duodeno, E) yeyuno, F) íleon de ratones infectados con la cepa Querétaro 21dpi; G) duodeno, H) yeyuno, I) íleon de ratones infectados con la cepa Ninoa 21dpi; J) duodeno, K) yeyuno, L) íleon de ratones infectados con la cepa Querétaro 90dpi; M) duodeno, N) yeyuno y O) íleon de ratones infectados con la cepa Ninoa 90dpi. Las flechas indican la presencia del infiltrado inflamatorio. Aumento 200X.

Al evaluar semicuantitativamente los tejidos teñidos con H&E de ratones infectados con 10,000 tripomastigotes de las cepas Querétaro y Ninoa a los días 21 y 90 pi. se observó que ambas cepas indujeron una respuesta inmune a lo largo del intestino delgado, conduciendo a la formación de agregados celulares inmunes. La intensidad de la inflamación fue de dos a tres veces

mayor en la fase aguda determinada a los 21 días pi. en ambas cepas en comparación con la inflamación a los 90 días pi. (Fig. 12 A y B). Además, día 21 pi. la infección con la cepa Querétaro presentó dos veces más infiltrado inflamatorio en las tres secciones del intestino que la infección producida por la cepa Ninoa (Fig. 12 C). Ahora bien, la inflamación inducida por la cepa Querétaro no fue diferente entre las tres secciones del intestino delgado (Fig. 12 A). Para el caso del infiltrado producido por la infección con la cepa Ninoa la sección del Íleon presentó una mayor cantidad de infiltrado inflamatorio con respecto a las secciones de Duodeno y Yeyuno (Fig. 12 B).

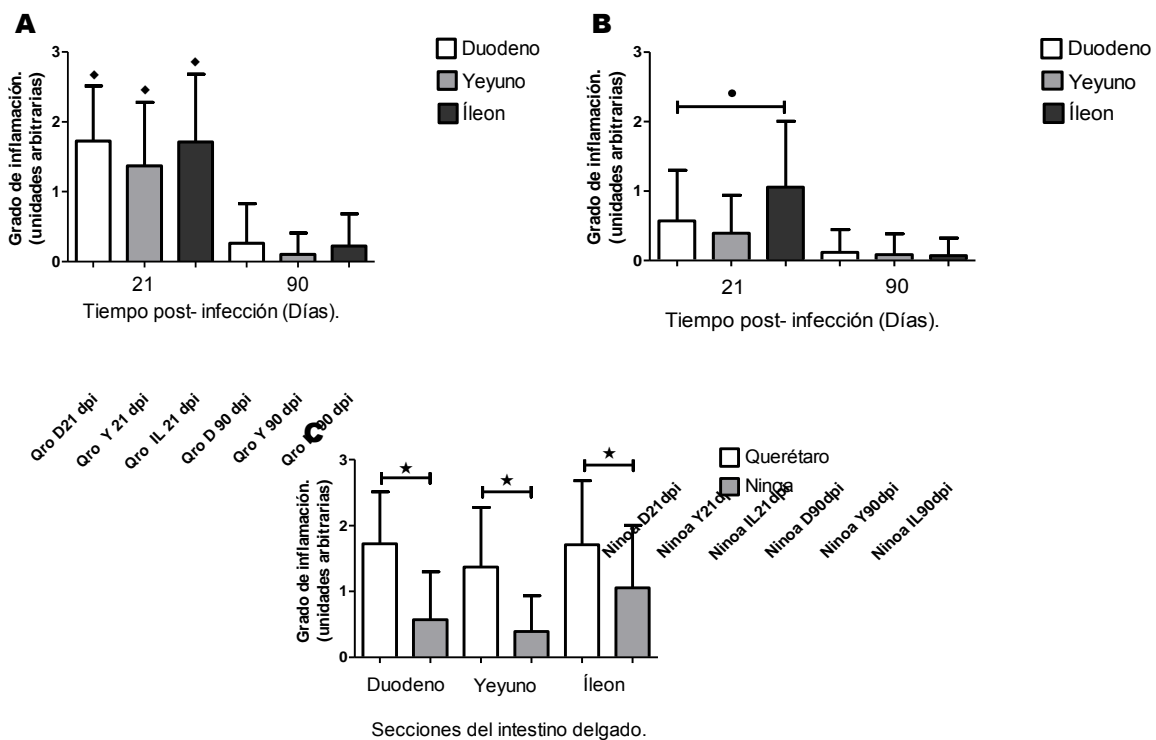


Fig. 12. Grado de inflamación en intestino delgado de ratones infectados con dos cepas de *T. cruzi* a diferentes tiempos post-infección. El grupo control no mostró inflamación significativa, por tal motivo fue omitido. A) Ratones infectados con la cepa Querétaro al día 21 y 90 pi., B) Ratones infectados con la cepa Ninoa al día 21 y 90 pi., C) Ratones infectados con la cepa Querétaro y Ninoa 21 días pi. Datos expresados como el promedio + DS de cuatro ratones por cada punto experimental. Se usó una prueba de Kruskal- Wallis con un post test de Dunn, teniendo diferencias significativas entre cepas ★, entre secciones • y entre días pi. ♦ p < 0.05.

### VII. 3. INFILTRADO INFLAMATORIO EN TUBO DIGESTIVO DE RATONES INFECTADOS CON DISTINTOS INÓCULOS

Uno de los objetivos de este proyecto fue evaluar si las diferencias en la patogenicidad provocada por la infección con las cepas Ninoa y Querétaro se debía a las diferencias en la biología de las mismas y no como resultado de la mayor parasitemia producida por la cepa Querétaro que ha sido previamente documentado en nuestro laboratorio. Por lo que se modificó la cantidad de inóculo, reduciendo el número de parásitos de la cepa Querétaro usados para la infección.

El análisis se llevo acabo al día 21 pi (fase aguda) ya que, como se demostró anteriormente, este día suele ser el que presenta una elevada respuesta inmune por parte del hospedero.

Así se analizaron los tejidos teñidos con H&E del intestino delgado de ratones que fueron infectados con 1000 parásitos de la cepa Querétaro y se compararon con los tejidos de ratones infectados con 10,000 parásitos de la cepa Ninoa.

El tejido del grupo control (individuos no infectados) no presentó procesos inflamatorios (Fig. 13 A, B y C). Mientras que en la infección con la cepa Ninoa la inflamación fue mínima y la estructura morfológica se observó en condiciones normales en las tres secciones del intestino delgado (Fig. 13 G, H e I).

Sin embargo, al modificar el número de parásitos inoculados en la infección con la cepa Querétaro no disminuyó su capacidad de inducir un severo infiltrado inflamatorio en comparación con el infiltrado causado en la infección con la cepa Ninoa. El infiltrado inflamatorio en la infección con la cepa Querétaro se encontró principalmente ubicado en las submucosa y en la muscular externa, constituido de infiltrados celulares focales y difusos los cuales no modificaron las estructuras del intestino delgado (Fig. 13 D, E y F).



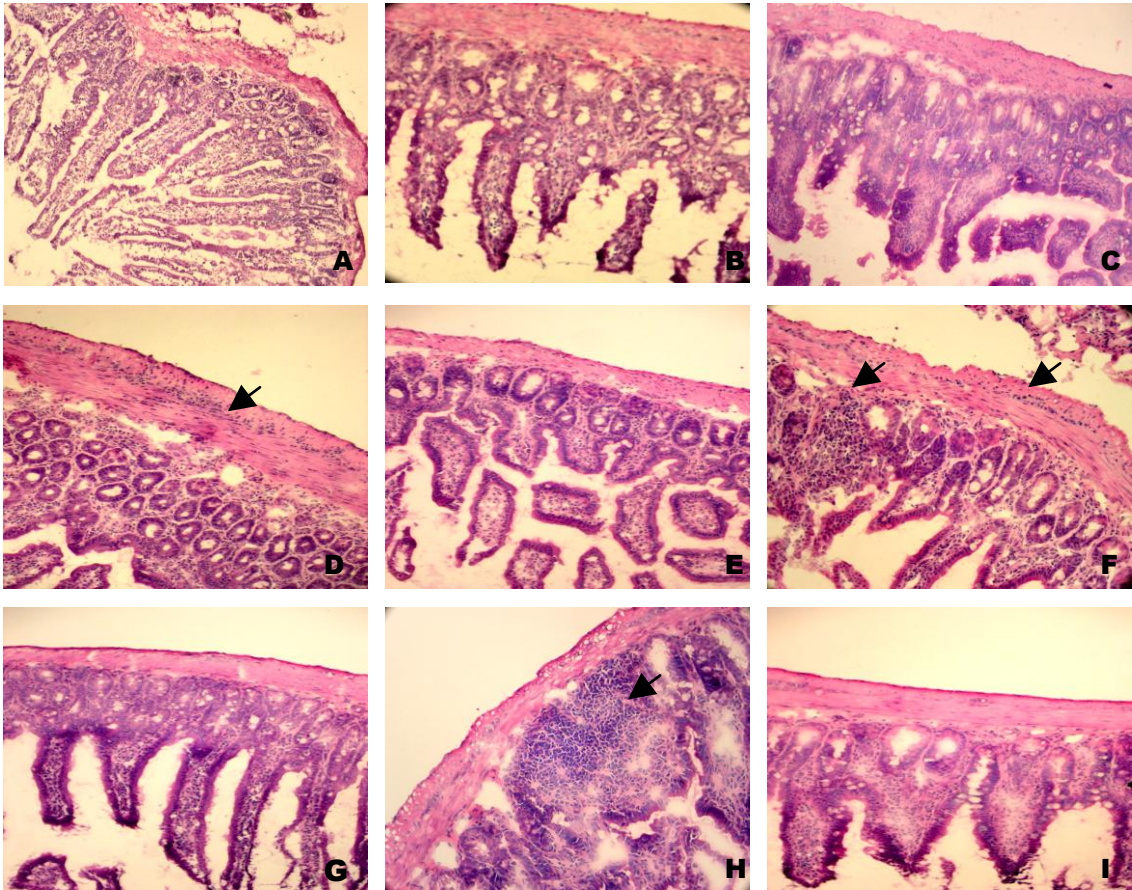


Fig. 13. Infiltrados inflamatorios en intestino delgado de ratones infectados con 1000 tripomastigotes de la cepa Querétaro y con 10,000 tripomastigotes de la cepa Ninoa, a los 21 días pi. Cortes histológicos, teñidos con H&E. A) duodeno, B) yeyuno y C) íleon de ratones sin infectar (Control); D) duodeno, E) yeyuno y F) íleon de ratones infectados con la cepa Querétaro; G) duodeno, H) yeyuno y I) íleon de ratones infectados con la cepa Ninoa. Las flechas indican la presencia del infiltrado inflamatorio. Aumento 200X.

La intensidad del infiltrado en las tres secciones del intestino delgado fue dos veces mayor en el tejido infectado por la cepa Querétaro que la inflamación observada con la cepa Ninoa (Fig. 14). Se observó un mayor grado de inflamación en la sección del íleon con respecto al duodeno y yeyuno, de ratones infectados con la cepa Querétaro (Fig. 14).

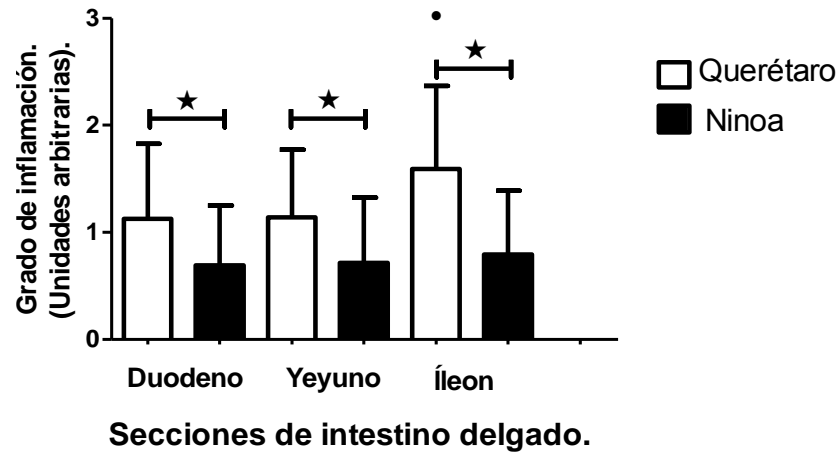


Fig. 14. Grado de inflamación en intestino delgado de ratones infectados con 1000 tripomastigotes de la cepa Querétaro y con 10,000 tripomastigotes de la cepa Ninoa ambas cepas de *T. cruzi* I, a los 21 días pi. Datos expresados como el promedio  $\pm$  DS de cuatro ratones por cada punto experimental. Se uso una prueba de Kruskal- Wallis con un post test de Dunn, teniendo diferencias significativas entre secciones • y entre cepas ★,  $p < 0.05$ .

#### VII. 4. DETERMINACIÓN DE MACRÓFAGOS EN INFILTRADOS INFLAMATORIOS

La presencia de macrófagos se detectó por medio de inmunofluorescencia y se analizó por conteo de campos con macrófagos. Ahora bien, parte del proyecto fue la evaluación del número de nidos de amastigotes asociados a un infiltrado inflamatorio con presencia de macrófagos. Pero éste no fue el caso ya que, sólo en dos campos se llegaron a encontrar asociaciones entre macrófagos y parásitos solitarios o nidos pequeños, uno de ellos fue el caso de los parásitos encontrados en el nódulo linfóide, en la sección de yeyuno (Fig. 15 B). Y en el único nido grande de amastigotes que se encontró no se observaron macrófagos que lo rodearan, en la sección de duodeno (Fig. 15 A).

La distribución de los macrófagos en el intestino delgado se encontró más bien relacionada con la ubicación de los infiltrados inflamatorios provocados por la infección. De manera constante se observaron agrupaciones de macrófagos en la submucosa que se encontraba en el interior de las vellosidades (Fig. 16 A), así como, en la muscular externa (Fig. 15 C y 16 B) y en el interior de los folículos linfoides (Fig. 15 B).

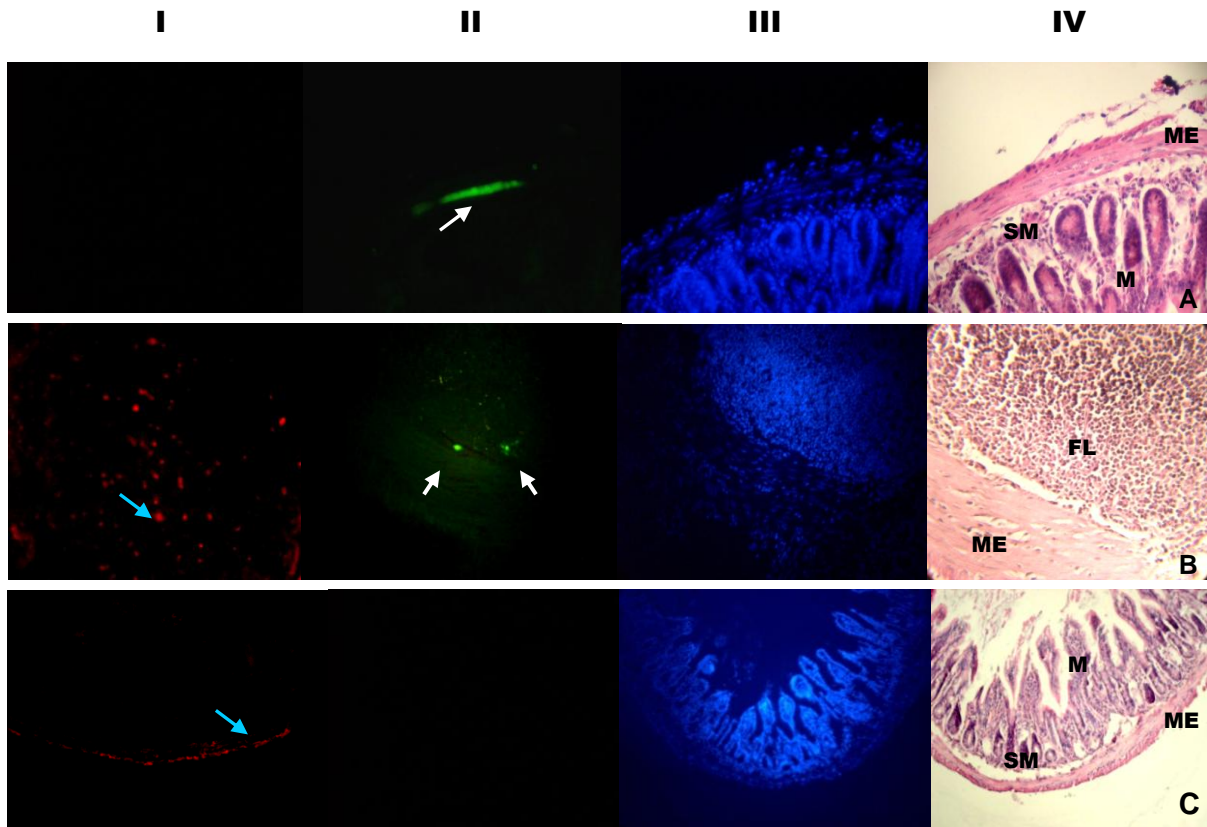


Fig. 15. Inmunofluorescencia en intestino delgado. Ratón infectado con la cepa Ninoa. 21dpi. Microfotografías representativas de la presencia y distribución tanto de macrófagos como de amastigotes en las tres secciones de intestino. A) duodeno, B) yeyuno, C) íleon. Se muestra la presencia de macrófagos teñidos en rojo con Ficoeritrina (PE) (I), amastigotes se observan en verde teñidos con Isoticionato de fluoresceína (FITC) (II), la contratinción en azul (DAPI) (III) y por último una tinción de rutina H&E (IV). Las flechas azules indican la presencia de macrófagos y las flechas blancas indican la presencia de los nidos de amastigotes Muscular externa (ME), submucosa (SM), mucosa (M), folículo linfoide (FL). A y C aumento 200X, B aumento 400X.

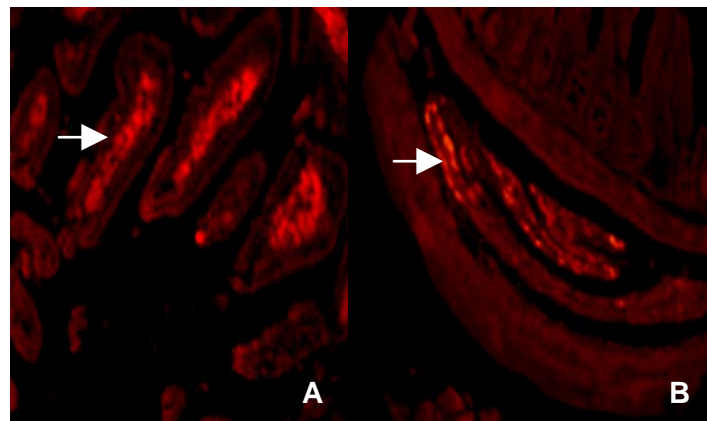


Fig. 16. Inmunofluorescencia en intestino delgado. Ratón infectado con la cepa Ninoa, 21dpi. A) Macrófagos en lámina propia (indicado por la flecha), B) Macrófagos en la muscular externa (indicado por la flecha). Aumento 400X.

Los macrófagos se distribuyeron de manera similar en las secciones de duodeno y yeyuno en ambas infecciones con respecto al grupo control. Solo se encontraron diferencias significativas en la sección de íleon en ratones infectados con la cepa Querétaro, presentando un elevado número de campos con macrófagos, con respecto al grupo control y a la infección con la cepa Ninoa. Así también, se observaron diferencias significativas en comparación a la sección de duodeno en la misma infección (Fig.17). Por otro lado, la infección con la cepa Ninoa tampoco mostró diferencias significativas en la sección de íleon (Fig.17).

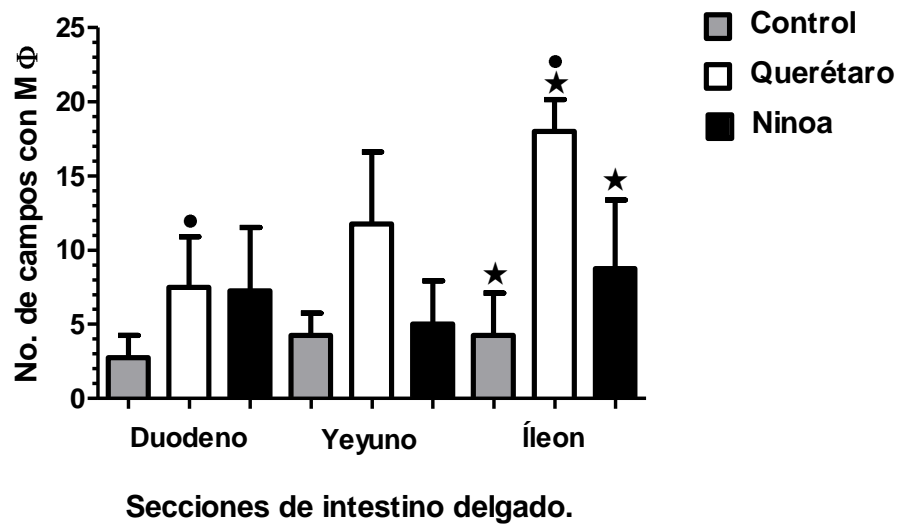


Fig. 17. Presencia de macrófagos en tejido del intestino delgado de ratones infectados con dos cepas de *T. cruzi* 21dpi. Datos expresados como el promedio  $\pm$  DS de cuatro ratones por cada punto experimental. Se uso una prueba de ANOVA de una vía con un post- test Tukey de comparación múltiple, teniendo diferencias significativas con respecto al grupo control y entre cepas ★, entre secciones ●,  $p < 0.05$ .

CONTD QROD NINOAD CONTY QROY NINOAY CONTIL QROIL NINOAIL

### VII. 5. CUANTIFICACIÓN DE LINFOCITOS T CD4<sup>+</sup> Y CD8<sup>+</sup> EN TEJIDO

Se evaluaron las poblaciones de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> al día 21 pi. en las tres secciones del intestino delgado de ratones infectados con la cepa Ninoa o Querétaro.

La detección de ambas poblaciones de linfocitos se realizó por medio de Inmunohistoquímica. La distribución de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> en el grupo control se dio de manera similar. Estos linfocitos se ubicaron en la lámina propia del interior de las vellosidades a lo largo de las tres secciones del intestino delgado (Fig. 18 y 19 A, B y C).

Al observar los ratones infectados con la cepa Querétaro se encontró que la distribución de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> se vio modificada ubicándose no solo en el área de las vellosidades si no también en la submucosa y muscular externa en el caso de la sección de duodeno (Fig. 18 D); sin embargo, es importante mencionar que se observaron menos linfocitos T CD4<sup>+</sup> en las secciones de yeyuno e íleon en comparación al grupo control (Fig. 18 E y F). En el caso de la infección con la cepa Ninoa la distribución de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> fue similar a la distribución presente en el grupo control (Fig. 18 G, H, e I).

Al observar la distribución de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> en la infección con la cepa Querétaro se encontró que está también se modifica, ubicándose tanto en las vellosidades como en la submucosa y en la muscular externa en las tres secciones del intestino delgado (Fig. 19 D, E y F). En la infección con la cepa Ninoa se observó que la distribución de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> fue similar a distribución encontrada en el grupo control (Fig. 19 G, H e I).

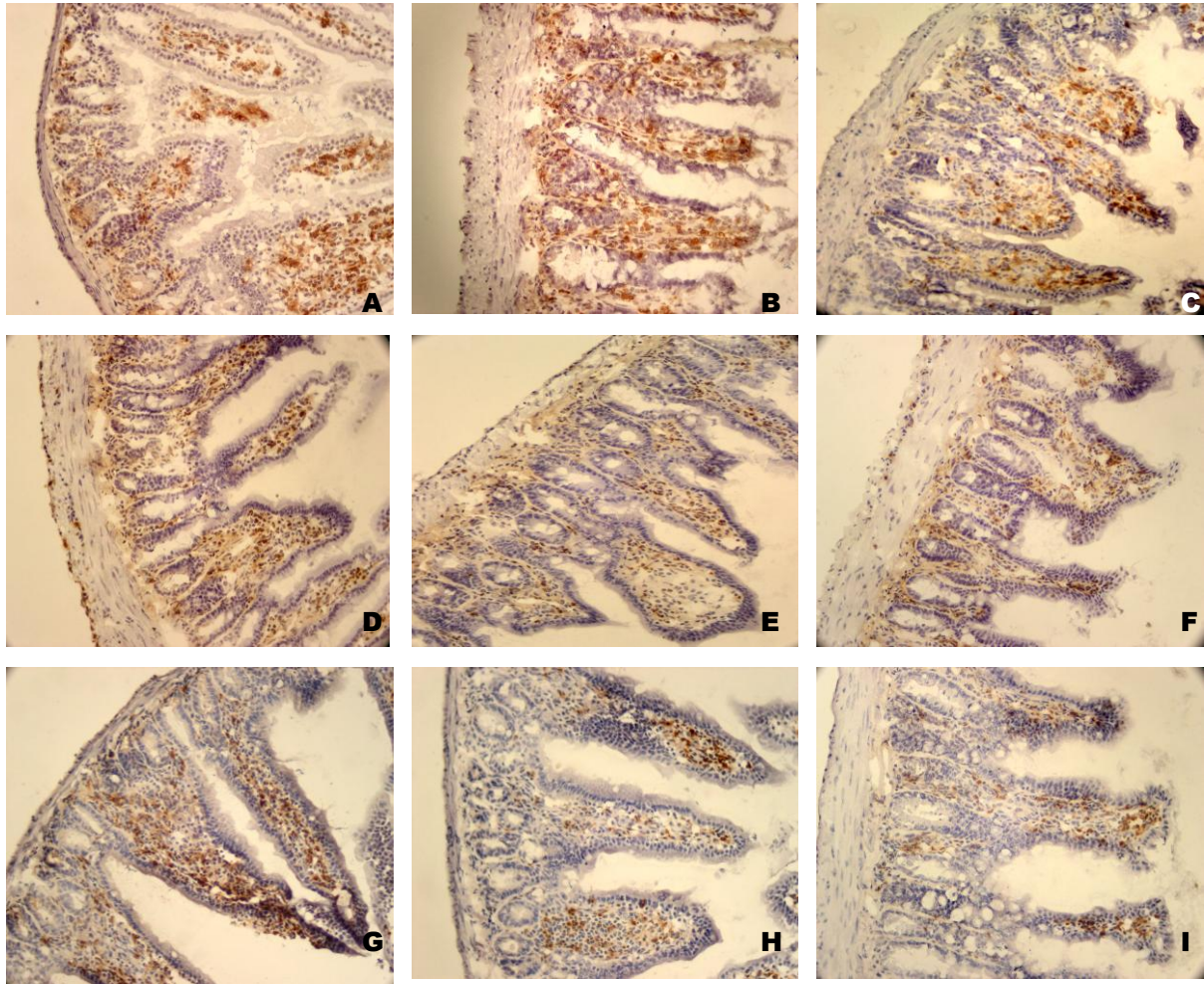


Fig. 18. Caracterización de linfocitos T  $CD4^+$  por Inmunohistoquímica con el anticuerpo anti- $CD4^+$  y reveladas con DAB. Se muestran las tres secciones de intestino delgado de ratones infectados con ambas cepas de *T. cruzi*, a los 21 días pi. A) Duodeno, B) Yeyuno y C) Íleon de ratones sin infectar (control); D) duodeno, E) yeyuno, F) íleon de ratones infectados con la cepa Querétaro; G) Duodeno, H) Yeyuno, I) Íleon de ratones infectados con la cepa Ninoa. Aumento 200X.

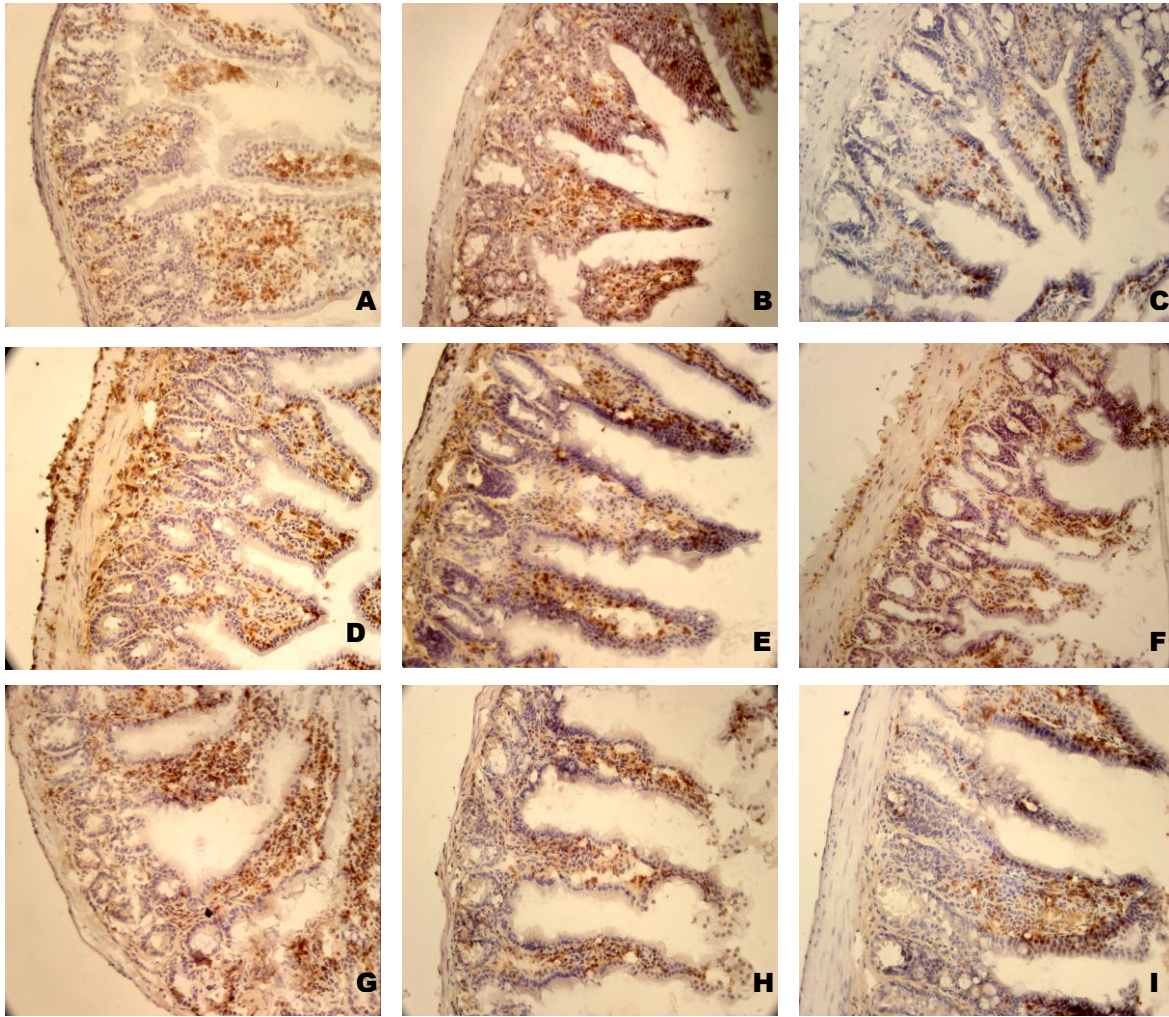


Fig. 19. Caracterización de linfocitos T CD8<sup>+</sup> por Inmunohistoquímica con el anticuerpo anti-CD8<sup>+</sup> y reveladas con DAB. Se muestran las tres secciones de intestino delgado de ratones infectados con ambas cepas de *T. cruzi*, a los 21 días pi. A) Duodeno, B) Yeyuno y C) Íleon de ratones sin infectar (control); D) duodeno, E) yeyuno, F) íleon de ratones infectados con la cepa Querétaro; G) Duodeno, H) Yeyuno, I) Íleon de ratones infectados con la cepa Ninoa. Aumento 200X.

La cuantificación de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> se llevo a cabo al obtener el área analizando las imágenes pertenecientes a la inmunohistoquímica por medio del software Image J (Ver Anexo VII). Los resultados se muestran en la Tabla 2. Ambas poblaciones de linfocitos mostraron comportamientos distintos en las tres secciones del intestino delgado.

En el grupo control, los linfocitos T CD4<sup>+</sup> predominaron en las secciones de duodeno y yeyuno, disminuyendo en la sección de íleon. Mientras que en las infecciones con las cepas Querétaro y Ninoa se observó una reducción de estos linfocitos en la sección de yeyuno con respecto al grupo control y a las demás secciones, por otra parte se observa un aumento de linfocitos en la sección de Íleon en la infección con la cepa Querétaro con respecto a la infección con la cepa Ninoa y está a su vez con respecto al grupo control (Tabla 2, Fig. 20 A).

Ahora bien, con respecto a los linfocitos T CD8<sup>+</sup>, en el grupo control abundaron en las secciones de duodeno e íleon, mientras que fueron menos en la sección de yeyuno. En el caso de la infección con la cepa Querétaro, la sección de yeyuno tuvo un aumento de linfocitos con respecto al grupo control, en cuanto a las secciones de duodeno e íleon permanecieron sin diferencias significativas. Por otro lado, en la infección con la cepa Ninoa los linfocitos predominaron en la sección de duodeno en comparación con las demás secciones, mientras que se mantuvieron en la sección de yeyuno y disminuyeron en la sección de íleon, esto con respecto al grupo control (Tabla 2, Fig. 20 B).

Siguiendo con el análisis, se encontraron diferencias significativas entre los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, predominando estos últimos en la sección de Duodeno tanto para el grupo control como para ambas infecciones (Fig. 23 A). En la sección de yeyuno los linfocitos T CD8<sup>+</sup> predominaron sobre los linfocitos CD4<sup>+</sup> en ambas infecciones en cuanto que el grupo control no mostró diferencias (Tabla 2, Fig. 21 B), mientras que en la sección de Íleon no hubo diferencia significativa (Tabla 2, Fig. 21 C).



## VII. Resultados

**Tabla 2.** Cuantificación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> en el intestino delgado.

|          | Linfocitos T CD4 <sup>+</sup> |            |           | Linfocitos T CD8 <sup>+</sup> |            |            |
|----------|-------------------------------|------------|-----------|-------------------------------|------------|------------|
|          | Control.                      | Querétaro. | Ninoa.    | Control.                      | Querétaro. | Ninoa.     |
| Duodeno. | 69 ± 26                       | 65 ± 47    | 64 ± 2    | 99 ± 39●                      | 102 ± 49●  | 106 ± 50■● |
| Yeyuno.  | 60 ± 30                       | 25 ± 31■◆  | 27 ± 23■◆ | 53 ± 30◆                      | 97 ± 59■●  | 59 ± 35★●  |
| Íleon.   | 103 ± 89◆                     | 79 ± 52★   | 53 ± 34*  | 95 ± 56                       | 82 ± 37    | 70 ± 37■   |

Ratones sin infectar (Control) e infectados con las cepas Querétaro y Ninoa al día 21 pi (los números representan el promedio ± la desviación estándar del área (µm<sup>2</sup>) de linfocitos).

- Diferencias entre tipos celulares.
- Diferencias con respecto al grupo control.
- ★ Diferencias entre cepas.
- ◆ Diferencias entre secciones.

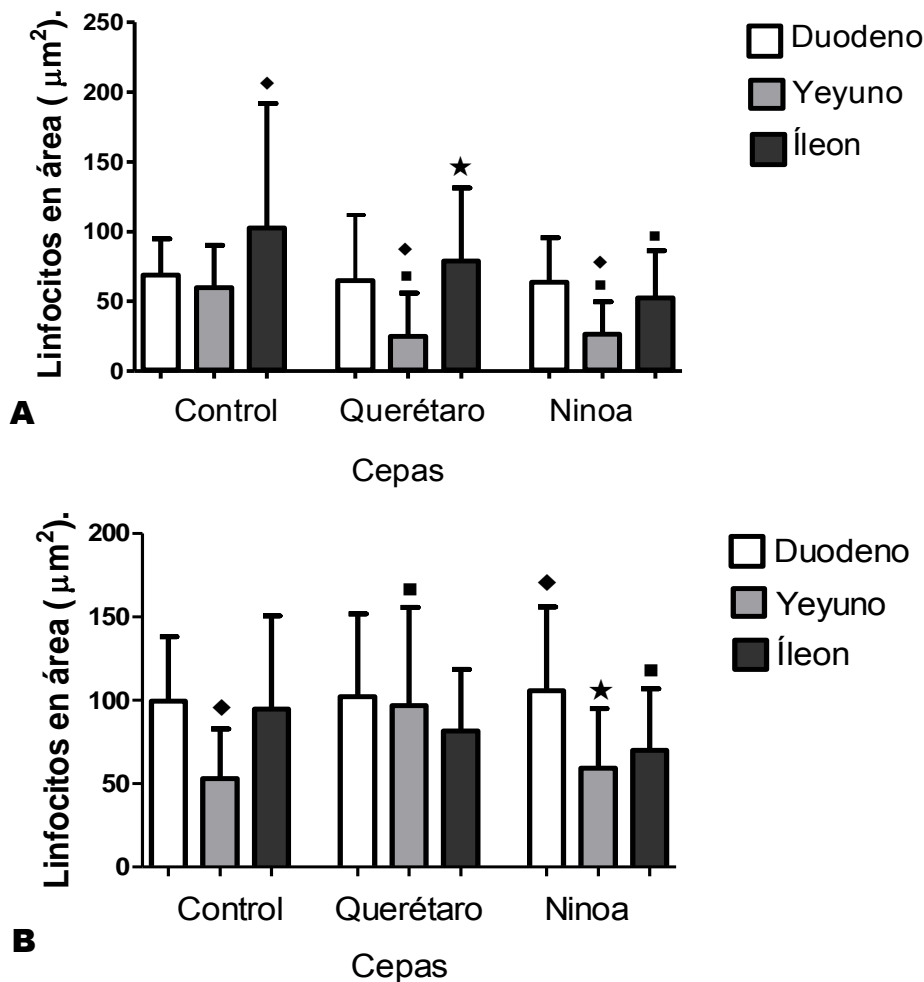
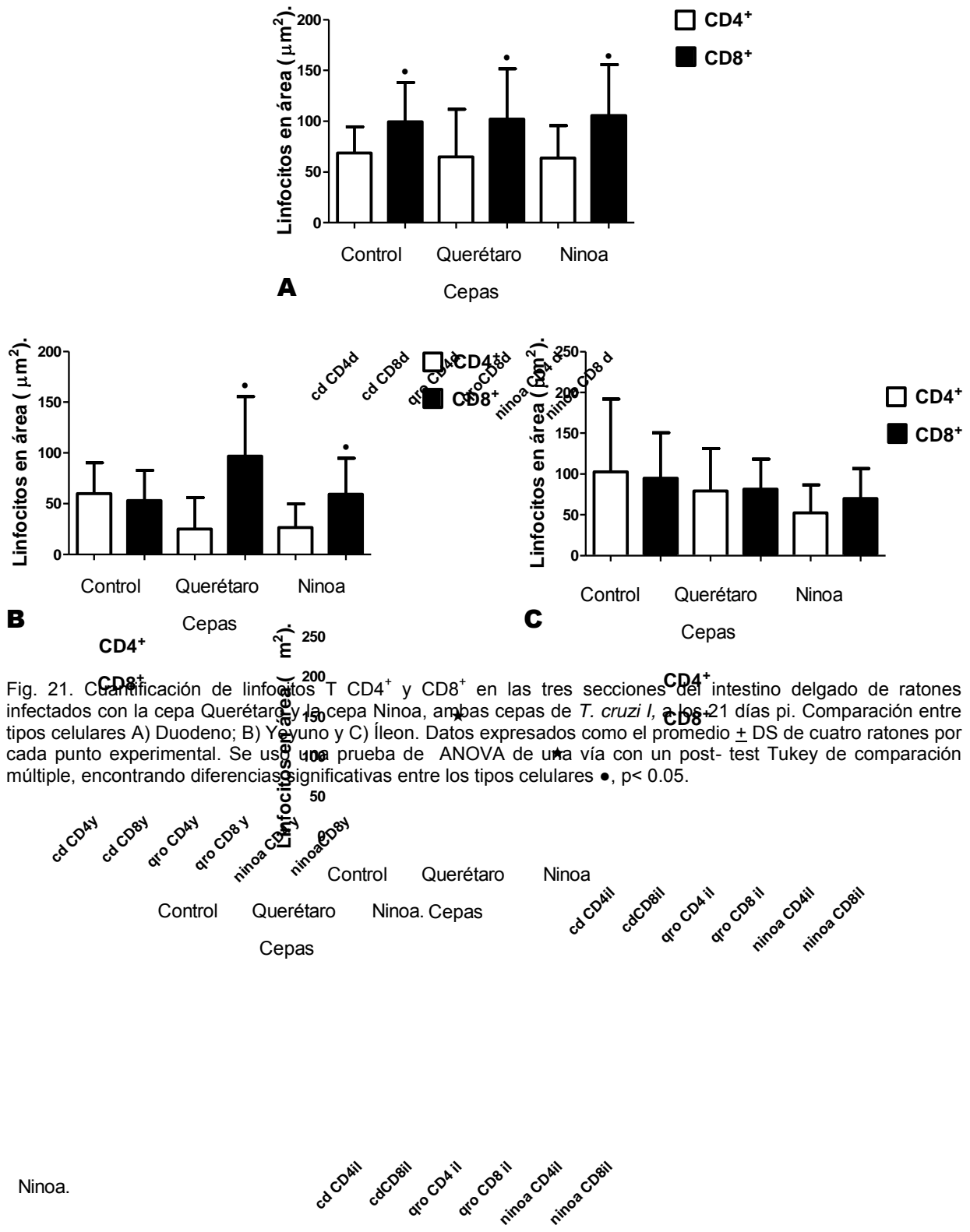


Fig. 20. Cuantificación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> en las tres secciones del intestino delgado de ratones infectados con la cepa Querétaro y la cepa Ninoa, ambas cepas de *T. cruzi*, a los 21 días pi. Análisis por cada tipo celular. A) Linfocitos T CD4<sup>+</sup>; B) Linfocitos T CD8<sup>+</sup>. Datos expresados como el promedio ± DS de cuatro ratones por cada punto experimental. Se usó una prueba de ANOVA de una vía con un post-test Tukey de comparación múltiple, encontrando diferencias significativas entre secciones ◆, entre cepas ★ y con respecto al grupo control ■, p < 0.05.

cd CD8d  
cd CD8y  
cd CD8il  
qro CD8d  
qro CD8y  
qro CD8il  
ninoa CD8d  
ninoa CD8y  
ninoa CD8il



### VII. 6. DETERMINACIÓN DE IgA ANTI-*T. CRUZI* EN LA LUZ INTESTINAL

La presencia de anticuerpos IgA en la luz intestinal de ratones infectados con las cepas mencionadas anteriormente se determinó mediante la evaluación de los niveles de éstos por medio de la técnica de ELISA. Una vez estandarizada la técnica se encontró que la dilución adecuada para llevar a cabo el análisis era 1:20.

El análisis de lavados intestinales en la búsqueda de anticuerpos IgA anti-*T. cruzi* se realizó a los días 21 y 90 pi. ya que se deseaba averiguar cuales eran los posibles cambios que se podían presentar en la fase aguda y crónica de la infección con cada cepa, así como las diferencias entre éstas. Se decidió evaluar IgA ya que es el anticuerpo predominante en la luz del intestino delgado.

La sección del duodeno al día 21 pi. presentó una mayor respuesta de anticuerpos IgA anti-*T. cruzi* en el caso de la infección inducida por la cepa Ninoa, no siendo igual para el caso de la infección con la cepa Querétaro en la cual no hubo diferencias significativas con respecto al control (Fig. 22 A). No hubo respuesta de anticuerpos específicos IgA anti-*T. cruzi* a los 90 días pi. en este misma sección (Fig. 22 B).

La respuesta de anticuerpos específicos IgA anti-*T. cruzi* no fue diferente al grupo control en el caso del yeyuno a los días 21 y 90 días pi. en ambas infecciones inducidas por la cepa Ninoa y Querétaro (Fig. 22 C y D). Los mismos resultados se encontraron en la sección de íleon (Fig. 22 E).

## VII. Resultados

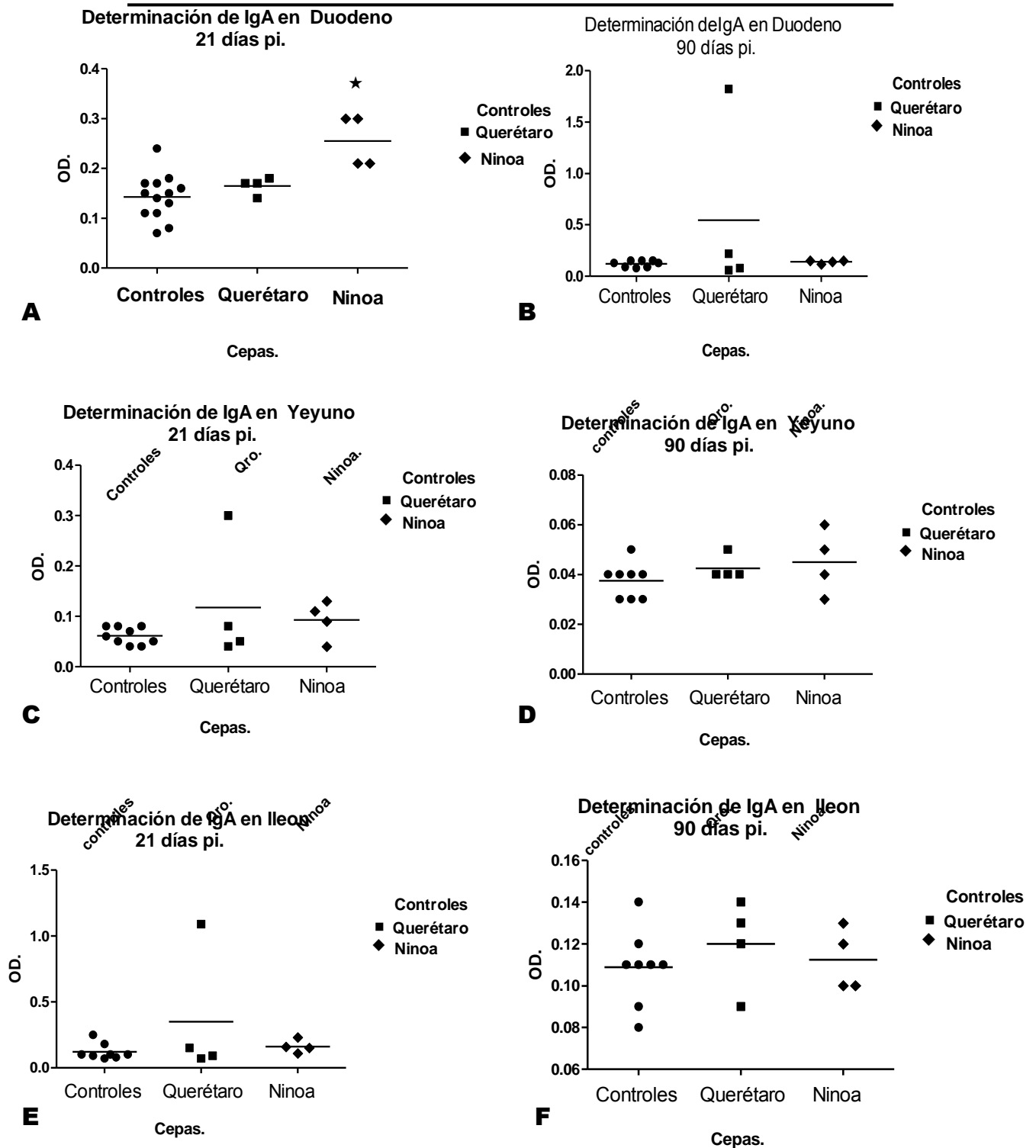


Fig. 22. ELISA. Detección de anticuerpos IgA específicos a *T. cruzi*, en lavados intestinales de ratones infectados con dos cepas de *T. cruzi*. A distintos tiempos post-infección. A) Duodenos 21 días pi; B) Duodeno 90 días pi; C) Yeyuno 21 días pi; D) Yeyuno 90 días pi; E) Íleon 21 días pi; F) Íleon 90 días pi. Se usó una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis con el post-test Dunn de comparación múltiple, teniendo diferencias significativas con respecto al control ★, con una  $p < 0.05$ .

## VIII. DISCUSIÓN

---

La gran variabilidad en las manifestaciones clínicas de la enfermedad de Chagas puede depender, en parte, de la variabilidad genética de las poblaciones de *T. cruzi*. Así las cepas pertenecientes al grupo TcII-IV se han vinculado a la enfermedad en Sudamérica (Coura *et al.*, 2002; Miles *et al.*, 2003), mientras que las cepas pertenecientes al grupo de TcI se asocian a la enfermedad desde el sur de Estados Unidos hasta el norte de Sudamérica (Llewellyn *et al.*, 2009). Se ha demostrado que las cepas mexicanas son predominantemente TcI (López-Olmos *et al.*, 1998; Bosseno *et al.*, 2002).

La patogénesis y los mecanismos de la relación parásito-hospedero no son bien comprendidos. La infección tiene cursos clínicos variables; muchos individuos permanecen libres de alteraciones, mientras que otros desarrollan severas enfermedades crónicas, con involucramiento cardíaco o gastrointestinal (Lages-Silva *et al.*, 2001).

Estudios previos han demostrado que las cepas mexicanas muestran claras diferencias biológicas (*in vitro* e *in vivo*): crecimiento, infectividad, perfil de parasitemia, tropismo hacia un tejido, patrones de patogenicidad y mortalidad (Lopez-Olmos *et al.*, 1998; Sánchez-Guillén *et al.*, 2006). Siendo de suma importancia comprender los distintos patrones de comportamiento biológico que puedan tener las poblaciones del parásito, así como la interacción parásito-hospedero. En el mismo sentido se ha demostrado que las cepas mexicanas Querétaro y Ninoa pertenecientes al grupo TcI producen infiltrados inflamatorios en tejido cardíaco y músculo esquelético, mostrando una respuesta inmune es de tipo Th1 representado por diversas citocinas como IL-12, IFN- $\gamma$  y algunas quimiocinas como RANTES, MIG, MIP-1 $\beta$  y MCP-1. Sin embargo en la infección con la cepa Querétaro se produce una respuesta inmune mayor comparado con la infección con la cepa Ninoa. Resultando en una respuesta inmune exacerbada que puede causar patologías y muerte, lo cual ha sido demostrado en modelo murino (Espinoza *et al.*, 2010).

Son pocos los estudios que hablan acerca del involucramiento del intestino delgado en la enfermedad de Chagas, sobre todo en México. Sin embargo, cabe mencionar que el modelo analizado en este trabajo fue una infección por vía intraperitoneal por semejar la condición natural más común de infección, permitiendo analizar la posibilidad de que los parásitos colonizaran el intestino delgado, así como, la caracterización de la respuesta inmune, esto

en modelo murino. Los resultados de tales estudios contribuyen a una mejor comprensión del fenómeno que ocurre tras la infección con *T. cruzi* y tal vez la posibilidad de que estos conocimientos sean extrapolados a lo que ocurre en la enfermedad humana.

La determinación del tropismo de una cepa de *T. cruzi* es un parámetro biológico, que ayuda a determinar el comportamiento de distintas poblaciones, las cuales pueden o no pertenecer al mismo genotipo. Este parámetro ha sido ampliamente documentado por diversos trabajos, que han mostrado que la variabilidad genética presente en *T. cruzi* influye de manera importante en el tropismo y tipo de respuesta inmune que presente el hospedero (Pizzi *et al.*, 2005).

El análisis realizado por separado a cada sección de intestino delgado se debió a que este órgano en particular presenta diferencias fisiológicas e inmunes como la expresión diferencial de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, la distribución de anticuerpos o la ubicación de los folículos linfoides (Ver anexo I).

Al igual que en otros órganos (Vizcaino, 2007), las cepas Querétaro y Ninoa mostraron tropismo por el intestino delgado. La búsqueda de nidos de amastigotes por medio de inmunofluorescencia en cada uno de las tres secciones, reveló la presencia de nidos de pequeño tamaño. Durante la fase aguda en la infección con la cepa Querétaro, el mayor número de nidos se encontró en la sección de duodeno, mientras que en las otras secciones el grado de parasitismo no mostró diferencias significativas para ambas infecciones, sólo se observó la tendencia a ser menor en la sección de Íleon, lo que probablemente indicaría que por lo menos dos de las secciones (Duodeno e Íleon) del intestino se infectan de manera diferencial. Cabe mencionar que la distribución de los nidos que se encontraron en la infección con la cepa Ninoa fue interesante, estos nidos abundaron en la muscular externa, pero también se llegaron a encontrar nidos en folículos linfoides lo que posiblemente indicaría la movilización del parásito por parte de las células del sistema inmune hacia los sitios inductores del intestino o la invasión por parte de los parásitos a estos sitios, tal y como fue reportado para la cepa Tulahuén por De Meis y colaboradores en el 2009 y su posible relación con la depleción de linfocitos en estos órganos (Antunez *et al.*, 1997).

En la infección por la cepa Querétaro la distribución de los parásitos fue en la muscular externa y en las vellosidades, pero en este caso no se observaron nidos en los folículos linfoides. Cabe mencionar que ningún nido se encontró asociado estrechamente al infiltrado inflamatorio, aunque este infiltrado fue abundante solo se ubicó en zonas adyacentes a los nidos, lo cual posiblemente se debió a la eliminación de las células del sistema inmune debido a productos del parásito o a que la migración se vio afectada por algún factor inhibitorio secretado por el parásito (DosReis y Lopez, 2009).

Las cepas Querétaro y Ninoa tienen la capacidad de inducir un grado diferencial en la inflamación durante la fase aguda de la infección. En las tres secciones del intestino delgado, en la infección con la cepa Querétaro se indujo un intenso proceso inflamatorio. Al contrario, la infección con la cepa Ninoa no indujo procesos inflamatorios significativos en las tres secciones del intestino delgado. Cuando este infiltrado inflamatorio estuvo presente se distribuyó de manera preferencial en la submucosa y muscular externa, de manera similar a lo reportado en el colon en modelo murino con estas mismas cepas (Vizcaino, 2007) y en individuos que han presentado la patología de megacolon (Da Silveira *et al.*, 2007 a). La migración en grandes cantidades de células del sistema inmune a los sitios de infección modificó la estructura morfológica y provocó algunos daños tisulares, como hipertrofia y pérdida de la anatomía normal del tejido en la fase aguda de la infección. Sin embargo, no se puede decir que los daños tisulares fueron definitivos ya que en la fase crónica se observó en el tejido una disminución del proceso inflamatorio en la infección con ambas cepas.

Los resultados demuestran que el infiltrado inflamatorio ante la infección depende de la virulencia de la cepa y no de la carga parasitaria que se inocula ya que al inocular con distintas cargas parasitarias de ambas cepas (1000 tripomastigotes de la cepa Querétaro y 10,000 de la cepa Ninoa) en la fase aguda se obtuvieron niveles similares de parasitemia en ambas infecciones (datos previos del laboratorio) lo que supondría que la respuesta inmune sería similar entre estas; sin embargo, se demostró lo contrario debido a que el grado de inflamación observado en la infección (con un número menor de parásitos) de con la cepa Querétaro fue mayor que el observado en la infección con la cepa Ninoa, esto para las tres secciones del intestino delgado.

Se ha reportado que estos infiltrados celulares particularmente en colon se encuentran constituidos por diferentes tipos celulares predominando, los linfocitos T y en menor grado B, macrófagos, células NK y eosinófilos (García *et al.*, 1999, Arante *et al.*, 2004, Da Silveira *et al.*, 2007 a).

Los macrófagos son importantes células efectoras en la infección por *T. cruzi* y se les ha asociado de manera significativa a la patogénesis en colon (Arante *et al.*, 2004, Da Silveira *et al.*, 2007 a). De tal forma que es de suma importancia saber que papel desarrollan en la inmunidad del intestino delgado ante la infección con *T. cruzi*.

Los macrófagos en condiciones fisiológicas normales en el intestino presentan ciertas particularidades. Estos se distribuyen de manera preferencial en las vellosidades y su activación es muy controlada debido a que la mucosa del intestino delgado se encuentra de forma constante en contacto con antígenos (Platt *et al.*, 2008). Sin embargo, estos patrones se vieron modificados ante la infección por *T. cruzi*. Así, la distribución física cambió, al migrar y agregarse de manera abundante en la muscular externa, lugar donde se observó la mayor inflamación. Ahora bien, el mayor número de macrófagos se encontró en la sección de íleon en la infección con la cepa Querétaro, con respecto al grupo control y a la infección con la cepa Ninoa, mientras que la sección de duodeno presentó un menor número de macrófagos activados, esto también en la infección con la cepa Querétaro.

Cabe mencionar que se encontró una relación inversa entre el parasitismo en tejido y la presencia de macrófagos en la infección con la cepa Querétaro, donde la sección de duodeno mostró una mayor cantidad de nidos mientras que la cantidad de macrófagos se vio reducida, siendo lo contrario en la sección de íleon. Por otro lado, en la infección con la cepa Ninoa no se observaron cambios en el número de macrófagos.

Estos resultados sugieren que los macrófagos pueden contener la infección, pero esta contención es diferencial entre cepas y entre cada una de las secciones que conforman al intestino delgado por lo menos en la infección con la cepa Querétaro, mostrando la particularidad de este órgano ante la infección. Cabe mencionar que el papel que juegan los macrófagos en el control del parásito puede estar relacionado con la patología que involucra especialmente a duodeno en la fase crónica (WHO, 2002).



En el establecimiento de una respuesta inmune ante la infección, los linfocitos T juegan un papel fundamental en el curso que seguirá la infección en todos los órganos blanco de *T. cruzi* (Hoft *et al.*, 2000; Da Siveira *et al.*, 2007 b).

Como se sabe las células T CD4<sup>+</sup> se encuentran relacionadas con el tipo de respuesta celular y humoral que se monta ante la infección, por otra parte se ha visto que las células T CD8<sup>+</sup> se encuentran vinculadas al control de las células infectadas por *T. cruzi* (Tarleton, 2007).

La presencia de linfocitos T mostró diferencias como consecuencia de la infección. Cabe mencionar que la distribución física de los linfocitos en condiciones fisiológicas normales es en el tejido conectivo de la mucosa. En el caso de la infección con ambas cepas se observó la abundante presencia de estas células en las demás estructuras del intestino delgado y de manera particular en la muscular externa, este fenómeno se observó principalmente en el intestino delgado de ratones infectados con la cepa Querétaro. Lo que estaría confirmando que juegan un papel importante en la respuesta inmune a *T. cruzi* en el intestino delgado.

En el grupo control los valores de linfocitos T entre las secciones no fueron iguales, predominando los linfocitos T CD4<sup>+</sup> en las secciones de duodeno y yeyuno, mientras que en la sección de íleon disminuyeron; por otro lado, los linfocitos T CD8<sup>+</sup> predominaron en las secciones de duodeno e íleon, disminuyendo en la sección de yeyuno. Esto probablemente se debió a las diferencias funcionales entre las secciones del intestino delgado anteriormente mencionadas.

La sección de duodeno presentó cantidades similares tanto de linfocitos T CD4<sup>+</sup> como CD8<sup>+</sup> en las infecciones con ambas cepas, así como en el grupo control. Sin embargo, la distribución física mostró ser distinta en comparación al grupo control ya que los linfocitos se distribuyeron no solo en la mucosa sino también en las demás estructuras (submucosa y muscular externa) del intestino delgado. Siendo un resultado interesante ya que demuestra que las poblaciones de linfocitos T se mantienen en cantidades similares; sin embargo, de alguna manera son estimuladas para migrar a otras áreas, particularmente en la muscular externa en donde se encontró la mayoría de los infiltrados inflamatorios debido a la infección por *T. cruzi*. Este resultado posiblemente se

encuentre relacionado con una mayor cantidad de parásitos en esta sección y también afecte de manera negativa la activación de macrófagos lo cual estaría relacionado con la posible derivación en una patología.

En el caso de yeyuno, ambas poblaciones de linfocitos T presentaron patrones distintos. Los linfocitos T CD4<sup>+</sup> disminuyeron de manera similar en ambas infecciones en comparación al grupo control y a las demás secciones. Lo cual probablemente estaría indicando otros fenómenos como la apoptosis o la migración de estas células a otras partes del organismo. Estudios han reportado que *T. cruzi* tiene la capacidad de inducir apoptosis en linfocitos T en algunos órganos linfoides (Antunez *et al.*, 1997). Siendo este el primer trabajo que menciona la depleción en intestino delgado por la infección con *T. cruzi*.

Por otra parte los linfocitos T CD8<sup>+</sup> en esta misma sección, mostraron un comportamiento contrario a los linfocitos T CD4<sup>+</sup> en la infección con la cepa Querétaro, donde se observó un aumento en el número de células en comparación al grupo control y a la infección con la cepa Ninoa; sin embargo, cabe mencionar que en la infección con la cepa Ninoa los linfocitos T CD8<sup>+</sup> también fueron mayoría sobre los linfocitos T CD4<sup>+</sup>.

Posiblemente la disminución de linfocitos T CD4<sup>+</sup> no permitió la regulación de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> permitiendo que estos aumentaran en tejido, así el aumento de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> probablemente impidió que el parasitismo aumentara en el tejido, ya que los niveles de parasitismo entre cepas fueron similares.

En el caso de la sección de íleon, los linfocitos T CD4<sup>+</sup> aumentaron en ambas infecciones en comparación al grupo control. Por otro lado, los valores de linfocitos T CD8<sup>+</sup> disminuyeron en la infección con la cepa Ninoa en comparación al grupo control; sin embargo, los valores entre los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> fueron similares tanto en el grupo control como en las infecciones con las cepas Querétaro y Ninoa, lo que probablemente indicaría que los linfocitos T CD4<sup>+</sup> pueden regular de mejor manera la respuesta inmune llevando al control del parásito en el tejido. Tales resultados muestran que el fenómeno inmune es distinto entre cada una de las secciones del intestino delgado, posiblemente por a las diferencias morfo-fisiológicas de cada una, en asociación con las particularidades de cada cepa.

Cabe mencionar que la población de linfocitos T CD8<sup>+</sup> se encuentra constituida por dos poblaciones de linfocitos, los que presentan TCR  $\alpha\beta$  o  $\gamma\delta$  siendo estos últimos particulares del intestino, además de que en su mayoría expresan la molécula CD8 (Lambolez *et al.*, 2007); sin embargo, la participación de los linfocitos T  $\gamma\delta$  en la infección por *T. cruzi* aún es controversial. Ya que algunos estudios en otros órganos muestran propiedades contrarias.

Otros importantes agentes efectores contra la infección por *T. cruzi* son los anticuerpos. Con el propósito de detectar anticuerpos del isotipo IgA en la luz intestinal debido a la infección, se llevaron a cabo una serie de experimentos que demostraron que la presencia de IgA secretora en el intestino es detectable por lo menos en la fase aguda de la infección en la sección de Duodeno en la infección con la cepa Ninoa. No siendo igual para las secciones de yeyuno e íleon, ni en la infección con la cepa Querétaro durante la fase aguda y crónica. Al parecer la secreción de IgA mostró ser particular de la infección con la cepa Ninoa como ha demostrado Espinoza y colaboradores (2010) ya que este anticuerpo fue cuantificado en sangre entre los 35 y 40 días pi. El que sólo en la sección duodeno se hayan detectado niveles de anticuerpos puede ser explicado por dos causas. La primera es que se ha observado que los linfocitos B no son el tipo celular predominante en la protección intestinal. Ya que en individuos que han presentado patologías digestivas, los linfocitos B no presentan niveles significativos (Corbett *et al.*, 2001; Da Silveira *et al.*, 2007 b). La segunda causa indicaría que la producción de anticuerpos específicos a *T. cruzi* es dependiente de la vía de inoculación, siendo general al hecho de que han demostrado que IgA es importante para la protección gástrica y sistémica tras una infección oral o nasal, también se ha demostrado que la producción no es dependiente de la respuesta Th2; sin embargo, la respuesta de IgA específica a *T. cruzi* tiene su máximo a las dos semanas después de la infección y disminuye cuatro semanas después, visto en modelo murino con la cepa Tulahuén (Hoft *et al.*, 1996). Por otro lado, la respuesta específica de IgG a *T. cruzi* continúa a las cuatro semanas posteriores a la infección oral (Hoft y Eickhoff. 2002). De acuerdo a lo anterior es importante remarcar que la detección se llevo a cabo a los 21 y 90 días

después de la inoculación. Se debe aclarar que el número de individuos usados en la detección de IgA fue pequeño, lo cual pudo influir en los resultados.

Los modelos experimentales han sido ampliamente usados para el estudio de varios aspectos de la infección, y la vasta mayoría de los conocimientos de la biología de la infección por *T. cruzi* fueron desarrollados en modelo murino (de Meis *et al.*, 2009). Así, en el presente trabajo se demuestra que ambas cepas Querétaro y Ninoa pertenecientes a TcI son capaces de infectar el intestino delgado tras la inoculación intraperitoneal que es la vía más usada en el modelo murino y semeja la vía natural más común de infección. También se demostró un comportamiento biológico distinto entre las cepas analizadas lo cual repercute en la respuesta inmune presente en el intestino delgado de ratones.

Las causas que pueden provocar estos patrones de comportamiento son particulares de la población del parásito, debido a que las condiciones singénicas de la cepa de ratón favorecen el desarrollo de infecciones similares por ambas cepas. Estas causas pueden ser diversas, como que las poblaciones de parásitos que forman a las cepas sean heterogéneas o diferencias en la expresión de proteínas de membrana y secretadas (Martínez, 2004).

El presente estudio contribuye a un conocimiento más profundo de la capacidad de las cepas mexicanas TcI en infectar el tracto digestivo y contribuye al análisis de la respuesta inmune de mucosas a las cepas circulantes en nuestro país.

## IX. CONCLUSIONES.

---

- Ambas cepas de *T. cruzi* tienen la capacidad de infectar el intestino delgado, aunque muestran comportamientos biológicos distintos. Querétaro es la cepa con mayor patogenicidad e inducción de una respuesta inmune exacerbada al contrario de la cepa Ninoa, aunque ambas pertenezcan al DTU TcI.
- La presencia de macrófagos en la infección con la cepa Querétaro es diferente en las tres secciones del intestino, mostrando ser fundamental en el control del parásito en la sección del íleon.
- La infección con 1000 tripomastigotes de Querétaro y 10,000 tripomastigotes de Ninoa, demostró que la cepa Querétaro es una inductora de un mayor infiltrado inflamatorio que la cepa Ninoa. Por lo que la patogenicidad es una característica intrínseca de la cepa Querétaro.
- Los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> muestran ser activado de manera diferencial a lo largo del intestino:
  - I. En duodeno ocurre la estimulación debido a que migran a distintas capas del intestino delgado; sin embargo, no aumenta la cantidad de linfocitos, lo cual influye en la respuesta inmune y control del parásito.
  - II. En yeyuno, los linfocitos T CD4<sup>+</sup> muestran un decremento en la infección con ambas cepas. La activación probablemente se vea inhibida por *T. cruzi* y como consecuencia no exista la regulación de otros tipos celulares como los linfocitos T CD8<sup>+</sup> los cuales se ven aumentados principalmente en la infección con la cepa Querétaro.
  - III. En íleon, los linfocitos T CD4<sup>+</sup> predominan en la infección con la cepa Querétaro, regulando la activación de distintos tipos celulares entre los que se encuentran CD8<sup>+</sup> y macrófagos.
- La participación de los linfocitos B en la secreción de IgA se ve limitada a la fase aguda en duodeno durante la infección con la cepa Ninoa; lo cual puede contribuir al control del parásito en la luz intestinal. Sin embargo, no juega un papel importante en la protección durante la fase aguda en la infección con la cepa Querétaro, ni durante la fase crónica en intestino delgado.

## X. PERSPECTIVAS

---

- La alteración en la función del intestino delgado debido a la infección por *T. cruzi* se puede evaluar por medio de parámetros como el daño neuronal, fibrosis o la producción NO por parte de los macrófagos.
- Realizar estudios que evalúen la participación de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> αβ y γδ en la infección por *T. cruzi*.
- Llevar a cabo la detección del anticuerpo IgA en la luz intestinal en un rango más amplio de días post infección para averiguar si el perfil se modifica.
- Evaluar la presencia del anticuerpo IgG en la luz intestinal en un rango amplio de días post infección durante la infección con *T. cruzi*.

## XI. REFERENCIAS

---

- Abbas K.A., Lichtman H.A., Pober J. S. 2003. Inmunología celular y molecular, McGRAW-Hill. Interamericana, 4ª edición, España.
- Abrahamsohn I. A. 1998. Cytokines in innate and acquired immunity to *Trypanosoma cruzi* infection. Braz. J. Med. Biol. Res. 31: 117-121.
- Ancha P.N., Szyfres B. 2003. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. Publicación científica y técnica No.580. Organización Panamericana de la Salud (OPS) y Organización Mundial de la Salud (OMS). 3a edición.
- Anonymous. 1999. Recommendations from a satellite meeting. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 94: 429-432.
- Antunez M.I., Feinstein R.E., Cardoni R.L., Gronvik K.O. 1997. *Trypanosoma cruzi*: T cell subpopulations in the Peyer's patches of BALB/c infected mice. Exp. Parasitol. 87: 58-64.
- Arantes R.M.E., Marche H.H.F., Bahia M.T., Cunha F.Q., Rossi M.A., Silva J.S. 2004. Interferon- $\gamma$  induced nitric oxide causes intrinsic intestinal denervation in *Trypanosoma cruzi*-infected mice. Am. J. Pathol. 164: 1361-1368.
- Aufderheide A.C., Salo W., Madden. M., Streitz. J., Buikstra J., Guhl F., Arriazaf, B., Renierh C., Wittmers L.E., Fornaciarij G., Allisonk M. 2004. A 9,000-year record of Chagas' disease. Proc. Nat.l Acad. Sci. USA. 101: 2034-2039.
- Bernabé C., Brisse S., Tibayrenc M. 2000. Population structure and genetic typing of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease: a multilocus enzyme electrophoresis approach. Parasitol. 120: 513-526.
- Beagley K.W., Fujihashi K., Lagoo A.S., Lagoo-Deenadaylan S., Black A., Murray A.M. Sharmanov A.T., Yamamoto M., Mc-Ghee J.R. Elson C.O., Kiyono H. 1995. Differences in Intraepithelial lymphocyte T cell subsets isolated from murine small versus large intestine. J. Immunol. 154:5611-5619.
- Bosseno M.F., Barnabé C., Gastélum E.M., Kasten F.L., Ramsey J., Espinoza B., Brenière S.F. 2002. Predominance of *Trypanosoma cruzi* lineage I in Mexico. J. Clin. Microbiol. 40:627-632.
- Brandtzaeg P., Baekkevold E.S., Farstad I.N., Jahnsen F.L., Jahnsen F.E., Nilsen E.M., Yamanaka T. 1999. Regional specialization in the mucosal immune system: what happens in the microcompartments?. Immunol. Today. 20: 141-151.
- Brandtzaeg P., Farstad I.N. 1994. The human mucosal B-cell. En Ogra L.P., Mestecky J., Lamn E.M., Strober W., Bienenstock J., McGhee J.R. Mucosal Immunology. USA. Academic Press. Pp: 439-468.
- Brenière S.F., Bosseno M.F., Magallón-Gastelúm E., Castillo-Ruvalcaba E.G., Gutierrez M.S., Montano-Luna E.C., Basulto J.T., Mathieu-Daudé F., Walter A., Lozano-Kasten F. 2007. Peridomestic colonization of *Triatoma longipennis* (Hemiptera, Reduviidae) and *Triatoma barberi* (Hemiptera, Reduviidae) in a rural community with active transmission of *Trypanosoma cruzi* in Jalisco state, Mexico. Acta. Trop. 101: 249-257.
- Brisse S., Barnabé C., Tibayrenc M. 2000. Identification of six *Trypanosoma cruzi* phylogenetic lineages by random amplified polymorphic DNA and multilocus enzyme electrophoresis. Int. J. Parasitol. 30: 35-44.
- Bustamante J.M., Bixby L.M., Tarleton R.L. 2008. Drug-induced cure drives conversion to a stable and protective CD8<sup>+</sup> T central memory response in chronic Chagas' disease. Nat. Med. 14: 542-550.

- Cardillo F., Postol E., Nihei J., Aroeira L.S., Nomizo A., Mengel J. 2007. B cells modulate T cells so as to favour T helper type 1 and CD8<sup>+</sup> T-cell responses in the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection. *Immunol.* 122: 584-595.
- Cerutti A., Rescigno A. 2008. The biology of intestinal immunoglobulin A responses. *Immun.* 28: 740-450.
- Corbett C.E.P., Ribeiro U. J., Prianti M.G., Habr-Gama A., Okumura M., Gama-Rodrigues J. 2001. Cell-mediated immune response in megacolon from patients with chronic Chagas' disease. *Dis. Colon. Rectum.* 44: 993-998.
- Coura J.R., Dias J.C.P. 2009. Epidemiology, control and surveillance of Chagas' disease - 100 years after its discovery. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 104: 31-40.
- Coura J.R., Junqueira A.C.V., Fernandes O, Valente S.A.S., Miles M.A., 2002. Emerging Chagas' disease in Amazonian Brazil. *Trends. Parasitol.* 18: 171-176.
- Cruz-Reyes A., Pickering-Lopez J.M. 2006. Chagas' disease in Mexico: an analysis of geographical distribution during the past 76 years –A review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 101: 345- 354.
- Da Silveira A.B.M., Adad S.J., Correa-Oliveira R., Furness J.B., Reis D.D'A. 2007. (a) Morphometric study of eosinophils, mast cells, macrophages and fibrosis in the colon of chronic chagasic patients with and without megacolon. *Parasitol.* 134: 789-796.
- Da Silveira A.B.M., Lemos E.M., Adad S.J., Correa-Oliveira R., Furness J.B., Reis D.D. 2007 (b). Megacolon in Chagas' disease: a study of inflammatory cells, enteric nerves, and glial cells. *Hum. Pathol.* 38: 1256- 1264.
- De Freitas J.M., Augusto-Pinto L., Pimenta J.R., Bastos-Rodrigues L., Goncalves V.F., Teixeira S.M., Chiari E., Junqueira A.C., Fernandes O., Macedo A.M., Machado C.R., Pena S.D. 2006. Ancestral genomes, sex, and the population structure of *Trypanosoma cruzi*. *PLoS Pathog.* 2, e24.
- De Meis J., Ferreira M., Guillermo L.V., Silva E.M., Dosreis G.A. 2008. Apoptosis differentially regulates mesenteric and subcutaneous lymph node immune response to *Trypanosoma cruzi*. *Eur. J. Immunol.* 38: 139-146.
- De Meis J., Morrot A., Farias-de-Oliveira D., Villa-Verde D.M.S., Savino W. 2009. Differential regional immune response in Chagas' disease. *PLoS Negl Trop Dis* 3:e417.
- De Souza W. 2002. Basic cell biology of *Trypanosoma cruzi*. *Curr. Pharm. Des.* 8: 269-285.
- De Souza W. 2009. Structural organization of *Trypanosoma cruzi*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 104: 89-100.
- Devera R., Fernandes O., Coura J.R. 2003 Should *Trypanosoma cruzi* be called "cruzi" complex? A review of the parasite diversity and the potential of selecting population after *in vitro* culturing and mice infection. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 98: 1-12.
- Di Pentima M.C., Edwards S.M. 1999. Enzyme-linked immunosorbent assay for IgA antibodies to *Trypanosoma cruzi* in congenital infection. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 60: 211-214.
- Dias J.C. 2006. Notes about of *Trypanosoma cruzi* and your bio-ecology characteristics with agents of the transmission by meals. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 39: 370-5.



- Dorn P., Buekens P., Harnford E. 2007. Whac-a-mole: Future trends in Chagas transmission and the importance of a global perspective on disease control. *Future. Microbiol.* 2: 365-367.
- Dos Santos D.M., Talvani A., Guedes P.M.M., Machado-Coelho G.L.L., De Lana M., Bahia M.T. 2009. *Trypanosoma cruzi*: Genetic diversity influences the profile of immunoglobulins during experimental infection. *Exp. Parasitol.* 121: 8–14.
- DosReis G., Lopes M.F. 2009. The importance of apoptosis for immune regulation in Chagas' disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 104: 259-262.
- Espinoza B., Rico T., Sosa S., Oaxaca E., Vizcaino-Castillo., Caballero M.L., Martinez I. 2010. Mexican *Trypanosoma cruzi* TCI strains with different degrees of virulence induce diverse humoral and cellular immune responses in a murine experimental infection model. *J Biomed. Biotech.* En prensa.
- Estrada-Franco J.G., Bhatia V., Diaz-Albiter H., Ochoa-Garcia L., Barbabosa A., Vazquez-Chagoyan J.C., Martinez-Perez M.A., Guzman-Bracho C., Garg N. 2006. Human *Trypanosoma cruzi* infection and seropositivity in dogs, Mexico. *Emerg. Infect. Dis.* 12: 624-630.
- Fernandes O., Souto R.P., Castro J.A., Pereira J.B., Fernandes N.C., Junqueira A.C., Naiff R.D., Barrett T.B., Degraeve W., Zingales B., Campbell D.A., Coura J.R. 1998. Brazilian isolates of *Trypanosoma cruzi* from human and triatomines classified into two lineages using mini-exon and ribosomal RNA sequence. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 58: 807- 81.
- Fernandes O., Mangia R.H., Lisboa C.V., Pinho A.P., Morel C.M., Zingales B., Campbell D.A., Jansen A.M. 1999. The complexity of the sylvatic cycle of *Trypanosoma cruzi* in Rio de Janeiro state (Brazil) revealed by the non-transcribed spacer of the mini-exon gene. *Parasitol.* 118: 161–166.
- Garcia S.B., Paula J.S., Giovannetti G.S., Zenha F., Ramalho E.M., Zucoloto S., Silva J.S., Cunha F.Q. 1999. Nitric oxide is involved in the lesions of the peripheral autonomic neurons observed in the acute phase of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Exp. Parasitol.* 93: 191-197.
- Gatner L.P., Hiatt J.L. 2002. Atlas de histología, 2da edición, Mc Graw Hill, USA. Pp: 363-391.
- Gazzinelli R.T., Ropert C., Campos M.A. 2004. Role of the Toll/interleukin-1 receptor signaling pathway in host resistance and pathogenesis during infection with protozoan parasites. *Immunol. Rev.* 201: 9–25.
- Gutierrez F.R.S., Mineo T.W.P., Pavanelli W.R., Guedes P.M.M., Silva J.S. 2009. The effects of nitric oxide on the immune system during *Trypanosoma cruzi* infection. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 104: 236-245.
- Henriksson J., Petterson U., Solari A. 1993. *Trypanosoma cruzi*: correlation between karyotype variability and isoenzyme classification. *Exp. Parasitol.* 77: 334-348.
- Hernández-Becerril N., Nava A., Reyes P.A., Monteon V.M. 2001. IgG subclass reactivity to *Trypanosoma cruzi* in chronic chagasic patients. *Arch. Cardiol. México.* 71:199–205.
- Hoft D.F., Eickhoff C.S. 2002. Type 1 immunity provides optimal protection against both mucosal and systemic *Trypanosoma cruzi* challenges. *Infect. Immun.* 70: 6715-6725.
- Hoft DF, Farrar PL, Kratz-Owens K, Shaffer D. 1996. Gastric invasion by *Trypanosoma cruzi* and induction of protective mucosal immune response. *Infect. Immun.* 64: 3800-3810.

- Hoft D.F., Schnapp S.R., Eickhoff C.S., Roodman S.T. 2000. Involvement of CD4<sup>+</sup> Th1 cells in systemic immunity protective against primary and secondary challenges with *Trypanosoma cruzi*. *Infect. Immun.* 68: 197–204.
- Ishikawa H., Naito T., Iwanaga T., Takahashi-Iwanaga H., Suematsu M., Hibi T., Nanno M. 2007. *Curriculum vitae* of intestinal intraepithelial T cells: their developmental and behavioral. *Immunol. Rev.* 215: 154–165.
- Junt T., Scandella E., Ludewig B. 2008. Form follows function: lymphoid tissue microarchitecture in antimicrobial immune defence. *Nat. Rev.* 8: 764–775.
- Kelsall B., Strober W. 1994. Gut-associated lymphoid tissue. Antigen handling and T-lymphocyte response. En Ogra L.P., Mestecky J., Lamn E.M., Strober W., Bienenstock J., McGhee J.R. *Mucosal Immunology*. USA. Academic Press. Pp: 293–318.
- Kotner J., Tarleton R. 2007. Endogenous CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cells have a limited role in the control of *Trypanosoma cruzi* in mice. *Infect. Immunol.* 75: 861–869.
- Kramer P.H., Arnold R., Lavrik I.N. 2007. Life and death in peripheral T cells. *Nat. Rev. Immunol.* 7: 532–542.
- Kumar S., Tarleton R.L. 2001. Antigen-Specific Th1 but not Th2 cells provide protection from lethal *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *J. Immunol.* 166: 4596–4603.
- Lages-Silva E., Crema E., Ramirez L.E., Macedo A.M., Pena S.D., Chiari E. 2001. Relationship between *Trypanosoma cruzi* and human Chagasic megaesophagus: blood and tissue parasitism. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 65: 435–44.
- Lambolez F., Kronenberg M., Cheroutre H. 2007. Thymic differentiation of TCRαβ<sup>+</sup> CD8αα<sup>+</sup> IELs. *Immunol. Rev.* 215: 178–188.
- Leedale G.F., Vickerman k., 2000. An illustrated guide to the protozoan. Organisms traditional referred to a protozoan, or newly discovered groups. Society of Protozoologist, USA. Lawrence. Pp. 1432.
- Lewis M.D., Llewellyn M.S., Gaunt M.W., Yeo M., Carrasco H.J., Miles M.A. 2009. Flow cytometric analysis and microsatellite genotyping reveal extensive DNA content variation in *Trypanosoma cruzi* populations and expose contrasts between natural and experimental hybrids. *Int. J. Parasitol.* 39: 1305–1217.
- Llewellyn M.S., Miles M.A., Carrasco H.J., Lewis M.D., Yeo M., Vargas J., Torrico F., Diosque P., Valente V., Valente S.A., Gaunt M.W. 2009. Genome-scale multilocus microsatellite typing of *Trypanosoma cruzi* discrete typing unit I reveals phylogeographic structure and specific genotypes linked to human infection. *PLoS Pathog.* 5, e1000410.
- López-Olmos V., Pérez-Nasser N., Piñero D., Ortega E., Hernandez R., Espinoza B. 1998. Biological characterization and genetic Diversity of Mexican isolates of *Trypanosoma cruzi*. *Acta. Trop.* 69: 239–254.
- Lozano-Kasten F., Hernández-Gutiérrez R., Kasten-Monges M., Magallón-Gastélum E., Soto-Gutiérrez M., Ramírez-García M.A. 1997. Manifestaciones digestivas en la fase crónica de la enfermedad de Chagas. *Cir. Ciruj.* 65:10–14.
- Macedo A.M., Martins S.M., Chiari E., Pena S.D.J. 1992. DNA fingerprinting of *Trypanosoma cruzi*: a new tool for characterization of strains and clones. *Mol. Biochem. Parasitol.* 55: 147–154.

- Macedo A.M., Pimenta J., Aguiar R.S., Melo A.I.R., Chiari E., Zingales B., Pena S.D.J., Oliveira R.P. 2001. Usefulness of microsatellites typing in population genetic studies of *Trypanosoma cruzi*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 96: 407-413.
- Machado C.A., Ayala F.J. 2001. Nucleotide sequences provide of genetic exchange among distantly related lineages of *Trypanosoma cruzi*. Proc. Natl. Acad. Sci. 98: 7396-7401.
- Marañón C., Planellers L., Alonso C., Lopez Mc. 2000. HSP70 from *Trypanosoma cruzi* is endowed with specific cell proliferation potential leading to apoptosis. Int. Immunol. 12: 1685-1693.
- Marinho C.R.F., Lima M.R.D., Grisotto M.G., Alvarez J.M. 1999. Influence of acute-phase parasite load on pathology, parasitism, and activation of the immune system at the late chronic phase of Chagas' disease. Infect. Immun. 67:308-318.
- Martínez F.H., Villalobos G.C., Cevallos A.M., De la Torre P., Lacleste J.P., Alejandre-Aguilar R., Espinoza B. 2006. Taxonomic study of the *Phyllosoma* complex and other triatomine (Insecta: Hemiptera: Reduviidae) species of epidemiological importance in the transmission of Chagas disease: Using ITS-2 and mtCytB sequences. Mol. Phylogenet. Evol. 41: 279-287.
- Martínez V.M.L. 2004. Estudio del proteoma de *Trypanosoma cruzi*. Estudio de moléculas con importancia biológica. Tesis de licenciatura. Química. UNAM.
- Martín D., Tarleton R. 2004. Generation, specificity, and function of CD8 $\alpha$  T cells in *Trypanosoma cruzi* infection. Immunol. Rev. 201: 304-317.
- Martín D.L., Tarleton R.L. 2005. Antigen-specific T cells maintain an effector memory phenotype during persistent *Trypanosoma cruzi* infection. J. Immunol. 174: 1594-1601.
- Martins G.A., Cardoso M.A., Aliberti J.C., Silva J.S. 1998. Nitric oxide-induced apoptotic cell death in the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection in mice. Immunol. Lett. 63: 113-120.
- Martins L.P., Marcili A., Castanho R.E., Therezo A.L., de Oliveira J.C., Suzuki R.B., Teixeira M.M., da Rosa J.A., Speranc M.A. 2008. Rural *Triatoma rubrovaria* from southern Brazil harbors *Trypanosoma cruzi* of lineage IIc. Am. J. Trop. Med. Hyg. 79: 427-434.
- Mazzotti L. Investigación sobre la existencia de la enfermedad de Chagas en el país. Demostración de tripanosomas en los reduvidos transmisores. Medicina Rev. Mexicana 1936; 16: 584-585.
- Melo R.C.N., Fabrino D.L. D'Avila H., Teixeira H.C., Ferreira A.P. 2003. Production of hydrogen peroxide by peripheral blood monocytes and specific macrophages during experimental infection with *Trypanosoma cruzi* in vivo. Cell. Biol. Int. 27: 853-61.
- Melo R.C.N. 2009. Acute heart inflammation: ultrastructural and functional aspects of macrophages elicited by *Trypanosoma cruzi* infection. J. Cell. Mol. Med. 13: 279-294.
- Mestecky J., Moro I., Underdown J. 1994. Mucosal immunoglobulins. En Ogra L.P., Lamn E.M., Strober W., Bienenstock J., McGhee J.R. Mucosal Immunology. USA. Academic Press. Pp: 133-152.
- Miles M.A., Lanhan S.M., de Souza A.A., Pova D.G. 1980. Further enzymic characters of *Trypanosoma cruzi* and their evaluation for strain identification. Tran. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 74: 221-242.

- Miles M.A., Toye P.J., Oswald S.C., Godfrey D.G. 1977. The identification by isoenzyme patterns of two distinct strain-groups of *Trypanosoma cruzi* circulating independently in a rural area of Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 71: 217-225.
- Miles M.A., Yeo M., Gaunt M. 2003. Genetic diversity of *Trypanosoma cruzi* and the epidemiology of Chagas' disease. In: Kelly, J.M. (Ed.), *Molecular Mechanisms in the Pathogenesis of Trypanosoma cruzi*. Kluwer Academic/Plenum, New York.
- Moncayo A., Silveira A.C. 2009. Current epidemiological trends for Chagas' disease in Latin America and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 104: 17-30.
- Monteón V., Furuzawa-Carballeda J., Alejandre-Aguilar R., Aranda-Fraustro A., Rosales-Encina J., Reyes P.A. 1996. American Trypanosomiasis: *in situ* and generalized features of parasitism and inflammation kinetics in a murine model. *Exp. Parasitol.* 83: 267-274.
- Monteiro V.G., Lobato C.S., Silva A.R., Medina D.V., de Oliveira M.A., Seabra S.H., de Souza W., DaMatta R.A. 2005. Increased association of *Trypanosoma cruzi* with sialoadhesin positive mice macrophages. *Parasitol. Res.* 97: 380-5.
- Morel C.M., Chiari E., Camargo E.P., Mattei D.M., Romanha A.J., Simpson L. 1980. Strains and clones of *Trypanosoma cruzi* can be characterized by pattern of restriction endonuclease products of kinetoplast DNA minicircles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 77: 6810-6814.
- Moreno-Fierro L., Lopez-Revilla R., Reséndiz-Albor A.A. 2002. Differences between the large and small intestine in the immunodominant amoebic proteins recognized by IgG and IgA antibodies in BALB/c Mice. *Scand. J. Immunol.* 55: 458-669.
- Neutra M.R., Kraehenbuhl J.P. 1994. Cellular and molecular basis for antigen transport across epithelial barriers. En Ogra L.P., Mestecky J, Lamn E.M., Strober W., Bienenstock J., McGhee J.R. *Mucosal Immunol. USA.* Academic Press. Pp: 101-114.
- Nóbrega A.A., Garcia M.H., Tatto E., Obara M.T., Costa E., Sobel J., Araujo W.N. 2009. Oral transmission of Chagas disease by consumption of açai palm fruit, Brazil. *Emerg. Infect.* 15: 653-655.
- Oliveira R.P., Broude N.E., Macedo A.M., Cantor C.R., Smith C.L., Pena S.D.J. 1998. Probing the genetic population structure of *Trypanosoma cruzi* with polymorphic microsatellites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95: 3776-3780.
- Organización Panamericana de la Salud (OPS). 2003. Proyecto del control de la enfermedad de Chagas. Reporte Anual. Proyecto Chagas, Programa Nacional de Chagas, Secretaría de Salud Honduras y Agencia de Cooperación Internacional del Japón (JICA).
- Ornelas D.W., Menezes C.A.S., Villani F.N.A., Da Costa G.C., Da Silveira A.B.M., Reis A.D., Gollo KJ. 2009. Cellular and genetic mechanisms involved in the generation of protective and pathogenic immune responses in human Chagas' disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 104: 208-218.
- Pena SDJ, Machado CR, Macedo AM. 2009. *Trypanosoma cruzi*: ancestral genomes and population structure. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 104: 108-114.
- Pizzi P.T., Wallace R.A., Villagra O.R., Muñoz V.S., Ortiz Z.S., Solari I.A. 2005. Concordancia de lesiones histológicas en ratones infectados por dos poblaciones de *Trypanosoma cruzi* de Chile. *Rev. Méd. Chile.* 133: 432-438.
- Platt A.M., Mowat A.M. 2008. Mucosal macrophages and the regulation of immune responses in the intestine. *Immunol. Lett.* 119: 22-31.

- Primavera K., Hoshino-Shimizu S., Umezawa E., Peres B., Manigot D., Camargo M. 1988. Immunoglobulin A antibodies to *Trypanosoma cruzi* antigens in digestive forms of Chagas' disease. J. Clin. Microbiol. 26: 2101-2104.
- Reyes J.L., Terrazas L.I., Espinoza B., Cruz-Robles D., Soto V., Rivera-Montoya I., Gómez-García L., Snider H., Satoskar A.R., Rodríguez-Sosa M. 2006. Macrophage migration inhibitory factor contributes to host defense against acute *Trypanosoma cruzi* infection. Infect. Immun. 74: 3170–3179.
- Rico Ramírez, 2004, Respuesta inmune celular contra cepas mexicanas de *Trypanosoma cruzi*: papel de las citocinas., Tesis de licenciatura, Biología, F. ciencias, UNAM.
- Sakaguchi S. 2005. Naturally arising Foxp3- expressing CD25<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> regulatory T cells in immunological tolerance to self and not-self. Nat. Immunol. 6: 345-352.
- Salazar-Schettino P.M., Marín-Lopez R.A. 2006. Manual para el diagnostico de la infección por *Trypanosoma cruzi*. UNAM.
- Salazar-Schettino P.M., Tay J., Bucio M.I, Haro I. de, Anzures M.E., Flores-Ayala S. 1984. Primer caso de megaesófago con serología positiva a *Trypanosoma cruzi*. Salud Pub. México. 26: 452-455.
- Sanchez B., Monteón V., Reyes P.A., Espinoza B. 2001. Standardization of Micro-Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) and Western Blot for Detection of *Trypanosoma cruzi* antibodies using extracts from mexican strains as antigens. Arch. Med. Res. 32: 382-388.
- Sánchez-Guillén M.C., López-Colombo A., Ordóñez-Toquero G., Gomez-Albino I., Ramos-Jimenez J., Torres-Rasgado E., Salgado-Rosas H., Romero-Díaz M., Pulido-Pérez P., Pérez-Fuentes R. 2006. Clinical forms of *Trypanosoma cruzi* infected individuals in the chronic phase of Chagas' disease in Puebla, Mexico. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 101: 733-739.
- Sanderson J.R., Walker W.A. 1994. Mucosal barrier: an overview. En Ogra LP, Mestecky J, Lamn EM, Strober W, Bienenstock J, McGhee JR. Mucosal Immunology. USA. Academic Press. Pp: 5-17.
- Sathler-Avelar R., Vitelloi-Avelar D.M., Teixeira-Carvalho A., Martins-Filho O.S. 2009. Innate immunity and regulatory T-cells in human Chagas' disease: what must be understood?. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 104: 246-251.
- Schmunis G.A. 2007. Epidemiology of Chagas' disease in non-endemic countries: the role of international migration. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 102: 75-85.
- Schnapp A.R., Eickhoff C.S., Scharfstein J., Hoft D.F. 2002. Induction of B- and T-cell responses to cruzipain in the murine model of *Trypanosoma cruzi* infection. Microbes Infect. 4: 805–813.
- Sierra-Johnson J., Olivera-Mar A., Monteón-Padilla M.V., Reyes P.A., Vallejo M. 2005. Epidemiological and clinical outlook of chronic Chagas' heart disease in Mexico. Re. Saúde Publica. 39: 754-60.
- Siegel S., Castellan N.J. 2001. Estadística no paramétrica. Aplicada a las ciencias de la conducta. 2ª edición. México. pp: 27-128, 260-357.
- Sosa-Jurado F., Zumaquero-Ríos J.L., Reyes P.A., Cruz-García A., Guzman-Bracho C., Monteón V.M. 2004. Factores bióticos y abióticos que determinan la seroprevalencia de anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi* en el municipio de Palmar de Bravo, Puebla, México. Salud Pub. México. 46: 39- 48.

- Souto R.P., Fernandes O., Macedo A.M., Campbell D.A., Zingales B. 1996. DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. Mol. Biochem. Parasitol. 83: 141-152.
- Spaner D., Cohen B.L., Miller R.G., Phillips R.A. 1995. Antigen-presenting cells for naive transgenic gamma delta T cells. Potent activation by activated alpha beta T cells. J. Immunol. 155: 3866-76.
- Spanner D., Cohen B.L. 1995. Antigen-presenting cell for naive transgenic  $\gamma\delta$  T. Potent-activation by activated  $\alpha\beta$  T cel. J. Immuno. 155: 3866-76.
- Steindel M., Dias N.E., Menezes C, Romanha A., Simpson A.J.G. 1993. Random amplified polymorphic DNA analysis of *Trypanosoma cruzi* strains. Mol. Biochem. Parasitol. 60: 71-80.
- Stumbles P.A., McWilliam A.S., Holt P.G. 1994. Dendritic cell and mucosal macrophages. En Ogra L.P., Mestecky J., Lamn E.M., Strober W., Bienenstock J., McGhee J.R. Mucosal Immunology. USA. Academic Press. Pp: 397-412.
- Sturm N., Campell D.A. 2009. Alternative lifestyles: The population structure of *Trypanosoma cruzi*. Acta. Trop. Doi. : 10, 1016/j.actatropica.2009.08.018
- Suckow M.A., Weichdrod R.H., Douglas F.A. 2001. Management of laboratory animals Care and use programs. CRC Press. Washington D. C. 147 pp.
- 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: 161-9.
- Tarleton R.L., Grusby M.J., Zhang L. 2000. Increased susceptibility of Stat4 deficient and enhanced resistance in Stat6- deficient mice to infection with *Trypanosoma cruzi*. J. Immun. 165: 1520-1829.
- Tarleton R.L. 2007. Immune system recognition of *Trypanosoma cruzi*. Curr. Opin. Immunol. 19: 430-4.
- Tay J., Lara A.R., Velasco C.O. y Gutiérrez Q.M., Parasitología medica, Editores Méndez, 7ª edición, México, DF, 2002. pp:123-146.
- Taylor P.R., Martinez-Pomares L., Stacey M., Lin H.H., Brown G.D., Gordon S. 2005. Macrophage receptors and immune recognition. Annu. Rev. Immunol. 23:901-44.
- Teixeira A.R.L., Nascimento R.J., Sturm N.R. 2006. Evolution and pathology in Chagas – A review. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 105: 463-491.
- Tibayrenc M., Neubauer K., Barnabé C., Guerrini F., Skarecky D., Ayala F. 1993. Genetic characterization of six protozoa: parity between random primer DNA typing and multilocus enzyme electrophoresis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 1335-1339.
- Tibayrenc M. 1995. Population genetics of parasitic protozoa and other microorganisms. Adv. Parasitol. 36: 48-115.
- van der Loos, CM. 2007. 'A focus on fixation', Biotech. Histochem., 82: 141-154.
- Velasco-Castrejon O., Valdespino J.L., Tapia-Conyer R., Salvatierra B., Guzmán-Bracho C., Magos C., Llausás A., Gutiérrez G., Sepulveda J. 1992. Seroepidemiología de la enfermedad de de Chagas en México. Salud Pub. México. 34: 186-196.

- Vizcaíno Castillo. 2007. Respuesta inmune en órganos blanco infectados con cepas mexicanas de *Trypanosoma cruzi*. Tesis de Maestría. Química. UNAM.
- WHO. Expert Committee on the Control of Chagas' Disease. 2002: Brasilia, Brazil. Control of Chagas disease: second report of the WHO expert committee.
- World Health Organization (WHO), Consejo ejecutivo, EB124/17 124ª reunión 27 de noviembre de 2008, Punto 4.14 del orden del día provisional. Enfermedad de Chagas: control y eliminación. Informe de la Secretaría. Pág. apps.who.int/gb/ebwha/pdf\_files/EB124\_17-sp.pdf
- WHO, control of Chagas Disease, second report of the WHO expert committee, 2000.
- Zingales B., Andrade S.G., Briones M.R.S., Campell D.A., Chiari E., Fernandes O., Guhl F., Lages-Silva E., Macedo A.M., Machado C.R.,bwha Miles M.A., Romanha A.J., Sturm N.R., Tibayrenc M., Schijman A.G. 2009. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 104: 1051-1054

### Páginas de Internet consultadas.

- <http://sunibio.unam.mx/chagmex/index2.htm>
- [http://www.fiocruz.br/chagas\\_esp/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=13](http://www.fiocruz.br/chagas_esp/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=13)
- [www.uta.edu/chagas/html/biolTru.html](http://www.uta.edu/chagas/html/biolTru.html)
- <http://www.telmeds.org/AVIM/Apara/flagelados/Trypanosoma/Trypanosoma.htm>
- <http://www.facmed.unam.mx/deptos/salud/periodico/chagas/cruzi.html>
- <http://unibio.unam.mx/chagmex/index2.htm>
- [www.msgpp.org/chagas.shtml](http://www.msgpp.org/chagas.shtml)
- [www.cardioaragon.com/doc.php?op=revista3&id=1...](http://www.cardioaragon.com/doc.php?op=revista3&id=1...)
- [www.enfermedadchagas.com.ar/MEGAVISERCAS.htm](http://www.enfermedadchagas.com.ar/MEGAVISERCAS.htm)
- <http://www.mybodyindex.com/images/content/smallintestine-1.gif>
- [apps.who.int/gb/ebwha/pdf\\_files/EB124\\_17-sp.pdf](http://apps.who.int/gb/ebwha/pdf_files/EB124_17-sp.pdf)

## INMUNIDAD DE MUCOSAS

El tracto digestivo se encuentra constituido de estructuras particulares que le permiten múltiples funciones. En particular el intestino se encuentra organizado por cuatro estructuras definidas, la mucosa (se encuentra en contacto con la luz intestinal) la cual a su vez se divide en epitelio, lamina propia (tejido conectivo) y la muscular mucosae, donde también se encuentra el plexo submucoso; posteriormente se encuentra la submucosa también formada de tejido conectivo; después se pueden ubicar las capas musculares, una capa circular y otra longitudinal, es importante mencionar la ubicación del plexo de Auerbach o mientérico entre estas dos capas y por último en la parte externa del intestino se puede encontrar la tunica serosa o adventicia (Fig. 1) (Gartner y Hiatt, 2002).

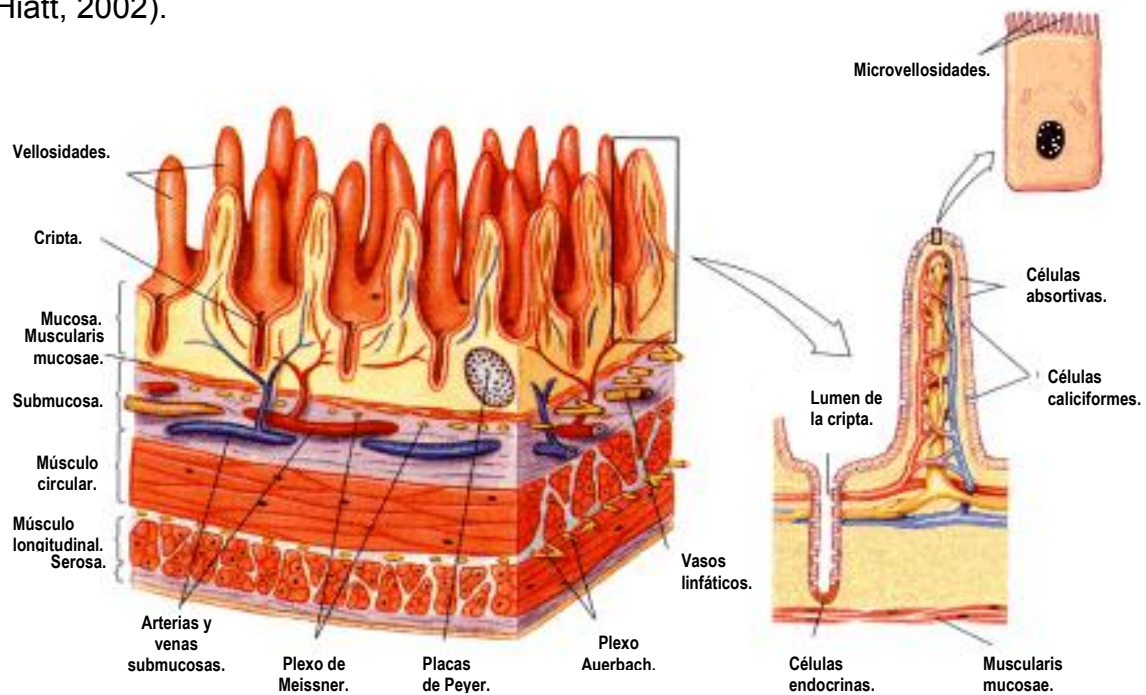


Fig. 1. Morfología del intestino delgado. El esquema muestra las principales estructuras y células que conforman al intestino delgado.

Tomado y modificado de <http://www.mybodyindex.com/images/content/smallintestine-1.gif>

La principal función del intestino es la absorción de los nutrientes, los cuales son llevados a la circulación (Sanderson y Walker, 1994). Sin embargo, continuamente se encuentra expuesto a una serie de antígenos de la dieta o patogénicos, así como a bacterias comensales. Por lo que, para mantener el equilibrio, éste también funciona como una barrera, consistiendo de dos componentes principales. Los mecanismos extrínsecos que limitan la cantidad de antígeno presente en el intestino y la barrera intrínseca que consiste en



estructuras cuyas funciones son propias del intestino (Sanderson y Walker, 1994).

Las barreras extrínsecas se encuentran constituidas por la presencia de proteólisis y acidez gastrointestinal que destruyen las estructuras de los antígenos; la peristalsis que promueve el movimiento constante de los alimentos y por ende de patógenos; las capas de moco, el cual está compuesto principalmente de glicoproteínas (mucinas), que evitan que los patógenos se adhieran a la mucosa intestinal y por último la presencia de inmunoglobulinas secretadas a la luz intestinal.

Por otro lado, la barrera intrínseca se encuentra compuesta por los enterocitos (células absortivas); enzimas y las uniones entre células (Sanderson y Walker, 1994) formando el epitelio, el cual juega un rol transcendental en la activación e inducción de la respuesta inmune. El epitelio es capaz de transportar ciertos antígenos y secretar tanto citocinas (IL-1 $\alpha$ , IL-6, IL-7, TNF- $\alpha$  y TGF- $\beta$ ) como quimiocinas de la familia C-C (RANTES, MIP-1 $\beta$  Y MCP1) y C-X-C (GRO- $\alpha$  y GRO-  $\beta$ , ENA-78), que influyen directamente en las células inmunes y células epiteliales vecinas las cuales producirán más de estas moléculas, como es el caso de IL-7 que junto con IL-2 producida por los linfocitos T, son esenciales para el desarrollo y actividad de los linfocitos T  $\gamma\delta$  y estos a su vez producen factores de crecimiento que estimulan a las células epiteliales (Kelsall y Strober, 1994).

Aunque el epitelio intestinal muestra ser una barrera biológica ante la entrada de patógenos al organismo, es necesaria la presencia de estructuras especializadas del sistema inmune que hagan frente a los organismos extraños al cuerpo.

El tejido linfoide asociado a mucosa MALT (por sus siglas en inglés) y en particular el tejido linfoide asociado a intestino GALT (por sus siglas en inglés) es el encargado de establecer una respuesta inmune ante una infección (Brandtzaeg y Farstad, 1994).

El GALT se divide en dos, los sitios inductores y los sitios efectores. Los sitios inductores se encuentran constituidos por las placas de Peyer, así como por folículos mesentéricos o solitarios. Éstas abundan en el intestino delgado; en humanos principalmente se encuentran en el íleon, mientras que en ratones

abundan a lo largo del intestino delgado. Agregados linfoides similares a las placas están presentes en el colon y el apéndice (Kelsall y Strober, 1994).

Las placas de Peyer presentan una regionalización que les permiten distintas funciones. Las estructuras que las componen son un epitelio asociado a folículo, el domo subepitelial, centro germinal y una región interfolicular (Fig. 2) (Kelsall y Strober, 1994).

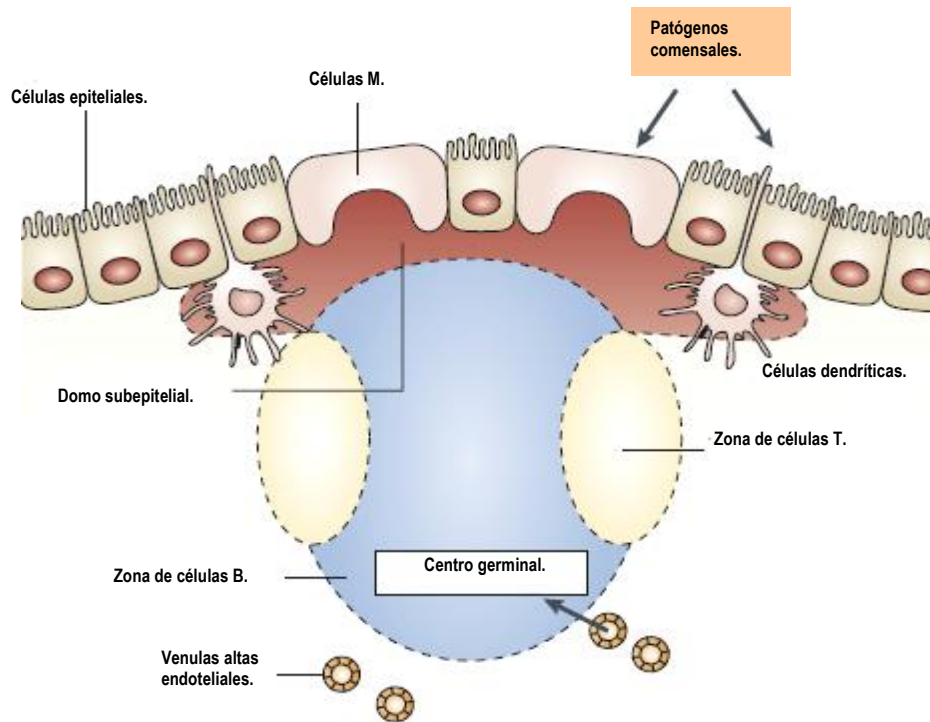


Fig. 2. Placas de Peyer. El esquema muestra las distintas estructuras que componen a las placas de Peyer. El antígeno es tomado directamente de la luz intestinal por las células M es llevado a los centros germinales donde las células dendríticas ayudan a la estimulación de los linfocitos T y B para el posterior drenaje de células y antígenos a través de los nódulos linfáticos regionales. Tomado y modificado de Junt *et al.*, 2008.

El epitelio asociado a folículo, siendo un epitelio especializado y se encuentra poblado por una serie de células de linaje similar al de los enterocitos; sin embargo, presentan una serie de modificaciones como una reducida presencia de microvellosidades, así como la reducción de la actividad enzimática y abundante glucocalix, estas células se denominan células M. Cuya función principal es el transporte de diversos antígenos (microorganismos, partículas, antígenos solubles) del lumen al interior de las placas, por lo que presentan una pronunciada capacidad de formar vesículas. Por otro lado se ha observado que las células M presentan poca especificidad por algún antígeno (Kelsall y Strober, 1994); sin embargo, se ha visto que en la

superficie celular se exhiben patrones de glicosilación distintos a los de las células vecinas, lo que hablaría de una preferencia por cierto antígenos, (Neutra y Kraehenbuhl, 1994) así como de la exclusión de algunos organismos de la flora intestinal. Es importante mencionar que pueden expresar MHC II por lo que podrían funcionar como células presentadoras de antígeno (Kelsall y Strober, 1994).

Las células M presentan invaginaciones en la parte basolateral permitiendo que una población de células mixta se encuentre en su interior teniendo contacto directo con los antígenos que son transportados. Tal población se encuentra constituida por células presentadoras de antígeno APC (por sus siglas en inglés), linfocitos B de memoria y linfocitos T particularmente  $CD4^+$ , así como algunos macrófagos (Brandtzaeg *et al.*, 1999). La función de las APC y linfocitos B es el proceso y captura de los antígenos, posteriormente estas células migraran a las regiones interfoliculares donde se llevara acabo la estimulación de los linfocitos T hacia  $CD4^+$  o  $CD8^+$ . También pueden migrar a los centros germinales estimulando la producción de IgA, por células B que posteriormente migraran a la lamina propia donde se transformaran en células plasmáticas productoras de SIgA (Kelsall y Strober, 1994).

Los centros germinales se encuentran poblados por células B vírgenes así como por linfocitos T especialmente  $CD4^+$  y redes de células dendríticas foliculares. La principal función de los centros germinales es la estimulación de las células B para la producción de anticuerpos particularmente IgA, las cuales como anteriormente se menciona, migrarán a la lamina propia (Kelsall y Strober, 1994).

Ahora bien, los sistemas linfoides sistémico y mucoso tienen una relación equivalente de células T residentes. Por lo que, tanto la respuesta Th1 como la Th2 tiene la misma capacidad de ocurrir, desde luego, alguna se vera favorecida debido a ciertas condiciones. La respuesta Th2 se favorece tras una infección por vía oral. Sin embargo, se ha observado que en infecciones con *Toxoplasma gondii* y *Salmonella typhimurium* se genera una respuesta de tipo Th1 en particular por ser organismos intracelulares, cabe mencionar que este fenómeno ocurre en las placas de Peyer, donde las células T activadas migraran a los sitios efectores. Cabe mencionar que esta respuesta es importante en la activación de macrófagos.

Una vez que ha comenzado la respuesta inmune ante la infección y varios tipos celulares han sido activados, estos migrarán a los sitios efectores los cuales se pueden encontrar a largas distancias de los sitios inductores. El principal sitio efector es la lámina propia en donde se pueden encontrar distintas células del sistema inmune como: linfocitos, macrófagos, células dendríticas, neutrófilos, granulocitos y células cebadas (Abbas *et al.*, 2003).

Los linfocitos que se encuentran en la lámina propia juegan un papel importante frente a organismos invasores. Así los linfocitos T CD4<sup>+</sup> que migran a la lámina propia se encuentran en una proporción de entre 60% y 70% en comparación con otros linfocitos, el 95% de estos expresan TCR  $\alpha\beta$  por lo que exhiben fenotipos maduros o de memoria, cabe mencionar que estos linfocitos presentan una baja proliferación; sin embargo, son altamente activos ya que pueden expresar altas concentraciones (tras una apropiada estimulación) de citocinas de la mezcla de Th1 (IFN- $\gamma$ ) y Th2 (IL-4 e IL-5) (Kelsall y Strober, 1994). Por otra parte, los linfocitos T CD8<sup>+</sup> del intestino muestran dos poblaciones. La primera se encuentra entre el 30% y 40% del total, estos linfocitos presentan un TCR  $\alpha\beta$  y moléculas CD8 $\alpha\beta$  o CD8 $\alpha\alpha$ . Estos linfocitos son dependientes del MHC I para la presentación del antígeno. Como se sabe estos linfocitos muestran una capacidad citotóxica por lo que son de suma importancia en la protección contra patógenos intracelulares como algunos virus o parásitos.

La segunda población esta constituida por linfocitos T CD8<sup>+</sup> que expresan TCR  $\gamma\delta$  y la molécula CD8 $\alpha\alpha$  (Ishikawa *et al.*, 2007). Más del 50% de linfocitos T en la mucosa del intestino delgado de ratones expresan este fenotipo (Abbas *et al.*, 2003), aunque este dato puede variar dependiendo de la cepa y entre el intestino delgado y el colon (Beagley *et al.*, 1995). También presentan actividad citotóxica (Ishikawa *et al.*, 2007; Kelsall y Strober, 1994). Sin embargo, los linfocitos T  $\gamma\delta$ , no reconocen antígenos peptídicos asociados a las moléculas MHC ya que no están restringidos por éstas. De tal forma que la diversidad de ligandos para estos receptores es limitada; siendo invariable, debido a que reconocen antígenos conservados (Abbas *et al.*, 2003). Estos linfocitos pueden secretar una variedad de citocinas como: IL-2, IL-5, IFN- $\gamma$  y TGF- $\beta$  así como TNF-  $\alpha$  y TNF- $\beta$ . No producen IL-4 como lo linfocitos T CD8<sup>+</sup> comunes (Kelsall y Strober, 1994).

Por otro lado, cerca del 80% de los linfocitos B se transforman en células plasmáticas productoras de IgA, y en menor número células productoras de IgG e IgM. El anticuerpo IgA es el principal componente efector del sistema inmune mucoso. Particularmente es secretado (SIgA) al lumen, en forma dimérica (evita la proteólisis del anticuerpo) a través de las células absortivas (Mestecky *et al.*, 1994). Para la maduración de las células B y secreción de IgA es importante la presencia de ciertas citocinas como lo serían IL-2, IL-5, IL-6, IL-10 y TGF- $\beta$  (Brandtzaeg y Farstad, 1994).

La distribución de células productoras de IgA muestra diferencias a lo largo del intestino, por lo menos en estudios realizados en humanos, la mayor cantidad de estos linfocitos se observa en la lámina propia del colón (99%), y en las secciones de Íleon (98%), Yeyuno (85%) y Duodeno (79%) en condiciones fisiológicas normales (Brandtzaeg *et al.*, 1999). En comparación con IgM la cual se encuentra a lo largo del intestino entre el 18% y 6% y en menor cantidad IgG el cual se encuentra entre el 5% y el 3%, tal vez debido a la actividad proteolítica en el intestino (Brandtzaeg y Farstad, 1994).

Los anticuerpos IgA de alta afinidad se derivan de vías dependientes de los linfocitos T activados, y protegen las superficies mucosas de la invasión de patógenos. Mientras que los anticuerpos IgA derivados de vías independientes de los linfocitos T funcionan como controladores de las bacterias comensales.

IgA también media el tránsito apical-basolateral de antígenos a través de las células M o a través de las células epiteliales, tales fenómenos pueden ser críticos para el establecimiento o expansión de la respuesta inmune. Otra de las funciones importantes es la neutralización de patógenos ayudando a la eliminación de estos a través del intestino (Cerutti y Rescigno, 2008).

Entre otros tipos celulares importantes se encuentran las células NK, las cuales para su desarrollo necesitan la presencia de IL-2 (respuesta Th1) y cuyos precursores se encuentran en la lámina propia.

Los macrófagos son importantes células efectoras en la lámina propia. En la ausencia de alguna señal de inflamación, los monocitos circulan en la sangre para posteriormente migrar al interior de los tejidos en los cuales se diferenciarán en macrófagos maduros, siendo una población residente en el tejido. En el tracto gastrointestinal estos macrófagos predominan por debajo del epitelio y expresan MHC II. Su principal función es la de eliminar células

epiteliales apoptóticas y la regulación en la renovación del epitelio mucoso (Stumbles *et al.*, 1994). Como macrófagos residentes del intestino no producen citocinas inflamatorias, así también exhiben una baja expresión de ciertos receptores como los TLR o el receptor de manosa, esto con respecto a los macrófagos sanguíneos; lo cual podría contribuir al mantenimiento de la homeostasis intestinal. Sin embargo, se ha encontrado que esta regulación negativa se ve influenciada por la secreción de citocinas IL-10 y TGF- $\beta$ , esto se demostró en ratones KO para IL-10 donde se observó un aumento en la secreción de citocinas en macrófagos colonicos debido a la estimulación de los TLR por sus ligandos (Platt y Mowat, 2008).

Bajo la influencia de varias citocinas los macrófagos pueden ser inducidos a un estado de activación en el cual hay modificaciones morfológicas, funcionales y metabólicas con respecto al estado residente. Estos cambios morfológicos se ven reflejados en un incremento en la capacidad de penetrar en los tejidos, fagocitar y eliminar a microorganismos, así como en la capacidad de producir citocinas incluyendo TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 e IL-8. De la misma manera la expresión de ciertos marcadores también se ve modificada como es el caso de F4/80, el cual disminuye, se incrementa LFA-1. Tal activación es controlada por los productos de los linfocitos T. Es importante mencionar que como APC son poco funcionales y que en algunos casos llegan a inhibir la activación de los linfocitos T, debido a que pueden producir grandes cantidades de NO, mediando de esta forma la inhibición en la fosforilación de la tirosina de la cinasa intracelular de los linfocitos T. Este sería un importante mecanismo de regulación de la respuesta de las células T; sin embargo, este proceso puede ser reversible mostrando una pauta para el establecimiento de inmunidad adaptativa (Stumbles *et al.*, 1994).

Una vez que se ha montado una respuesta de tipo Th2 (principalmente a helmintos), el número de macrófagos se ve incrementado, así como la expresión del receptor de manosa y del MHC II, por lo que su actividad fagocítica aumenta; también se ve favorecido el incremento de quimiocinas tal es el caso CCL22 las cuales atraen a linfocitos T CD4<sup>+</sup> Th2.

Durante la actividad clásica de los macrófagos se expresa arginasa la cual convierte a la arginina en prolina, resultando en la proliferación de fibroblasto y producción de colágeno, promoviendo la producción de fibrosis y

remodelación del tejido, esto durante una respuesta de tipo Th2 (Platt y Mowat, 2008).

En el fenómeno patológico, ocurre un desequilibrio en las funciones de los macrófagos los cuales, como se ha visto anteriormente, se encuentran regulados de manera fina para evitar daños al tejido, desde luego cuando se llega a establecer un ambiente inadecuado en el intestino, se ha observado que estas células modifican su comportamiento, liberando grandes cantidades de quimioatrayentes pro-inflamatorios tales como IL-8, lo que induce el reclutamiento de células mononucleares y granulocitos, exacerbando la respuesta. Por otra parte la producción de IL-1 y TNF- $\alpha$  por los macrófagos (cuya secreción no ocurre en condiciones normales) puede inducir a la apoptosis de células epiteliales y una disfunción de la barrera, daño vascular y necrosis (Platt y Mowat, 2008).

### SILANIZACIÓN DE PORTAOBJETOS<sup>1</sup>

Material.

Portaobjetos.

Cajas de tinción.

Solución de HCl 10% en EtOH 70% (para preparar 500ml; 135ml de HCl 37% más 365ml EtOH 70%).

EtOH 96 %.

TESPA 4% en acetona (preparar aproximadamente 250ml).

Agua bidestilada.

Guantes.

Procedimiento.

1. Colocarse guantes para manejar los portaobjetos.
2. Precalentar el horno a 15°C.
3. Colocar cada uno de los reactivos en las cajas de tinción.
4. Sumergir las laminillas varias veces en HCl 10%/ EtOH 70%.
5. Lavar en agua bidestilada.
6. Sumergir las laminillas varias veces EtOH 96 %.
7. Sacudir y meter al horno (precalentado a 150°C) hasta que sequen las laminillas.
8. Dejar enfriar.
9. Sumergir en TESPA 4% por 10seg (se recomienda hacerlo dentro de la campana de extracción ya que el TESPA es sumamente toxico).
10. Lavar en agua bidestilada
11. secar a 42°C.

Notas.

La concentración del TESPA se puede modificar, si los tejidos se desprenden de las laminillas silanizadas.

Guardar la solución de TESPA mientras no se use en recipiente ámbar a 4°C, si ya no se va a usar el mismo día desechar no reciclar.

Recuerda utilizar guantes para tocar las laminillas una vez silanizadas.

---

<sup>1</sup>Vizcaino, 2007.



### OBTENCIÓN DE ÓRGANOS PARA INCLUSIÓN EN PARAPLAST<sup>1</sup>

#### Material.

Pinzas, tijeras.  
Base para disección.  
Viales (etiquetados).  
Gradillas.  
Sanitas.  
Jeringa de 3ml.  
Éter.  
Caja petri.  
Paraformaldehído al 4% (descongelar al momento) (Ver anexo VI).  
Tubos eppendorf de 1.5ml (etiquetados).  
PBS1X (pH 7.2- 7.4) + inhibidores de proteasas.  
Canulas 1.20 x 38 mm. (las necesarias).  
Guantes gruesos o doble guante.

#### Procedimiento.

1. Distribuir el paraformaldehído en los viales aproximadamente 8ml por vial de manera que el órgano quede bien cubierto. <sup>a</sup>
2. Anestesiarse al ratón con éter hasta que casi muera.
3. Obtener toda la sangre posible por punción cardiaca usando la jeringa de 3ml y colocarla en un tubo eppendorf de 1.5ml. <sup>b</sup>
4. Si el ratón aun no ha muerto, sacrificarlo por dislocación cervical.
5. Bañarlo en alcohol al 70%.
6. Llevar al cadáver al interior de un ambiente estéril y colocarlo sobre la base de disección en forma ventral, de forma que quede bien asegurado. <sup>c</sup>
7. Realizar un corte en la base del abdomen, separar la piel del ratón dejando libre la cavidad peritoneal para retirar el peritoneo.
8. Ubicar los órganos requeridos y extraerlos. <sup>d</sup>
9. Extraer corazón y cortarlo por la mitad, el músculo esquelético cortarlo en forma de cubo y fijar inmediatamente en paraformaldehído 4%, 2h a temperatura ambiente (T. A.).
10. Extraer 3cm de cada una de las tres secciones del intestino delgado que son: Duodeno, Yeyuno e Íleon. <sup>e</sup>
11. Las secciones deben ser fijadas en paraformaldehído lo más rápido posible por 2h a T. A.

#### Notas.

Las condiciones de disección deben ser estériles, se recomienda limpiar el área de trabajo antes y después de la disección de cada espécimen, así también se recomienda usar las medidas necesarias si se trabaja con ratones infectados como: guantes, bata y careta.

a. La cantidad de paraformaldehído agregado al vial es proporcional al tamaño de la muestra, entre más grande sea la muestra más paraformaldehído se debe agregar.

b. Se recomienda que la punción cardiaca sea de manera rápida antes de que el ratón muera, lo que permite una mayor extracción de sangre y por tanto la obtención de órganos limpios de fluidos corporales.

c. La disección de los ratones se debe realizar en una campana de flujo laminar para evitar la contaminación de la muestra, así como por seguridad del científico.

d. Se recomienda que el número de manipulaciones al tejido sea el menor, para evitar causar daño a las muestras; especialmente al intestino delgado.

e. Ubicar el intestino delgado, tomar con pinzas éste y con sumo cuidado sacarlo de la cavidad de tal manera que se facilite la ubicación de las secciones, para cortar el segmento correspondiente al duodeno ubicar la parte próxima del intestino al estómago y a partir de esta unión cortar aproximadamente 2cm. Para el caso del yeyuno, seccionar la parte media y para ubicar al íleon cortar en la parte anterior al ciego.

---

<sup>1</sup>Vizcaino, 2007.

### PREINCLUSIÓN<sup>1</sup>

Material.

Viales.

Gradillas.

Pinzas.

PBS1X, pH 7.2-7.4.

EtOH recién preparado (70%, 90%, 96% y 100%).

Xilol nuevo.

Paraplast y mezcla de paraplast/xilol.

Incubadora a 50°C.

Procedimiento.

1. Una vez que el tejido se a fijado por 2h en paraformaldehído se debe decantar este y agregar PBS1X por 15min a T. A.
2. Transferir los órganos a un vial limpio con PBS1X, durante 10min a T. A.
3. Decantar el PBS anterior y realizar otro lavado con PBS, por 10min a T. A. <sup>a</sup>
4. Transferir los órganos a otro vial, con EtOH 70%, durante 1h, T. A. <sup>b</sup>
5. Transferir los órganos a otro vial, con EtOH 90%, durante 1h, T. A.
6. Transferir los órganos a otro vial, con EtOH 96%, durante 1h, T. A. <sup>c</sup>
7. Transferir los órganos a otro vial, con EtOH 100%, durante 1h, T. A.
8. Transferir los órganos a otro vial con xilol nuevo, durante 1h.
9. Transferir los órganos a otro vial con xilol/paraplast, por 1h a 50°C. <sup>d</sup>
10. Transferir los órganos nuevamente a otro vial con paraplast, durante toda la noche a 50°C.

Notas.

a. Al decantar los líquidos tener sumo cuidado en que los tejidos no se vayan junto con el líquido decantado.

b. Los órganos se deben transferir con la ayuda de unas pinzas para lo cual se debe cuidar no presionar demasiado los tejidos para evitar dañarlos. Así también tener cuidado en el uso del Xilol ya que este es un solvente muy volátil, se recomienda utilizarlo en el interior de una campana de extracción.

c. En esta incubación se recomienda colocar el paraplast en la incubadora a 50°C para que se derrita.

d. Colocar en viales con una mezcla de xilol/paraplast derretido, en volúmenes iguales.

### INCLUSIÓN DE ÓRGANOS EN PARAPLAST<sup>1</sup>

Materiales.

Moldes de metal.

Soportes de plástico, etiquetados.

Pipeta Pasteur de plástico.

Pinzas.

Escurreidores de metal para parafina.

Paraplast.

Incubadora a 50°C.

Procedimiento.

1. Ajustar la temperatura a 50°C teniendo cuidado de no sobrepasar tal temperatura.
2. Meter a la incubadora (50°C) los soportes de plástico; los moldes de metal, pipetas de plástico (con la punta cortada), y suficiente paraplast.
3. Llenar las cunetas de los moldes de metal con suficiente paraplast con ayuda de las pipetas.
4. Acomodar los órganos en la cuneta lo más junto posible (este paso se debe realizar en el interior de la incubadora).
5. Sacar el molde y colocarle encima el soporte de plástico.

---

<sup>1</sup>Vizcaino, 2007.

6. Lo más rápido posible (para evitar que se enfríe el paraplast y forme laminillas, lo cual perjudica el bloque) y agregando poco a poco el paraplast evitando burbujas y de tal manera que no se derrame por las orillas del molde.
7. Llenar el molde de plástico aproximadamente  $\frac{3}{4}$  de su capacidad
8. Dejar solidificar en su totalidad.
9. Colocar paraplast en la cuneta de otros moldes.
10. Esperar a que la incubadora recobre su temperatura a 50°C antes de incluir las siguientes muestras.

Notas.

Al colocar los órganos en la cuneta se recomienda, que el corazón el cual se encuentra cortado por la mitad, la parte del corte vaya bocabajo; el intestino, se debe colocar en pequeños fragmentos y se recomienda que estos queden parados en el momento de incluirlos.

### DESPARAFINACIÓN<sup>1</sup>

Material.

4 cajas coplin.  
Pinzas.  
Sanitas.  
Timer.  
Xilol.  
Tren de EtOH, 100%, 96%, 70%, 50%.  
Agua bidestilada.  
PBS 1X pH7.2- 7.4

Procedimiento.

1. Colocar las laminillas en las cajas coplin de forma que los tejidos queden en una sola dirección.
2. Agregar Xilol, durante 10min. <sup>a</sup>
3. Transferir las laminillas a otra caja coplin con xilol nuevo, durante 10min.
4. Transferir las laminillas a otra caja coplin con EtOH al 100% por 5min. <sup>b</sup>
5. Cambiar a EtOH al 96%, por 5min.
6. Cambiar a EtOH al 70%, por 5min.
7. Cambiar a EtOH al 50%, por 5min. <sup>c</sup>
8. Transferir las laminillas a otra caja con agua bidestilada, por 10 min.

Notas.

- a. Manejar el xilol en el interior de la campana de extracción, usar guantes y pinzas para transferir las laminillas. Mantener el xilol cerrado para evitar la rápida hidratación de esté.
- b. Los cambios de EtOH se realicen con ayuda de un embudo, no usar el mismo embudo para el xilol y el EtOH.
- c. Tanto el xilol como el tren de EtOH son reutilizables, se recomienda que el número de veces utilizado sean pocos, ya que se saturan de paraplast disminuyendo su efecto; sin embargo, se recomienda usar xilol nuevo y EtOH recién preparado si se va a realizar inmunohistoquímica.

---

<sup>1</sup>Vizcaino, 2007.

### TINCIÓN HEMATOXILINA/EOSINA PARA CORTES HISTOLÓGICOS INCLUIDOS EN PARAPLAST<sup>1</sup>

#### Material.

Cajas de tinción.  
Pinzas.  
Sanitas.  
Timer.  
Cubreobjetos.  
Hematoxilina de Harris.  
Alcohol ácido recién preparado (ver anexo VI).  
Agua bidestilada.  
EtOH 100%, 96%, 80%, 70%.  
Eosina.  
Xilol.  
Pipeta Pasteur de vidrio.  
Resina para montar Permout.

#### Procedimiento.

1. Desparafinar.
2. Colocar todos los reactivos en las cajas de tinción. <sup>a</sup>
3. Transferir las laminillas a una caja de tinción con hematoxilina, durante 4min. <sup>b</sup>
4. Transferir las laminillas al alcohol ácido y sumergir tres veces.
5. Lavar las laminillas en agua bidestilada.
6. Transferir las laminillas al EtOH 70%, por 2min.
7. Transferir las laminillas al EtOH 80%, por 2min.
8. Transferir las laminillas a una caja de tinción con eosina, por 3min.
9. Transferir las laminillas al EtOH 80%, por 2min.
10. Transferir las laminillas al EtOH 96%, por 2min.
11. Transferir las laminillas al EtOH 70%, por 2min.
12. Transferir las laminillas a una caja con xilol (1), durante 5min. <sup>c</sup>
13. Transferir nuevamente las laminillas a una caja con xilol (2), durante 5min.
14. Colocar una laminilla en una caja petri la cual debe contener xilol nuevo, mover de manera que cubra perfectamente el tejido.
15. Tomar la laminilla escurrir el exceso de xilol.
16. Secar la laminilla por la parte de atrás con una sanita.
17. Montar la laminillas con resina Permout. <sup>d</sup>
18. Dejar secar a temperatura ambiente, por 24h.

#### Notas.

a. Al agregar la hematoxilina en la caja colocar la tapa inmediatamente debido a que este reactivo se oxida con facilidad. Se recomienda que de manera frecuente se filtre para evitar que la nata causada por oxidación cree artefactos en la tinción.

b. Las laminillas deben ser colocadas con ayuda de unas pinzas en la caja de preferencia dirigidas en una dirección. Se debe tener mucho cuidado con los tiempos de tinción.

c. Se recomienda que el xilol se maneje en el interior de una campana de extracción.

d. Para montar una por una las laminillas ésta se debe tomar de forma horizontal entre los dedos pulgar y anular, con ayuda de una pipeta Pasteur colocar una línea horizontal en la parte superior a los cortes con resina. Tomar el cubreobjetos y cubrir los tejidos muy despacio de manera que no se formen burbujas.

---

<sup>1</sup>Vizcaino, 2007.

### OBTENCIÓN DE ÓRGANOS E INCLUSIÓN EN TISSUE TECK<sup>2</sup>

#### Materiales.

Sanitas.  
Etanol (EtOH) al 70%.  
Cloro.  
Material de disección.  
Base para disección.  
Guantes.  
Bata.  
Caretas si se trabaja con animales infectados.  
Jeringas de 3ml.  
Tubos eppendorf de 1.5ml (etiquetados).  
Caja de petri.  
PBS1X.  
Tissue Tek.  
Hielera con hielo seco.  
Gradillas.  
Tubos eppendorf de 0.6 ml o tubos para PCR.

#### Procedimiento.

1. Lavar con anterioridad el material de disección con jabón y cloro.
2. Formar tres paquetes con tijeras y pinzas, esterilizar 20min por 10min de secado. <sup>a</sup>
3. Limpiar con EtOH 70% la campana de flujo laminar e introducir el material.
4. Comenzar colocándose doble guante.
5. Anestesiarse al ratón con éter hasta que casi muera.
6. Obtener toda la sangre posible por punción cardiaca usando la jeringa de 3ml y colocarla en un tubo eppendorf de 1.5ml. <sup>b</sup>
7. Si el ratón aun no ha muerto, sacrificarlo por dislocación cervical.
8. Bañarlo en alcohol al 70%.
9. Colocarlo en la base de disección y sujetarlo. Utilizar un paquete de tijeras y pinzas.
10. Realizar un corte en la base del abdomen, separar la piel del ratón dejando libre la cavidad peritoneal para retirar el peritoneo.
11. Ubicar los órganos requeridos y extraerlos. <sup>c</sup>
12. Extraer 2 cm de cada una de las secciones del intestino delgado: Duodeno, Yeyuno e Íleon.
13. Colocarlas en la caja de petri y lavarlas en PBS1X.
14. Tomar cada sección e incluirlas de manera vertical en el interior del tubo de PCR (usado como molde) colocando Tissue Tek una vez hecho lo anterior inmediatamente introducir el tubo con el tejido en hielo seco.
15. Congelar a -70°C.
16. Rosear el cadáver con EtOH 70% envolver en una sanita y colocar en una bolsa adecuada para posteriormente desechar. <sup>d</sup>

#### Notas

- a. Cada paquete de disección será utilizado para cada grupo de ratones infectados (uno para Ninoa, uno para Querétaro y uno para los controles).
- b. Se recomienda que la punción cardiaca sea de manera rápida antes de que el ratón muera, lo que permite la mayor extracción de sangre y por tanto la obtención de órganos limpios de fluidos corporales.
- c. Se recomienda que el número de manipulaciones al tejido sea el menor, para evitar causar daño a las muestras; especialmente intestino delgado.
- d. Entre cada ratón cambiar de guantes y desechar los anteriores. Una vez terminado de deberá limpiar de forma adecuada la campana con EtOH o cloro.

---

<sup>2</sup>van der Loos, 2007.

### TINCIÓN HEMATOXILINA/EOSINA PARA CORTES HISTOLÓGICOS INCLUIDOS EN TISSUE TECK<sup>2</sup>

Material.

Cajas de tinción.  
Pinzas.  
Sanitas.  
Timer.  
Cubreobjetos.  
Paraformaldehído al 4% (acabado de descongelar).  
Hematoxilina de Harris.  
Alcohol ácido recién preparado (Ver anexo VI).  
Agua bidestilada.  
EtOH 100%, 96%, 80%, 70%.  
Eosina.  
Xilol.  
Pipeta Pasteur de vidrio.  
Resina para montar Permount.

Procedimiento.

1. Seleccionar las laminillas que van a ser teñidas.
2. Estas se deberán atemperar de -70°C a -20°C, por 20min.
3. Colocarlas en una caja con paraformaldehído, durante 10min. <sup>a</sup>
4. Sumergir las laminillas en agua bidestilada, por 10min. <sup>b</sup>
5. Colocar todos los reactivos en las cajas de tinción.
6. Transferir las laminillas a una caja de tinción con hematoxilina, durante 4min. <sup>c</sup>
7. Transferir las laminillas al alcohol ácido y sumergir tres veces.
8. Lavar las laminillas en agua bidestilada.
9. Transferir las laminillas al EtOH 70%, por 2min.
10. Transferir las laminillas al EtOH 80%, por 2min.
11. Transferir las laminillas a una caja de tinción con eosina, por 3min.
12. Transferir las laminillas al EtOH 80%, por 2min.
13. Transferir las laminillas al EtOH 96%, por 2min.
14. Transferir las laminillas al EtOH 100%, por 2min.
15. Transferir las laminillas a una caja con xilol (1), durante 5 min. <sup>d</sup>
16. Transferir nuevamente las laminillas a una caja con xilol (2), durante 5 min.
17. Colocar una laminilla en una caja petri la cual debe contener xilol nuevo, mover de manera que cubra perfectamente el tejido.
18. Tomar la laminilla escurrir el exceso de xilol.
19. Secar la laminilla por la parte de atrás con una sanita.
20. Montar la laminilla con resina Permount. <sup>e</sup>
21. Dejar secar a temperatura ambiente, por 24h.

Notas.

- a. Las laminillas deberán ser fijadas en paraformaldehído para guarda en mejores condiciones la estructura celular.
- b. Cuidar que el tiempo en que se lavan las laminillas sean 10 min y no menos ya que de esta forma se elimina el Tissue Tek restante en el tejido.
- c. Las laminillas deben ser colocadas con ayuda de unas pinzas en la caja de preferencia dirigidas en una dirección. Se debe tener mucho cuidado con los tiempos de tinción.
- d. Se recomienda que el xilol se maneje en el interior de una campana de extracción.
- e. Para montar una por una las laminillas ésta se debe tomar de forma horizontal entre los dedos pulgar y anular, con ayuda de una pipeta Pasteur colocar una línea horizontal en la parte superior a los cortes con resina. Tomar el cubreobjetos y cubrir los tejidos muy despacio de manera que no se formen burbujas.

---

<sup>2</sup>van der Loos, 2007.

### INMUNOFLUORESCENCIA<sup>1</sup>

#### Material.

Caja petri de tamaño grande.

Sanitas.

Piceta.

Timer.

Plumón PAP PEN.

Micropipetas.

Puntas para micropipetas.

Papel aluminio.

Cubreobjetos.

PBS1X. pH 7.2- 7.4.

BSA 2%/PBS1X y 0.5%/PBS1X.

Anticuerpos primarios: F4/80 para la detección de macrófagos.

Anti-*T. cruzi*, anticuerpo policlonal producido previamente en nuestro laboratorio a partir de la inmunización de un conejo con extracto total de tripomastigotes de la cepa Querétaro.

Anticuerpos control negativo: isotipo IgG2b y suero preinmune.

Conjugado estreptavidina- ficoeritrina.

Anticuerpo secundario IgG- FITC.

Gel para montar (GEL/Mount.).

#### Procedimiento.

1. Desparafinar.

2. Fabricar una cámara húmeda con ayuda de una caja petri, colocando en su interior un trozo de sanita de manera que cubra la superficie inferior, rosear la sanita con aguabidestilada de piceta solo lo necesario para mantenerla húmeda.

3. Con unas pinzas tomar alguna de las laminillas, sostenerla por alguna de las orillas y con una sanita retirar el exceso de agua por delante y atrás.

4. Alrededor de cada corte hacer círculos con el plumón PAP PEN, de tal forma que los líquidos al ser colocados en el corte no se derramen.

5. Colocar la laminilla en el interior de la cámara húmeda

6. Agregar 200µl de PBS1X por corte e incubar durante 5min., T. A.

7. Retirar con una pipeta el PBS1X y colocar nuevamente PBS1X, por 5min.

8. Eliminar el PBS1X.

9. Colocar 100µl de BSA 2%/PBS1X por corte e incubar 2h a T. A.

10. Al término de la incubación eliminar la BSA 2%/PBS1X y agregar 50µl de los anticuerpos primarios preparados en BSA 0.5%/PBS1X. Cubrir la cámara húmeda con papel aluminio, incubar por toda la noche a 4°C.

11. Quitar el anticuerpo primario con ayuda de una pipeta.

12. Repetir el paso 6, tres veces.

13. En condiciones de poca luz agregar 50µl del anticuerpo secundario o del conjugado; colocar el papel aluminio, incubar por 1h a T. A.

14. Repetir el paso 6 tres veces.

15. Contrateñir los núcleos celulares con DAPI, por 10seg.

16. Lavar con abundante agua bidestilada.

17. Montar.

---

<sup>1</sup>Vizcaino, 2007.

### INMUNOHISTOQUÍMICA<sup>2</sup>

#### Material.

Cámara húmeda.  
Sanitas.  
Piceta.  
Timer.  
Plumón PAP PEN.  
Micropipetas.  
Puntas para micropipetas.  
Cubreobjetos.  
Cetona al 100%; -20°C.  
PBS1X. pH 7.2- 7.4.  
BSA 2%/PBS1X y 0.5%/PBS1X.  
Anticuerpos primarios.  
Anticuerpo secundario  
Peroxido.  
Diaminobenzidina (DAB).  
Estreptavidina-HRP.

#### Procedimiento.

1. Atemperar las laminillas de -70°C a -20°C, durante 20min.
2. Fijar en acetona al 100% fría (-20°C), por 20min a T.A. <sup>a</sup>
3. Secar a T. A. por 1min.
4. Hacer un círculo alrededor de cada corte con el plumón PAP PEN.
5. Hacer una cámara húmeda utilizando una caja petri, sanitas y agua bidestilada de piceta. <sup>b</sup>
6. Colocar en el interior de la cámara húmeda las laminillas.
7. Realizar tres lavados, agregando 200µl de PBS1X por corte, cada lavado deberá tener una duración de 5min, T. A.
8. Agregar 150µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0.3%/PBS1X por corte, se cubre la cámara con papel aluminio y se incuba durante 10min a T. A. <sup>c</sup>
9. Repetir el paso siete.
10. Bloquear con BSA 2%/PBS1X, agregando 200µl a cada corte, incubando por 1h a T. A. <sup>d</sup>
11. Retirar la BSA 2%/PBS1X, con ayuda de la micropipeta.
12. Colocar 50µl de los anticuerpos primarios, preparados en BSA 0.5%/PBS1X e incubar durante a 4°C, toda la noche.
13. Retirar los anticuerpos y repetir el paso siete.
14. Agregar 50µl del anticuerpo secundario biotinilado preparados en BSA 0.5%/PBS1X, incubar por 1h a T. A.
15. Repetir el paso siete nuevamente.
16. Incubar con 100µl del conjugado estreptavidina- HRP por 1h a T. A. en una dilución 1:300. <sup>e</sup>
17. Realizar tres lavados con PBS1X (paso siete).
18. Agregar 200µl del sustrato DAB más 0.5µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%), incubar por 10min, cubriendo la cámara con papel aluminio. <sup>f</sup>
19. Lavar con abundante agua bidestilada, ayudándose de una piceta. <sup>g</sup>
20. Contrateñir con Hematoxilina (Ver la técnica de contratinción).
21. Montar en resina Permount.

#### Notas.

- a. Este fijador tiene la función de preservar antígenos proteicos como es el caso de CD4 y CD8.
- b. Revisar la técnica de inmunofluorescencia.
- c. Este paso permite bloquear la peroxidada endógena.
- d. El bloquear con BSA evita las uniones inespecíficas del anticuerpo.
- e. La dilución 1:300 se debe realizar con PBS1X.

---

<sup>2</sup>van der Loos, 2007.



f. Para manejar la DAB se deben tener varios cuidados, como usar guantes, bata y cubrebocas, así como el adecuado lavado de los utensilios usados para su medición, debido a que es potencialmente cancerígena.

g. Se recomienda que el chorro de agua no vaya directamente a los tejidos sino que este sea de manera indirecta, evitando el desprendimiento de los cortes.

### CONTRATINCION<sup>2</sup>

Material.

Cajas de tinción.

Pinzas.

Sanitas.

Timer.

Cubreobjetos.

Hematoxilina de Harris.

Alcohol ácido recién preparado (Ver anexo VI).

Agua bidestilada.

EtOH 70%, 80%, 96%, 100%.

Xilol.

Pipeta Pasteur de vidrio.

Resina para montar Permout.

Procedimiento.

1. Una vez que las laminillas han pasado por Inmunohistoquímica deberán ser contrateñidas.
2. Colocar todos los reactivos en las cajas de tinción.
3. Transferir las laminillas a una caja de tinción con hematoxilina, durante 4min. <sup>a</sup>
4. Transferir las laminillas al alcohol ácido y sumergir tres veces.
5. Lavar las laminillas en agua bidestilada.
6. Transferir las laminillas al EtOH 70%, por 2min.
7. Transferir las laminillas al EtOH 80%, por 2min.
8. Transferir las laminillas al EtOH 96%, por 2min.
9. Transferir las laminillas al EtOH 100%, por 2min.
10. Transferir las laminillas a una caja con xilol (1), durante 5 min. <sup>b</sup>
11. Transferir nuevamente las laminillas a una caja con xilol (2), durante 5 min.
12. Colocar una laminilla en una caja petri la cual debe contener xilol nuevo, mover de manera que cubra perfectamente el tejido.
13. Tomar la laminilla escurrir el exceso de xilol.
14. Secar la laminilla por la parte de atrás con una sanita.
15. Montar la laminillas con resina Permout. <sup>c</sup>
16. Dejar secar a temperatura ambiente, por 24h.

Notas.

b. Al agregar la hematoxilina en la caja colocar la tapa inmediatamente debido a que este reactivo se oxida con facilidad. Se recomienda que de manera frecuente se filtre para evitar que la nata causada por oxidación cree artefactos en la tinción.

c. Las laminillas deben ser colocadas con ayuda de unas pinzas en la caja de preferencia dirigidas en una dirección. Se debe tener mucho cuidado con los tiempos de tinción.

d. Se recomienda que el xilol se maneje en el interior de una campana de extracción.

e. Para montar una por una las laminillas ésta se debe tomar de forma horizontal entre los dedos pulgar y anular, con ayuda de una pipeta Pasteur colocar una línea horizontal en la parte superior a los cortes con resina. Tomar el cubreobjetos y cubrir los tejidos muy despacio de manera que no se formen burbujas.

---

<sup>2</sup>van der Loos, 2007.

### LAVADOS INTESTINALES

#### Material.

Pinzas, tijeras.  
Base para disección.  
Gradillas  
Sanitas.  
Jeringa de 3ml.  
Jeringas de 1ml (lavado intestinal).  
Éter  
Caja petri.  
Tubos eppendorf de 1.5ml (etiquetados).  
PBS1X (pH 7.2- 7.4) más inhibidores de proteasas (Ver Anexo VI).  
Canulas 1.20 x38 mm. ( las necesarias).  
Guantes gruesos o doble guante.

#### Procedimiento.

1. Anestesiar al ratón con Éter hasta que casi muera.
2. Obtener toda la sangre posible por punción cardiaca usando la jeringa de 3ml y colocarla en un tubo eppendorf de 1.5ml. <sup>a</sup>
3. Si el ratón aun no ha muerto, sacrificarlo por dislocación cervical.
4. Bañarlo en alcohol al 70%.
5. Llevar al cadáver al interior de un ambiente estéril y colocarlo sobre la base de disección en forma ventral, de forma que quede bien asegurado. <sup>b</sup>
6. Realizar un corte en la base del abdomen, separar la piel del ratón dejando libre la cavidad peritoneal para retirar el peritoneo.
7. Extraer 3cm de cada una de las tres secciones del intestino delgado que son: Duodeno, Yeyuno e Íleon. <sup>c</sup>
8. Colocarlas en una caja petri la cual debe contener 5ml PBS1X más inhibidores de proteasas, para llevar acabo la recolección de lavados intestinales. <sup>d</sup>
9. Colocar la cánula en la jeringa y tomar 500µl de la solución de PBS1X más inhibidores de proteasas.
10. Con ayuda de unas pinzas tomar un extremo de la sección de intestino e introducir de manera delicada la cánula con la jeringa al interior de la luz intestinal, entonces hacer pasar la solución y recolectarla en un tubo eppendorf debidamente etiquetado.
11. Los lavados intestinales deben ser centrifugados a 2500 rpm a 4°C por 10min. Desechar el pellet, recolectar el sobrenadante y almacenar a -20°C por meses para su posterior uso

#### Notas.

- a. Se recomienda que la punción cardiaca sea de manera rápida antes de que el ratón muera, lo que permite la mayor extracción de sangre y por tanto la obtención de órganos limpios de fluidos corporales.
- b. La disección de los ratones se deben realizar en una campana de flujo laminar para evitar la contaminación de la muestra, así como para la seguridad del científico.
- c. Ubicar el intestino delgado, tomar con pinzas este y con sumo cuidado sacarlo de la cavidad de tal manera que se facilite la ubicación de las secciones, para cortar el segmento correspondiente al Duodeno ubicar la parte próxima del intestino al estomago y a partir de esta unión cortar aproximadamente 2cm. Para el caso del Yeyuno, seccionar la parte media y para ubicar al Íleon cortar en la parte anterior al ciego.
- d. Se recomienda que el número de manipulaciones al tejido sea el menor, para evitar causar daño a las muestras; especialmente intestino delgado.

### ELISA<sup>3</sup>

#### Material.

Placas EIA/RIA (Costar 3590).  
Sanitas.  
Recipiente con tapa.  
Micropipetas.  
Puntas para micropipetas.  
Canales.  
Incubadora a 37°C.  
Buffer de carbonatos 0.1M, pH 9.6.  
Tween 20 0.05%/PBS1X.  
BSA 1%/PBS1X.  
Anticuerpo anti-IgA acoplado a peroxidasa.  
Agua bidestilada.  
Buffer citrato- fosfato  
Peroxido de hidrogeno al 30%.  
O-fenilenediamina.  
Ácido sulfúrico 2.5N.  
Lector de ELISA.

#### Procedimiento.

1. Realizar una cámara húmeda, usando un recipiente en el cual se deberá colocar una sanita de forma que cubra la superficie inferior de éste, después la sanita debe ser rociada con agua bidestilada para mantener la humedad.
2. Sensibilizar placas (RIA/IEA costar 3590) con 100 µl/ pozo de antígeno (50µg/ ml) en buffer carbonato pH 9.6. incubar 2h a 37°C en la cámara húmeda.
3. Realizar tres lavados con Tween 20/PBS1X colocando 200µl por pozo con una duración de 5min cada lavado.
4. Bloquear por 2h a 37°C con BSA1%/PBS1X, colocando 200 µl por pozo.
5. Agregar 50 µl de lavado intestinal diluido 1:20 en Tween 20/PBS1X, incubar a 4°C toda la noche.
6. Repetir el paso tres.
7. Incubar con el anticuerpo acoplado a peroxidasa anti- IgA, agregando 50µl en una dilución 1:2000, por 2h a 37°C.
8. Llevar a cabo nuevamente el paso tres.
9. Preparar la mezcla de revelado agregando los siguientes reactivos: buffer citrato-fosfato; agua bidestilada; Orto- fenilendiamina, y peroxido de hidrogeno. <sup>a</sup>
10. Agregar 100 µl/pozo de la mezcla de revelado.
11. Incubar a T. A. durante 3 min, observando que la coloración de la reacción, cuidando que los controles permanezcan sin color. <sup>b</sup>
12. Parar la reacción colocando 50 µl/pozo de de ácido sulfúrico 2.5N.
13. La absorbancia debe ser leída a 490 nm.

#### Notas.

- a. Mezcla de revelado para 5ml.
- b. Los controles son muestra de controles sin infectar.

|                            |        |
|----------------------------|--------|
| Buffer de citrato-fosfato. | 2.5ml. |
| Agua bidestilada.          | 2.5ml. |
| Orto- fenilendiamina.      | 2mg.   |
| Peroxido de hidrogeno.     | 2µl    |

<sup>3</sup>Sanchez et al., 2001.

**PBS MÁS INHIBIDORES DE PROTEASAS<sup>4</sup>**

|                   | Concentración stock. | Estabilidad.    | µl agregados/ 5ml de amortiguador. | Concentración final.    |
|-------------------|----------------------|-----------------|------------------------------------|-------------------------|
| <b>EDTA.</b>      | 0.5M                 | Meses 4°C.      | 125                                | 0.012M                  |
| <b>PMFS</b>       | 200mM                | 9 meses 4°C.    | 25                                 | 1mM                     |
| <b>Leupeptin.</b> | 10mM                 | 1 meses - 20°C. | 50                                 | 0.1mM                   |
| <b>Pepstatin.</b> | 1mM                  | Meses -20°C.    | 5                                  | 1x 10 <sup>-3</sup> mM. |

PMFS (Sigma Cat. P- 7626) se disuelven 34.84mg en 1mL. de metanol.  
 Leupeptin (Sigma Cat. L-2884) se disuelven 1mg en 235µl de agua milli Q.  
 Pepstatin (Sigma Cat. P-5318) se disuelven 1mg en 1.47ml de metanol.  
 EDTA se emplea la solución 0.5M de Sigma Cat. E-7889.

**PARAFORMALDEHIDO**

Para preparar 25mL.

Pesar 1g de p- formaldehído.  
 20mL de PBS 1X.

Procedimiento.

Disolver el p- formaldehído en 20mL de PBS calentando a 65 – 70° c (límite) con agitación constante, una vez que la solución se vea clara pero aun con partículas se debe ir agregando gota a gota NaOH hasta que quede totalmente disuelto el soluto (procurar tener NaOH 5M). Una vez disuelto el paraformaldehído dejar enfriar, ajustar el pH 7.4 y aforar a 25mL y guardar en alícuotas de 30 y 10mL y congelarlas.

Nota: disolver dentro de campana de extracción, usar bata y cubre boca.

Para preparar 200mL.

Pesar 8g de p- formaldehído.  
 150mL de PBS 1X.

Nota: recuerda aforar a 200mL.

**PBS 10X**

Pesar:  
 80g NaCl.  
 2g KCl.  
 14.4g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.  
 2.4g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.

Procedimiento.

Disolver todos los ingredientes en 800ml de agua bidestilada en agitación constante hasta disolver totalmente, una vez hecho esto ajustar el pH 7.2-7.4, aforar a 1L y esterilizar.

**PBS1X**

Disolver 100mL de PBS 10X en 900mL de agua bidestilada ajustar el pH 7.2-7.4 esterilizar.

<sup>4</sup>Martinez, 2004.

**BSA 2% en PBS 1X**

Disolver 2g de BSA en 100mL de PBS 1X y ajustar el pH 7.2-7.4 y esterilizar por filtración.

Nota: separar en dos alícuotas de 50mL e y tomando de una solo la cantidad que se va usar en el momento para esto usar la campana de flujo laminar, mantener las alícuotas en refrigeración.

**EOSINA**

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

Caducidad de la eosina cuando la tensión sea demasiado clara.

**ALCOHOL ÁCIDO**

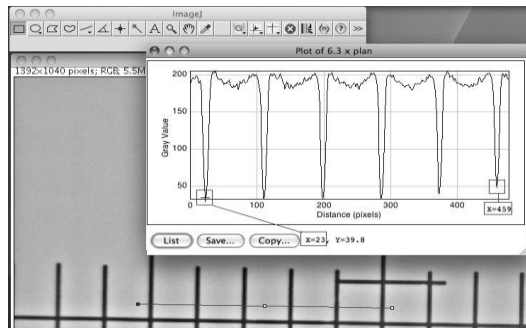
Prepara en el momento de uso. Disolver 5mL de HCl concentrado en 1l de EtOH 70%. (0.5mL de HCl 70%).

### SOFTWARE IMAGE J

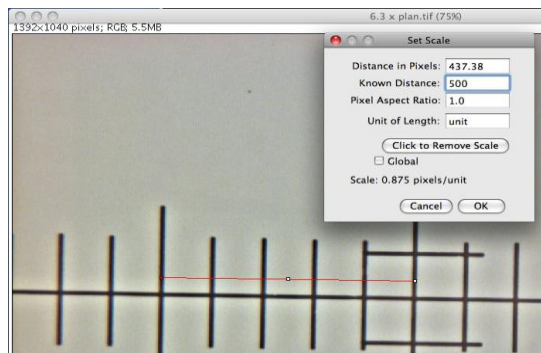
Image J es un programa de procesamiento de imágenes, fue creado por National Institute of Mental Health (NIMH) totalmente gratis en la red.

Para llevar a cabo el análisis de imágenes, particularmente la evaluación de células marcadas por Inmunohistoquímica se deben seguir los siguientes pasos:

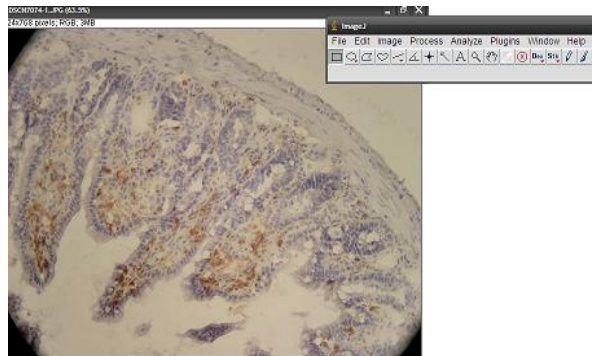
1. Descarga el Image J de la pag <http://rsb.info.nih.gov/ij/index.html>.
2. Descargar el plugin adicional *color deconvolution* en la pagina [http://www.fmhs.auckland.ac.nz/sms/biru/facilities/analysis\\_resources.aspx](http://www.fmhs.auckland.ac.nz/sms/biru/facilities/analysis_resources.aspx)
3. Una vez que se cuenta con el programa se comienza a analizar la imagen.
4. El programa en un principio te muestra los resultados pertenecientes al área en pixeles; sin embargo, tienes la opción de mostrar el área en unidades de micrómetros, lo cual es explicado en el siguiente apartado.
5. Calibración de los objetivos.
6. Este método es muy simple y sirve para calibrar las imágenes tomadas de un microscopio acoplado a una cámara. Requiere la toma de una foto de la reglilla de calibración para cada aumento utilizado. En la siguiente imagen se muestra una imagen tomada con un aumento x, el espacio entre cada barra corresponde a una distancia conocida de 100  $\mu\text{m}$ . para medir en pixeles, selecciona la herramienta de línea, y dibuja una línea en paralelo a la escala de las x, selecciona la función de "Analyse/Plot Profile". Coloca el cursor a nivel del primer pico y anota el valor de x. la diferencia en el ejemplo es de 436 pixeles que corresponden a 500  $\mu\text{m}$ . (0.872 pixel/ $\mu\text{m}$ ).



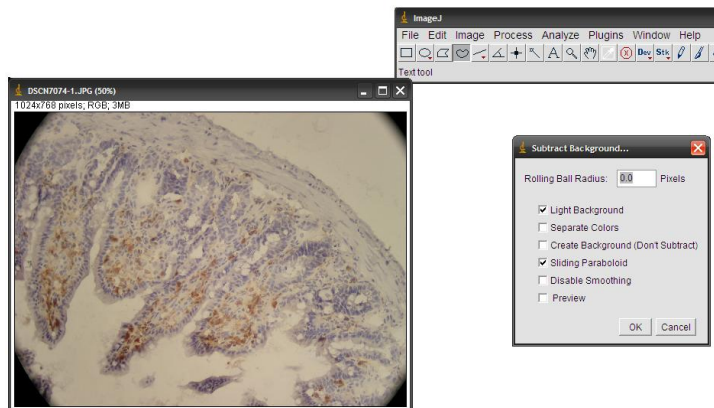
7. También puedes calibrar tu barra, seleccionando la función de *analyze- set scale*, apareciendo un recuadro en donde se te da los valores en pixeles, deberás colocar el valor en micras, así como las unidades, asegúrate de marcar global.



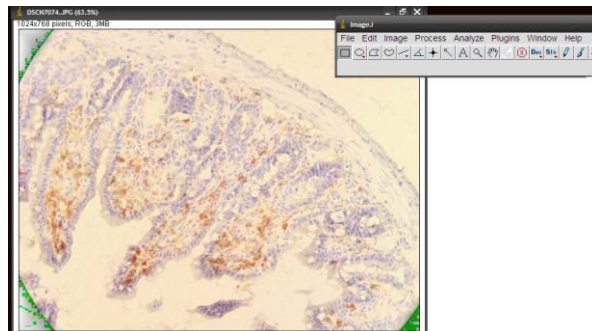
8. Después de calibrar en micrómetros se procede a analizar la imagen. Abriendo *file – open*, buscando el archivo correspondiente a la imagen.



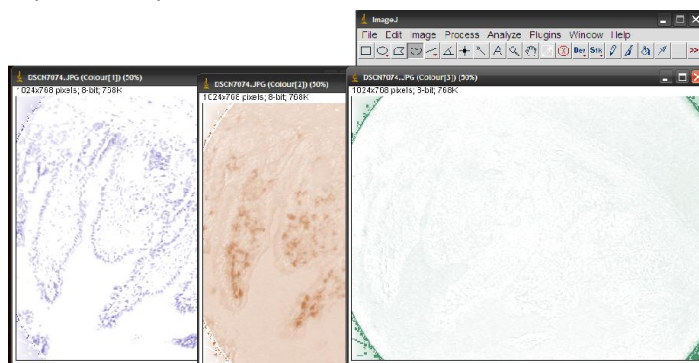
9. Usa *Process – Subtract Background*, si es necesario corregir sombras o algunos efectos de color.



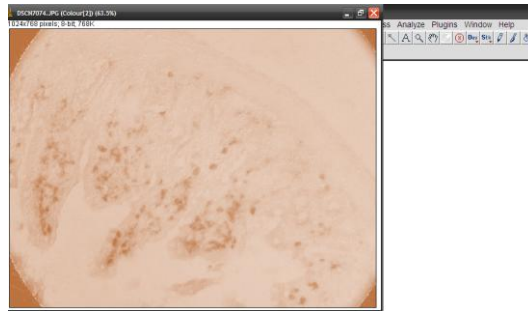
10. Dando como resultado una imagen con un mayor contraste en los colores.



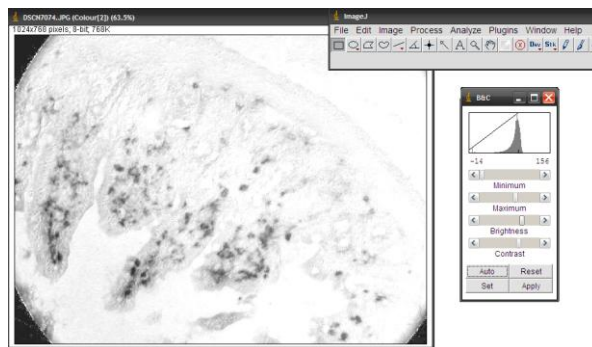
11. Una vez desplegada la imagen se procede a utilizar el plugin *color deconvolution*, el cual analiza imágenes compuestas de varias combinaciones de pigmentos tal sea el caso de tinciones hematoxilina/ Eosina o Hematoxilina/ DAB, separando la imagen en los pigmentos que la componen.



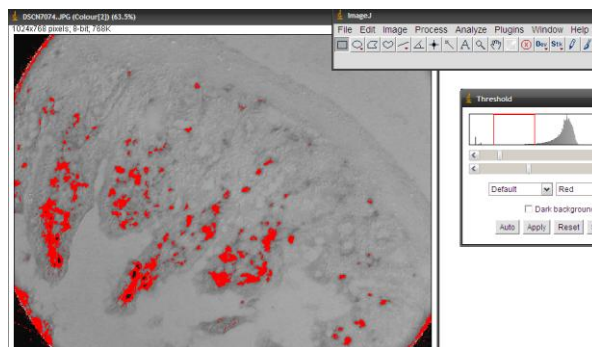
12. Seguido de la utilización del *color deconvolution*, selecciona la imagen que necesitas para tu análisis.



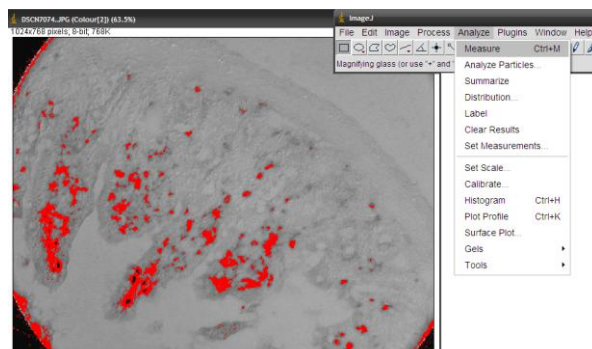
13. Posteriormente debes cambiar la imagen a binaria o escala de grises (8 bit) y ajustar el brillo y contraste.



14. Después para analizar el área de interés debes aplicar el *threshold* esta herramienta te permite señalar las marcas de tu interés.



15. Teniendo la marca señalada se podrá proceder a realizar el análisis del área teñida en la imagen, para lo cual deberás desplegar *analyze* y selecciona *measure*.





16. Dando como resultado el área correspondiente a la marca.

