



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
BIOLOGIA EXPERIMENTAL

PERFIL DE CITOCINAS EN INDIVIDUOS INFECTADOS CON
Trypanosoma cruzi

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

MARIANA CITLALLI DE ALBA ALVARADO

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: M en C. MARTHA IRENE BUCIO TORRES
FACULTAD DE MEDICINA

COMITÉ TUTOR: DR. JOAQUIN ALEJANDRO ZUÑIGA RAMOS
INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS
DRA. MARIA GLORIA SOLDEVILA MELGAREJO
INSTITUTO DE CIENCIAS BIOMEDICAS

MÉXICO, D.F. MAYO DE 2014



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
BIOLOGIA EXPERIMENTAL

PERFIL DE CITOCINAS EN INDIVIDUOS INFECTADOS CON
Trypanosoma cruzi

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

MARIANA CITLALLI DE ALBA ALVARADO

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: M en C. MARTHA IRENE BUCIO TORRES
FACULTAD DE MEDICINA

COMITÉ TUTOR: DR. JOAQUIN ALEJANDRO ZUÑIGA RAMOS
INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS
DRA. MARIA GLORIA SOLDEVILA MELGAREJO
INSTITUTO DE CIENCIAS BIOMEDICAS

MÉXICO, D.F. MAYO DE 2014

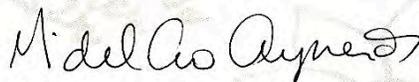
Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 14 de octubre de 2013, aprobó el jurado para la presentación de su examen para obtener el grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** de la alumna **DE ALBA ALVARADO MARIANA CITLALLI** con número de cuenta **302096190**, con la tesis titulada "**PERFIL DE CITOCINAS EN INDIVIDUOS INFECTADOS CON *Trypanosoma cruzi***", realizada bajo la dirección de la **M. en C. MARTHA IRENE BUCIO TORRES**:

Presidente: DRA. PAZ MARÍA SILVIA SALAZAR SCHETTINO
Vocal: DR. EDGAR ARTURO ZENTENO GALINDO
Secretario: DRA. MARÍA GLORIA SOLDEVILA MELGAREJO
Suplente: DR. ALEJANDRO ALAGÓN CANO
Suplente: DR. JOAQUÍN ALEJANDRO ZÚÑIGA RAMOS

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 08 de abril de 2014



DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA

AGRADECIMIENTOS

a) Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

b) Al programa de becas del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por el apoyo económico recibido con número de CVU/Becario: 41 3122, así como apoyo a Proyectos de Investigación DGAPA/PAPIIT de los proyectos IT-200913 e IN-211613.

Al comité tutorial:

A la M. en C. Martha Irene Bucio Torres por su dirección en esta tesis, apoyo incondicional, por su afanosa dedicación para mi formación como científica, así mismo dedicación al desarrollo de esta tesis, invaluable críticas, recomendaciones y valiosas recomendaciones durante transcurso del proyecto.

Al Dr. Joaquín Alejandro Zúñiga Ramos por su apoyo en la realización de experimental del análisis de citocinas y sus recomendaciones y aportaciones a la tesis.

A la Dra. María Gloria Soldevila Melgarejo por contribución en la crítica y recomendaciones de esta tesis.

AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

A la Dra. Paz María Salazar Schettino por su apoyo todo los aspectos relacionados con la clínica de la enfermedad de Chagas, valiosas recomendaciones y aportaciones a este trabajo en la revisión de tesis

A la Dra. Margarita Cabrera Bravo, por su apoyo en el análisis de los casos clínicos de los pacientes estudiados.

Al Dr. Edgar Zenteno Galindo por su apoyo incondicional en el desarrollo de este proyecto, la crítica del proyecto, revisión y generación de propuestas para este.

A la M. en C. Elia Torres Gutiérrez por su apoyo en la realización de diversas técnicas de Western Blot.

Al Dr. Luis Armando Jiménez Álvarez por su apoyo en la realización de la técnica Bioplex Multiplex y orientación en el análisis estadístico de los datos mencionados.

A la Dra. Clara Vázquez Antona y Dr. Carlos Zamora del Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez" por los estudios clínico cardiológico de los pacientes.

Al Dr. Ricardo Lascurain Ledesma por sus iniciales sugerencias en este proyecto.

A la M.en C. Yolanda Guevara por el mantenimiento de los aislados

Al personal de laboratorio de Biología de Parásitos

DEDICATORIA

A mis Padres Lidia Alvarado Meléndez y Aurelio de Alba Ceballos, que me inculcaron el amor por el estudio.

A mis hermanos, referentes para todo en mi vida.

A mis sobrinos que pueda ser un ejemplo importante en su vida.

A mi familia De Alba porque todos tenemos mucho de eso... gracias a todos y gracias Alis por todos tus consejos.

A los Alvarado por ser parte de mi carácter.

A mis amigos y los que faltan gracias por acompañarme en mi vida para siempre: Mary Carmen, Alfa Santoyo Ricardo, Erika Hagman, Duya, Irving, Dave, Asdru, Aarón, Wont, Víctor, Rodrigo.

Iván gracias por acompañarme en esta travesía.

A todo mis ex roommates.

A todos mis compas del Lab.

A todos mis compas de la Fac de Ciencias.

A los Simpson ser una referencia en mi vida.

A Pink Floyd, Tool, Depeche mode, Yo la tengo... Ya que la música es un referente para la vida.

“The sun is the same in a relative way”

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
BIOLOGÍA Y CICLO BIOLÓGICO DE <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i>	5
MECANISMOS DE TRANSMISIÓN Y DE INFECCIÓN	9
VECTORES	9
CUADRO CLÍNICO	10
DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS	12
CITOCINAS	13
INMUNIDAD CONTRA <i>T. CRUZI</i>	16
INMUNOPATOGENIA DE LA CARDIOPATÍA EN LA ENFERMEDAD DE CHAGAS	17
TRATAMIENTO ANTIPARASITARIO DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS	18
CITOCINAS EN LA ENFERMEDAD DE CHAGAS	19
JUSTIFICACIÓN	22
HIPÓTESIS	24
OBJETIVOS	24
METODOLOGÍA	25
GRUPOS DE ESTUDIO	25
ELISA INDIRECTA PARA LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS ANTI- <i>T. CRUZI</i>	26
ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE)	27
ELECTROINMUNOTRANSFERENCIA (WESTERN-BLOT)	27
DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE CITOCINAS EN SUERO POR BIOPLEX	28
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	29
RESULTADOS	30
POBLACIÓN ESTUDIADA	30
DISTRIBUCION POR SEXO DE LOS GRUPOS	34
ELECTROINMUNOTRANSFERENCIA DE LOS CASOS ESTUDIADOS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS INMUNODOMINANTES.	34
CONCENTRACIONES DE CITOCINAS EN INDIVIDUOS INFECTADOS CON <i>T. CRUZI</i>	35
COMPARACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE CITOCINAS ENTRE GRUPOS	37
EFFECTO DEL TRATAMIENTO EN ESPECÍFICO ANTI-PARASITARIO EN LAS CONCENTRACIONES DE CITOCINAS	40
ANÁLISIS COMPARATIVO DE CITOCINAS ESTADISTICOS ENTRE GRUPOS	43
ANÁLISIS COMPARATIVO DE CITOCINAS ENTRE PACIENTES TRATADOS Y NO TRATADOS	44
DISCUSIÓN	46
CONCLUSIONES	53
REFERENCIAS	55
ANEXOS	63-74

RESUMEN

La capacidad de los pacientes para enfrentar la infección por *T. cruzi* depende del equilibrio entre la respuesta inmune inflamatoria y anti-inflamatoria, por lo que el estudio de las citocinas puede ayudar a comprender los mecanismos que desencadenan las fases clínicas de la enfermedad y la respuesta al tratamiento. En este estudio se determinó la concentración de citocinas en individuos mexicanos menores de edad infectados con *T. cruzi* cursando las fases asintomática y crónica, antes y después de la terapia antiparasitaria específica. Los objetivos de este estudio fueron determinar el perfil de las citocinas pro-inflamatorias (IL-1 β , IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-6, IL-17, quimiocinas IL-8, MIP-1 α) y anti-inflamatorias (IL-1RA, IL-4, IL-10, IL-13 y TGF- β), y analizar si se encuentran diferencias en los niveles de citocinas tanto entre los diferentes grupos de pacientes como antes y después del tratamiento. Los individuos se clasificaron de acuerdo con estudios clínico-cardiológicos, como electrocardiográfico y ecocardiográfico. El Grupo 1 incluyó 13 individuos en fase crónica asintomática, con trazo electrocardiográfico normal y ecocardiograma normal. El Grupo 2 constaba de 9 casos en fase crónica asintomática incipiente, con alteraciones en el trazo electrocardiográfico BIRDHH (Bloqueo Incompleto de la Rama Derecha de Haz de His) y ecocardiograma con lesiones incipientes. El Grupo 3 incluyó 11 individuos en fase crónica sintomática con lesiones severas, con ecocardiograma con BIRDHH o BRDHH (Bloqueo de Rama Derecha de Haz de His) y con ecocardiograma con lesiones francas. Los individuos con las manifestaciones crónicas tanto incipientes como severas en su mayoría fueron del sexo masculino (67% y 64% dentro de los grupos sintomáticos 2 y 3, respectivamente). En la comparación entre pacientes infectados y no infectados, se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.001$) en todas las citocinas. En la comparación de las concentraciones entre grupos clínicos, se encontró diferencia estadística entre medianas de las concentraciones de IFN- γ ($P=0.0354$), TNF- α ($P=0.0400$), IL-1 β ($P=0.0352$), IL-6, ($P=0.0113$), IL-2 ($P=0.0317$), IL-1RA ($P=0.0340$) e IL-10 ($P=0.0354$) con incremento hasta del 383.78% entre los grupos 2 y 3. La comparación de los niveles de citocinas entre pacientes tratados y no tratados mostró disminución hasta del 58.63%, con diferencia estadística en IFN- γ ($P=0.002$), TNF- α ($P=0.023$), IL-15 ($P=0.0423$), IL-4, ($P=0.001$), IL-10 ($P=0.0276$). No se encontraron diferencias en la concentración de TGF- β al analizarlo por grupos o después del tratamiento. Se concluye que los pacientes infectados por *T. cruzi* tienen una alta concentración de citocinas tanto pro como anti-inflamatorias, que no existe en el grupo control; que la fase crónica asintomática se correlaciona con niveles altos de citocinas profibróticas e inflamatorias (IFN- γ , TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-2) y reguladoras de la inflamación (IL-1RA e IL-10), que se correlacionan con los trastornos de conducción y fibrosis cardíaca que genera trastornos en la motilidad cardíaca, y que los pacientes tratados presentan disminución de IFN- γ , TNF- α , IL-15, IL-4 e IL-10, por lo que estas citocinas pueden ser marcadores para determinar eficacia o falla medicamentosa en la terapia antiparasitaria.

ABSTRACT

The ability of patients to respond to the *T. cruzi* infection depends on the balance between the immune response and inflammatory anti-inflammatory, so the study of cytokines may help to understand the mechanisms that trigger the clinical stages of the disease and the response to treatment. In this study the concentration of cytokines was determined in Mexican individuals under age infected with *T. cruzi*, and enrolled in the asymptomatic and chronic phases, before and after the specified antiparasitic therapy. The objectives of this study were determine the profile of pro-inflammatory cytokines (IL-1 β , IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-6, IL-17, chemokines IL-8, MIP-1 α) and anti-inflammatory (IL1-RA, IL-4, IL-10, IL-13 and TGF- β), and analyze the differences between the groups of patients before and after treatment in cytokine levels. Individuals were classified according to clinical-cardiologic, electrocardiographic and echocardiographic studies. Group 1 included by 13 individuals in chronic asymptomatic phase, normal ECG tracing and normal echocardiogram. Group 2 consisted of 9 cases incipient symptomatic chronic phase, with alterations in the ECG tracing IRBBB (Incomplete Right Bundle Branch Block) and echocardiography with early lesions. Group 3 included 11 patients with severe symptomatic chronic phase lesions with electrocardiogram IRBBB or RBBB (Right Bundle Branch Block) and echocardiography severe injuries. Individuals with chronic and severe manifestations emerging as the majority were male (67% and 64% in symptomatic groups 2 and 3, respectively). In the comparison between infected and uninfected patients, statistically significant differences ($P < 0.001$) in all cytokines were found. In the comparison of concentrations between clinical groups, statistical difference was found between medians of the concentrations of IFN- γ ($P = 0.0354$), TNF- α ($P = 0.0400$), IL-1 β ($P = 0.0352$), IL-6, ($P = 0.0113$), IL-2 ($P = 0.0317$), IL1RA ($P = 0.0340$) and IL-10 ($P = 0.0354$) with 383.78% increase to the groups 2 and 3. Comparing levels of cytokines between treated and untreated patients showed a reduction of up to 58.63%, with statistical difference in IFN- γ ($P = 0.002$), TNF- α ($P = 0.023$), IL-15 ($P = 0.0423$), IL-4, ($P = 0.001$), IL-10 ($P = 0.0276$). No differences in the concentration of TGF- β to analyze it or after the treatment groups were found. We conclude that *T. cruzi*-infected patients have a high concentration of cytokines both pro and anti-inflammatory, which does not exist in the control group; symptomatic chronic phase that is correlated with high levels of fibrotic regulatory and inflammatory cytokines (IFN- γ , TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-2) and inflammation (IL1RA and IL-10), that correlate with cardiac conduction disturbances and fibrosis which leads to the disruption cardiac motility and treated patients have decreased IFN- γ , TNF- α , IL-15, IL-4 and IL-10, these cytokines may be markers for determining drug efficacy or failure antiparasitic therapy.

INTRODUCCIÓN

Trypanosoma cruzi es el agente etiológico de la enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis Americana; este parásito se transmite de forma natural por insectos hematófagos llamados triatominos; es una zoonosis compleja, ya que en ella se llevan a cabo infecciones que involucran la interacción entre especies de transmisores y mamíferos silvestres, peridomésticos y domésticos con gran diversidad de formas de transmisión y cuadros clínicos en el humano (1).

Desde 1909, fecha en que el Dr. Carlos Chagas, describe en Minas Gerais, Brasil, la enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana, después de aislar a *Trypanosoma cruzi* del vector (*Panstrongylus megistus*) y reproducir la infección en mamíferos de laboratorio, refiere importante para la diseminación del vector, las condiciones de pobreza y hacinamiento de las viviendas rurales, condiciones que prevalecen en Latinoamérica hasta nuestros días; al respecto, la Organización Mundial de la Salud (OMS) estima a nivel mundial, que esta enfermedad afecta de 7 a 8 millones de individuos, con el registro de 11 000 muertes en 2008 (2) y la Organización Panamericana de la Salud (OPS), refiere que en México existen aproximadamente 1 100 000 individuos infectados con 29 500 000 en riesgo de contraer la infección (3) y a partir de 2009, se incorpora dentro de las enfermedades tropicales desatendidas (2). En 2013, la OMS refiere que existe en 21 países de América Latina: Argentina, Belice, Bolivia, Venezuela, Brasil, Chile, Colombia, Costa Rica, Ecuador, El Salvador, Guyana Francesa, Guatemala, Guyana, Honduras, México, Nicaragua, Panamá, Paraguay, Perú, el Estado Plurinacional de Bolivia, Surinam y Uruguay (Fig. 1).

Las tasas de infección en Bancos de Sangre en el Continente Americano se encuentran entre el 3% y el 53% dependiendo del país y de la normatividad en el mismo (2). A pesar de que la enfermedad de Chagas es endémica en Latinoamérica, en los últimos años, se ha observado que países como Canadá, Estados Unidos de América, algunos de Europa e inclusive Japón y Australia, reportan cada vez más casos, que incluyen además otras vías de transmisión como son la transfusional por sangre o sus componentes, vertical de la madre al producto o por trasplantes de órganos y tejidos (2).

En México, el primer y único caso de transmisión por transfusión sanguínea fue reportado en 1989 (4). En el país, los estudios realizados en Bancos de Sangre continúan siendo escasos y muestran prevalencias entre 0.28 y 17% (1).

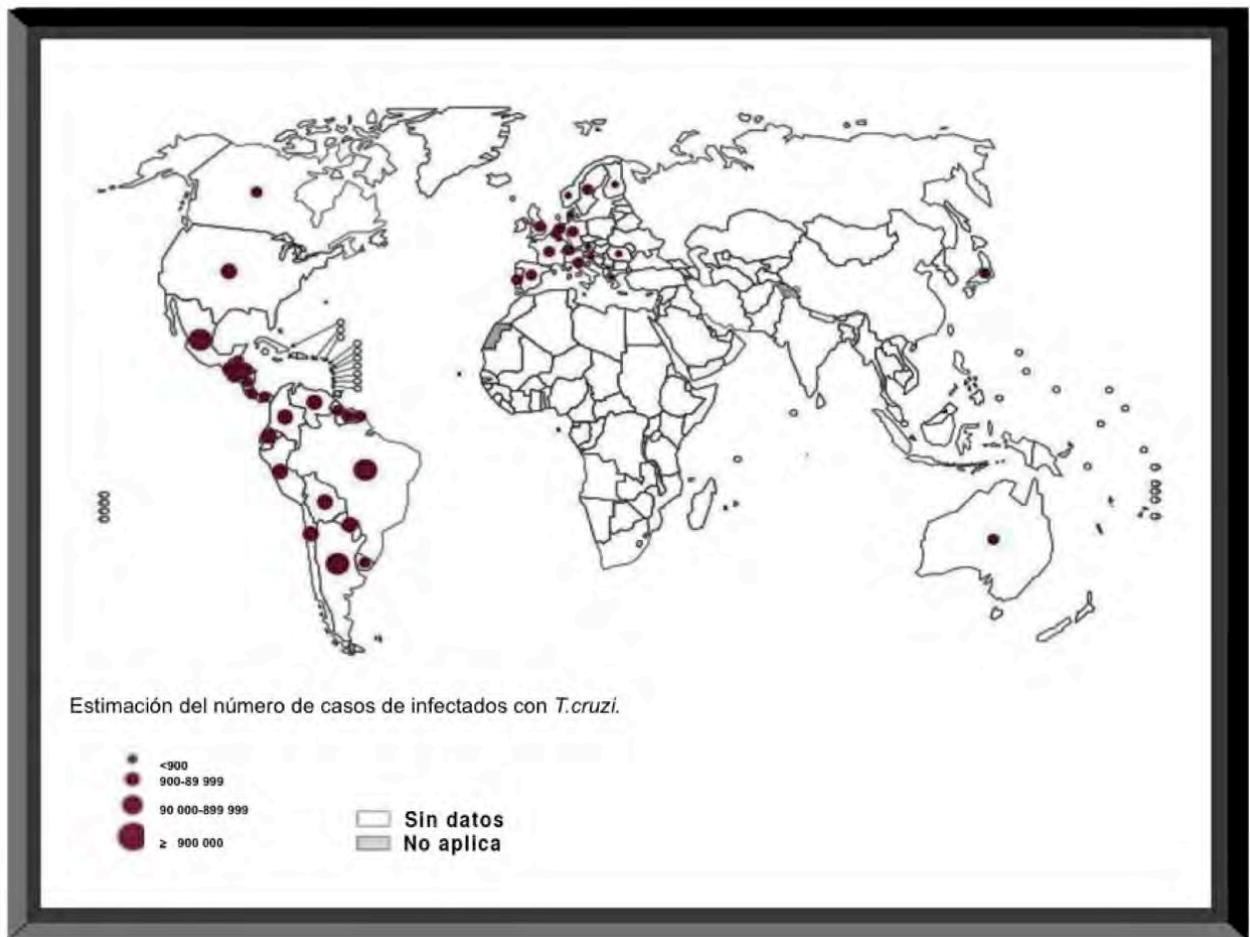


Figura 1- Distribución global de casos de enfermedad de Chagas, con base en las estimaciones oficiales 2006-2010 (5).

En 1940, Mazzotti reporta en México, los dos primeros casos humanos y los dos primeros vertebrados infectados con el parásito (6) y a partir de los 50's, Biagi, Tay en los 60's y Salazar en los 70's, realizan encuestas epidemiológicas en diversas regiones del país, con el informe de 2 miocarditis chagásicas *post-mortem* y en 1979, Salazar Schettino reporta el tercer caso de miocardiopatía chagásica comprobado parasitológicamente en un paciente vivo (7). En 1984 se reportó el primer caso de megaesófago y en 1986 el primero de megacolon (8, 9). A la fecha, se han incrementado los estudios en diversas regiones del país encaminados a identificar diversos aspectos de la enfermedad; en los estados de Veracruz, Oaxaca, Morelos, Yucatán, Guerrero y Jalisco se han realizado un número considerable de encuestas epidemiológicas con reportes de casos humanos.

BIOLOGÍA Y CICLO BIOLÓGICO DE *Trypanosoma cruzi*

T. cruzi es un microorganismo eucarionte, protista, flagelado, que se clasifica dentro de la familia Trypanosomatidae dentro del orden Kinetoplastida, presenta una sola mitocondria, con acumulación de DNA que forma una estructura denominada cinetoplasto y además, un flagelo único que recorre el cuerpo del parásito (10).

CLASIFICACION TAXONÓMICA DE *T. cruzi*.

REINO PROTISTA Levine, 1980 (11)
SUB REINO PROTOZOA
PHYLUM SARCOMASTIGOPHORA
SUB PHYLUM MASTIGOPHORA
ORDEN KINETOPLASTIDA
GENERO TRYPANOSOMA
ESPECIE -*T. cruzi* Chagas, 1909(12)

Este parásito se divide por fisión binaria longitudinal, es polimórfico y se describen 4 formas principales en su ciclo de vida, tripomastigote metacíclico, tripomastigote sanguíneo, epimastigote y amastigote.

El tripomastigote metacíclico, se encuentra en las heces del vector, tiene forma de "S" o "C" y mide de 18 a 21 μm de largo, con tinción de Giemsa, se aprecia un núcleo en la parte media del cuerpo del parásito y en la posterior, el cinetoplasto con el flagelo posterior al núcleo, presenta una membrana ondulante que recorre al parásito a lo largo junto con el flagelo; esta forma no es replicativa y es considerada infectante de manera natural. El tripomastigote sanguíneo, es morfológicamente similar al metacíclico y se encuentra en la sangre del vertebrado y puede ser infectante en los casos de transfusión de sangre o sus componentes.

El epimastigote se localiza en el intestino del transmisor y en los medios de cultivo convencionales; mide de 16 a 18 μm de largo, presenta forma de huso y al ser teñido, el cinetoplasto se observa anterior al núcleo en la parte media del parásito, el flagelo emerge del cinetoplasto con la membrana ondulante en la parte anterior, esta es la forma replicativa dentro del vector.

El **amastigote** se encuentra intracelular en los tejidos del huésped vertebrado, mide de 2 a 4 μm , presenta forma semiesférica, cuando es teñido con Giemsa, se observa el núcleo y a un lado del mismo, el cinetoplasto en forma de bastoncillo, esta es la forma replicativa en el huésped vertebrado Este parásito se divide por fisión binaria longitudinal, es polimórfico y se describen 4 formas principales en su ciclo de vida, tripomastigote metacíclico, tripomastigote sanguíneo, epimastigote y amastigote.

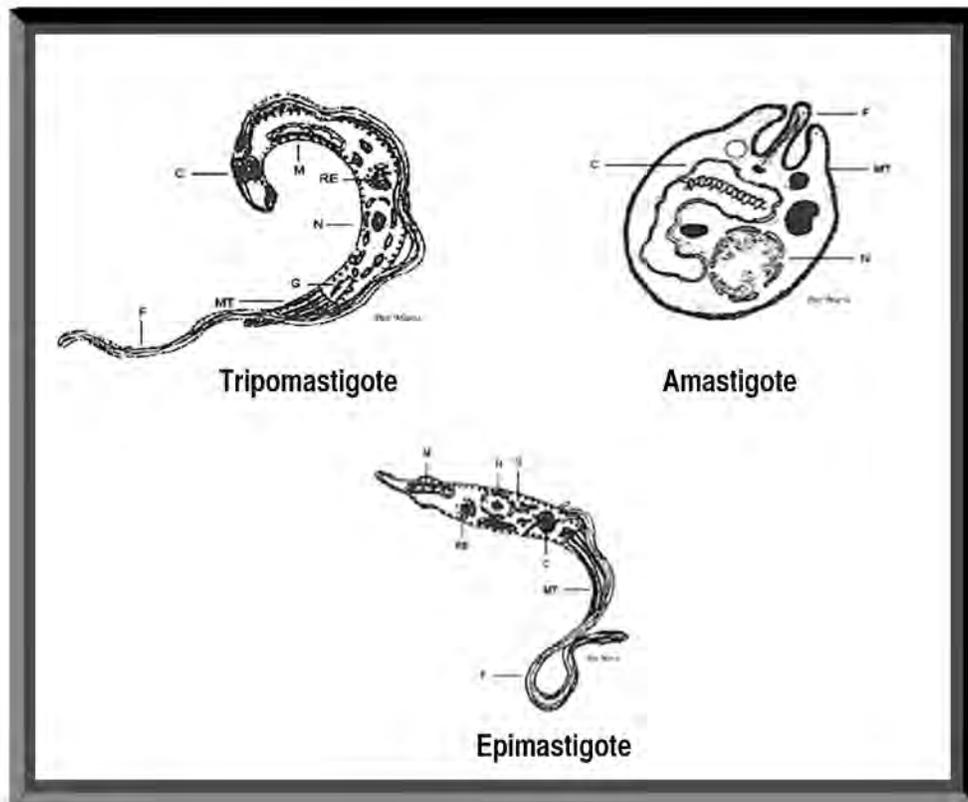


Figura 2- Morfología de *T. cruzi*.
 Cortesía: Dra. Paz María Salazar Schettino (Facultad de Medicina, UNAM)

T. cruzi presenta una estructura poblacional formada por cepas o clones con características biológicas variables. El genoma de, es diploide con un tamaño de 106,4-110,7 Mb caracterizado a partir de la cepa CL Brener, híbrido de I y II, organizado en 28 cromosomas diploides en casi todas las cepas de *T. cruzi*, codifica aproximadamente 12,000 genes, con gran número de genes repetidos en tándem (13). Actualmente *T. cruzi* se clasifica en seis unidades discretas de tipificación clasificadas como Tc I al Tc VI y un genotipo recientemente descrito, Tc bat, que infecta a murciélagos frugívoros (14, 15).

Clasificación Anterior					Nueva clasificación	
<i>T. cruzi</i> I	Ribodema II/III	Linaje 1	Zimodema 1	DTU I	Tc I	DTU I
<i>T. cruzi</i> II	Ribodema I	Linaje 2	Zimodema	DTU I b	Tc II	DTU II
				DTU I c	Tc III	DTU III
				DTU I a	Tc IV	DTU IV
				DTU I d	Tc V	DTU V
				DTU I e	Tc VI	DTU V

Tabla 1- Clasificaciones de *T. cruzi*. Zimodemos (16), DTU (14).

Respecto a la distribución geográfica de las unidades discretas de tipificación de *T. cruzi*, Tc I se ha encontrado desde Argentina hasta los Estados Unidos, mientras que Tc II al VI se encuentran distribuidas desde la Cuenca Amazónica hasta el sur de Argentina; sin embargo, es posible encontrar regiones donde todas las unidades discretas de tipificación están presentes, como es el caso de Colombia, en donde Tc I se ha reportado de forma predominante y en una baja proporción, a Tc II, Tc III, Tc IV y Tc VI (17).

Genotipo	Distribución	Asociación con la manifestación clínica
TcI	Sur, Centro y Norte América	Asociado a manifestaciones cardíacas, poco frecuente en megaesófago y megacolon
TcII	Transmisión doméstica, Cono Sur, poco en Norte América.	Asociado a manifestaciones cardíacas, megacolon y megaesófago.
TcIII	Sur América	Rara la infección en humanos. Se han descrito en algunos casos agudos en la Amazonia de Brasil.
TcIV	Norte y Sur de América	Descrito en infecciones en Venezuela y el norte de Sudamérica.
TcV	Cono Sur, Chaco y sur de Brasil	Fuertemente asociado a ciclos domésticos y particularmente en humanos. Presente en cardiopatas y en megaesófago y megacolon. Frecuente en casos congénitos en el Cono Sur.
TcVI	Cono Sur, Chaco.	Fuertemente asociado a ciclos domésticos. Asociado en pacientes cardiopatas. Alta prevalencia en perros en el Gran Chaco.

Tabla 2- Características de clasificación de DTU's para *T. cruzi*.

MECANISMOS DE TRANSMISIÓN Y DE INFECCIÓN

En el humano, la infección por *T. cruzi* es adquirida por varios mecanismos; el más importante es el natural, el cual se lleva a cabo por medio de un triatómino infectado; esta forma de transmisión es muy común en áreas rurales, donde las características de la vivienda y el ecotopo, facilitan la colonización de los insectos en el nicho doméstico. En las zonas urbanas, se presenta la segunda forma de transmisión, relacionada con la transfusión de sangre o sus componentes y que se origina por la migración de la población rural a las ciudades donde más del 70% de la población está compuesta por inmigrantes provenientes de zonas con alta prevalencia (20). Las tasas de infección en Bancos de Sangre de algunas ciudades del Continente Americano se encuentran entre el 3% y el 53%, dependiendo del país y de la normatividad en el mismo (2). La tercera vía de transmisión, es conocida como congénita o vertical y se presenta tanto en zonas rurales como urbanas; esta vía, involucra mujeres infectadas en edad reproductiva, que infectan a sus productos durante la gestación, nacimiento o lactancia y puede producir desde aborto hasta diversas fetopatías. Otros mecanismos de transmisión menos frecuentes, son los trasplantes de órganos y tejidos, accidentes de laboratorio y en los últimos años, la transmisión oral. La transmisión por trasplantes de órganos en hospitales se origina cuando un receptor no infectado recibe algún órgano de un donador infectado; esta infección puede exacerbarse debido a la inmunosupresión requerida para el trasplante. Los accidentes de laboratorio se han reportado tanto en países endémicos como no endémicos en personal involucrado con estas acciones. La transmisión oral, se produce por ingerir alimentos contaminados con el parásito.

VECTORES

Es un artrópodo hematófago que pertenece a la clase Insecta, orden Hemiptera, familia Reduviidae y a la subfamilia Triatominae (21). Su tamaño es variable, según la especie, pero en promedio miden de 1.5 a 3.5 cm, son de hábitos principalmente nocturnos, aun que *M. Pallidipennis* puede encontrarse en pleno día. En la República Mexicana han sido reportados 32 especies dentro de ocho géneros: *Belminus*, *Dipetalogaster*, *Eratyrus*, *Panstrongylus*, *Paratriatoma*, *Rhodnius*, *Meccus* y *Triatoma* (esta última con 19 especies) ampliamente distribuidas en el país (22). El transmisor es conocido en México con diversos nombres comunes según la región y destacan los siguientes: chinche besucona, chinche asesina, turicata, chinche trompada, chinche voladora, chupasangre, chinche con pistola, talaje, pick, entre otros (18).

Los triatominos son hemimetábolos y su ciclo de vida incluye los estadios de huevo, cinco ninfales y adultos hembra y macho; el tiempo que se requiere para llevar a cabo el ciclo de vida, es variable según la especie, humedad, temperatura y disponibilidad de alimento. Existen factores que contribuyen a la colonización, proliferación y mantenimiento en la naturaleza de los triatominos relacionados con las

condiciones de construcción de las viviendas que crean micro hábitats adecuados (viviendas con hendiduras, grietas en paredes y techos, muros de barro y hojas de palmeras), así como el apilamiento de maderas piedras y tejas (23).

La transmisión natural de *T. cruzi* se lleva a cabo en tres ciclos; en el doméstico, el vector coloniza la vivienda humana en áreas rurales y suburbanas; en el peridoméstico, se mantiene alrededor de la vivienda humana y en el silvestre se presenta alejado de asentamientos humanos, con participación de reservorios silvestres y ecotopos naturales (24) (25). En México, se realizó un estudio en el que se documenta su importancia como vectores y se señala que existen dos especies intradomiciliadas que son *T. barberi* y *T. dimidiata*; en este estudio, se determinaron los porcentajes de metaciclología encontrándose en *T. barberi* 76.6% y *T. dimidiata* 26%, por lo cual la especie que funciona como mejor transmisor es *T. barberi* por presentar mayor porcentaje de tripomastigotes metacíclicos (metaciclología) y menor tiempo entre alimentación y defecación (18).

CUADRO CLÍNICO

Actualmente se describen 2 fases de la enfermedad, aguda y crónica; esta última dependiendo de la existencia de síntomas y signos característicos será crónica sintomática o crónica asintomática (también denominada indeterminada). Durante la fase aguda, solo el 5% presentan las manifestaciones relacionadas con el sitio de penetración del parásito que son el signo de Romaña, (edema bilateral unilaterial con cambios de coloración y duración de 2 a 3 semanas), el chagoma de inoculación (lesión nodular, también con cambios de coloración); ambas lesiones se acompañan de adenitis y linfangitis regional. En esta fase los síntomas y signos, aparecen usualmente al 10º día después de la infección. Las manifestaciones sistémicas son fiebre de 38°C, hepato-esplenomegalia, edema, astenia, hiporexia, cefalea, mialgias y artralgias. En menos del 1% pueden presentarse complicaciones como son carditis aguda o meningoencefalitis lo cual lleva a la muerte principalmente en el primer año de vida o en ancianos. En la historia natural de la enfermedad, el 70% de los individuos infectados cursan asintomáticos La fase crónica asintomática se presenta después de 10 a 20 años de la infección o incluso puede abarcar toda la vida; está caracterizada por la ausencia de síntomas y signos, solo se detecta por serología y ocasionalmente por el aislamiento del parásito el cual debido a la baja parasitemia es muy difícil de detectar; la importancia de esta fase, radica en que estos individuos, significan un alto riesgo para la transmisión en bancos de sangre. La fase crónica sintomática se presenta aproximadamente en el 30% de los individuos infectados, con lesiones cardíacas, digestivas o neurológicas (26). En la miocardiopatía chagásica, usualmente se presenta insuficiencia cardíaca con cardiomegalia. Las manifestaciones clínicas más comunes son disnea progresiva, palpitaciones, algias y edema de miembros inferiores con trastornos de conducción, usualmente bloqueos del haz de His, generalmente de rama derecha y arritmias; cuando se presenta en jóvenes, el trazo electrocardiográfico más frecuente es el bloqueo aurículoventricular lo que requiere en forma temprana instalación de

marcapasos. Se ha observado que la infección es más frecuente en el sexo femenino pero el desarrollo de la enfermedad sintomática lo es en el masculino. En los últimos años se ha detectado la fase crónica sintomática incipiente en menores de 18 años, algunos de ellos con el antecedente de haber presentado la fase aguda 2 años antes; todos ellos con serología positiva y cuyos síntomas más frecuentes son palpitations, disnea de grandes esfuerzos y algias precordiales con bloqueo incompleto de la rama derecha del haz de His (27). En el megaesófago, los síntomas son dolor y dificultad para deglutir. En el megacolon se presenta meteorismo y estreñimiento, el cual puede ser de 3 semanas o más y puede generar ulceración de la mucosa con el riesgo de perforación de la misma.



Figura 4- Signo de Romaña. Paciente del estado de San Luis Potosí
Cortesía: Dras. Salazar y Bucio.



Figura 5- Miocardiopatía chagásica con cardiomegalia. Paciente masculino de 47 años de edad.
Cortesía: Dras. Salazar y Bucio.



Figura 6 Megas digestivos en México
Izquierda: Megaesófago. Primer caso en México (paciente femenino de 26 años).
Derecha: Megacolon. Primer caso en México (paciente masculino de 51 años).
(Cortesía: Dra. Paz María Salazar Schettino).

DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS

La determinación de formas parasitarias y de anticuerpos anti-*Trypanosoma cruzi* forman los elementos relevantes para el diagnóstico de laboratorio. El diagnóstico parasitológico se realiza durante la fase aguda de la infección, la cual es de muy corta duración, respecto a la fase crónica. Las pruebas serológicas, tienen como finalidad la detección y confirmación de individuos infectados o enfermos y son útiles, además, para la evaluación de medidas terapéuticas y el monitoreo de programas sanitarios. Se realizan con base en dos criterios: cuando se requiere detectar fácil y rápidamente un individuo infectado (tamizaje o “screening”) y deben mostrar alta sensibilidad, aun cuando la especificidad sea menor; o bien, cuando sea necesario confirmar casos, y a sea por presentar reactividad en pruebas de tamizaje o por existir antecedentes clínicos y/o epidemiológicos compatibles con el padecimiento, a estas pruebas se les denominan confirmatorias y deben mostrar sensibilidad y especificidad elevadas. Respecto al diagnóstico serológico, la OPS/OMS recomienda lo siguiente:

MÉTODOS SEROLÓGICOS Y MOLECULARES PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA INFECCIÓN POR TRYPANOSOMA CRUZI					
OBJETIVOS	CONVENCIONALES			NO CONVENCIONALES	
	ELISA	IFI	HAI	Antígenos Recombinados	RCP
Demostración serológica (se recomiendan dos pruebas)	X	X	X	X	
Detección en bancos de sangre (se recomienda una prueba)	X				
Transmisión transplacentaria y perinatal (se recomiendan dos pruebas)	X	X		X	X
Encuestas epidemiológicas (se recomienda una prueba)	X	X			
Seguimiento del tratamiento (se recomiendan dos pruebas)	X	X	X		X

Tabla 3- Métodos para el diagnóstico de la infección por *Trypanosoma cruzi* (28).

HAI- Hemaglutinación Indirecta, ELISA- Inmunoensayo enzimático ("Enzyme-Linked Immunosorbent Assay"), RCP- Reacción en cadena de la polimerasa.

Diagnóstico de Gabinete

Los primeros estudios de gabinete empleados para el diagnóstico, son los radiológicos donde se pueden detectar diversos grados de dilatación cardíaca (cardiomegalia) o de cavidades con crecimiento único de ventrículo izquierdo, de ambos ventrículos y congestión vascular pulmonar; la experiencia al respecto, señala la existencia de casos de cardiopatías en donde se observan siluetas cardíacas dentro de límites normales; por esta razón, si existen los recursos necesarios, se recomienda el empleo de la Electrocardiografía (ECG) que en esta cardiopatía muestra alteraciones según la fase evolutiva de la enfermedad; en la aguda, los registros, generalmente son inespecíficos y en la crónica puede mostrar alteraciones del ritmo y bloqueos de rama incompletos o completos; estas alteraciones pueden sugerir el diagnóstico de la miocardiopatía chagásica; sin embargo, se deben considerar los datos epidemiológicos, serológicos y clínicos. En la ecocardiografía, se observa generalmente miocardiopatía dilatada con anomalías en el movimiento de la pared y en algunos casos adelgazamiento o incluso aneurisma apical (signo patognomónico).

CITOCINAS

La palabra citocina proviene del griego *cito* (célula) y *kinein* (movimiento), las citocinas son glicoproteínas reguladoras de varios mecanismos inmunes que se caracterizan por ser de bajo peso molecular y ser secretadas por varios tipos de células; en el sistema inmune son secretadas por linfocitos, por lo cual se han denominado interleucinas (IL); sin embargo, algunas de ellas han sido detectadas en ensayos funcionales *in vitro*, por lo cual su denominación se basa en la función biológica como es el caso del factor de necrosis tumoral (TNF) y el factor transformador de tejidos (TGF); también se han clasificado según su estructura proteica o tipo de conformación estructural alfa hélice o beta plegada. Existe un subconjunto de citocinas con función efectora sobre la quimiotaxis y estimulación de leucocitos llamadas

quimiocinas; en general, las citocinas tienen varias funciones, especialmente en los procesos inflamatorios, de transducción de señales, quimotaxis celular y activación de varias células (29).

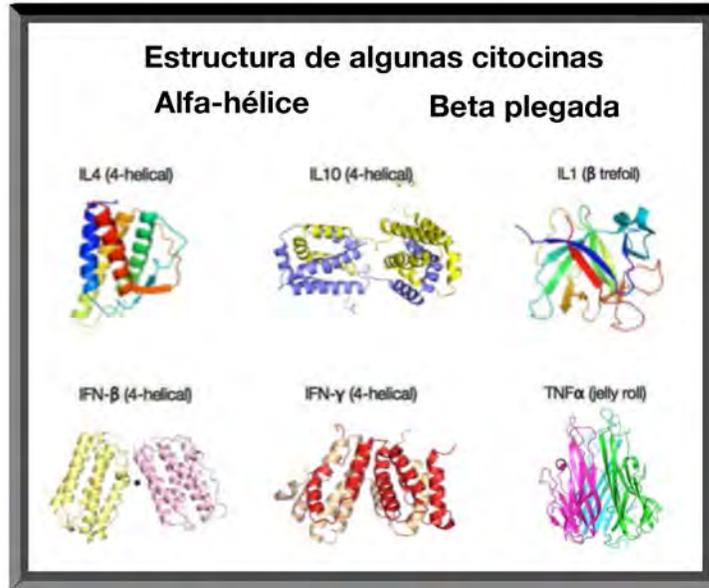


Figura 7- Diferentes conformaciones estructurales de las citocinas.

Las citocinas se sintetizan en el aparato de Golgi y su transporte al exterior de la célula es variable; pueden ser expulsadas por medio de vesículas del retículo endoplasmático para ser utilizadas como mediadores solubles o bien, pueden permanecer unidas a la membrana (como IL-1 α o TNF α); pueden ser procesadas en forma citosólica y finalmente, pueden volver al núcleo, donde pueden actuar como reguladores transcripcionales (como en el caso de IL-33 que se une al mensajero de NF- κ B). El peso molecular de la mayoría de las citocinas es bajo, generalmente menor de 30 kDa. Funcionalmente, las citocinas pueden actuar de diversas formas, denominadas pleiotrópicas (múltiples efectos al actuar sobre diferentes células), redundantes (varias citoquinas pueden ejercer el mismo efecto) y sinérgicas (dos o más citoquinas producen un efecto que se potencia mutuamente). Los factores que inducen su expresión son diversos, principalmente el contacto de un receptor tipo TLR con un PAMS o DAMS, contacto célula-célula, presencia de anticuerpos, activación del complemento, presencia de componentes de la matriz extracelular y presencia de ADN propio o microbiano, entre otros (29).

CITOCINA	kDa	CÉLULA PRODUCTORA	ACTIVIDAD
IL-1ra	17	Monocitos	Inhibe la actividad de la IL-1 mediante la unión a receptor de IL1R1.
IL-1 β	18	Fagocitos mononucleares, neutrófilos, células epiteliales	Induce la liberación de histamina en mastocitos, actividad quimotáctica sobre los granulocitos. Induce la expresión de prostaglandinas; junto con la IL-6 induce la expresión de proteínas de fase aguda.
IL-2	20	Linfocitos T y en menor cantidad células B activadas	Crecimiento y diferenciación de células T, B, NK, monocitos y macrófagos. Producción de IFN- γ e IL-4. Expansión de células citotóxicas. Previene autoinmunidad y mantiene la homeostasis del sistema inmune.
IL-4	20	Linfocitos Th2, células cebadas	Desarrollo de la sub-población Th2 de manera autócrina, antagoniza con IFN- γ e inhibe reacciones inmunitarias.
IL-6	26	Macrófagos, fibroblastos, células endoteliales y linfocitos T.	Induce la síntesis de proteínas de fase aguda, efectos sistémicos de inflamación, producción y respuesta de neutrófilos.
IL-10	18	Macrófagos activados y linfocitos T.	Inhibe la síntesis de IFN- γ e IL-12 y expresión de moléculas co-estimuladoras y moléculas CPH clase II en macrófagos y células dendríticas.
IL-12	35	Fagocitos mononucleares, células dendríticas	Estimula la función citolítica de linfocitos, NK y linfocitos CD8+. Proliferación tipo Th1, maduración de células T, activación de células B.
IL-15	15	Monocitos, fibroblastos, células B, células dendríticas	Activación de células T y mantenimiento de éstas, maduración de NK, activación de fibroblastos y cambio de isotipo en células B.
TNF- α	26	Fagocitos mononucleares, linfocitos T, NK, células cebadas.	Estimula moléculas de adhesión y atracción de neutrófilos y monocitos a zonas de infección.
IFN- γ	20-25	NK, Th1 CD4+ y TCD8+	Favorece la diferenciación de linfocitos hacia Th1. Refuerza la función microbicida de macrófagos, estimula la síntesis de oxígeno y óxido nítrico. Activa neutrófilos, promueve la actividad citolítica de linfocitos NK. Estimula la producción de moléculas CPH clase I y II y de LMP-2 y LMP-7 del proteosoma. En linfocitos B, favorece la producción de IgG y opsonización de microorganismos.
TGF- β	25	Fibroblastos, monocitos, células T, y plaquetas.	Inhibe la proliferación, diferenciación y activación de linfocitos T, macrófagos, neutrófilos y células endoteliales. Estimula la síntesis de IgA. Estimula los procesos de cicatrización y antagoniza con la respuesta Th1.
IL-17	20-30	Células TH17	Estimula la producción de quimiocinas, de citocinas por los fibroblastos, de MMP e induce el reclutamiento de neutrófilos al sitio de infección.

Tabla 4- Características de algunas citocinas en la respuesta inmune.

kDa- Peso molecular en kilodaltones. NK- células asesinas naturales, CPH- complejo mayor de histocompatibilidad.

INMUNIDAD CONTRAT. CRUZI

En el proceso de reconocimiento parásito-célula huésped, los antígenos de *T. cruzi* son reconocidos por receptores tipo "toll" de la célula huésped (TLR4, TLR2 y TLR9), al igual que los antígenos como el glicosilfosfatidilinositol (GIPL), antígeno de 52 kDa (TC52), cruzipaina y trans-sialidasas, son reconocidos por receptores tipo TLR (TLR2, TLR4 y TLR9) y activan el reclutamiento del adaptador MyD88, que a su vez recluta TRAF6 que induce la fosforilación de las cascadas de MAPK, lo que induce la translocación de JNK y NF- κ B al núcleo, que induce la expresión de TNF- α , IL-12, y las moléculas coestimuladoras (30-32).

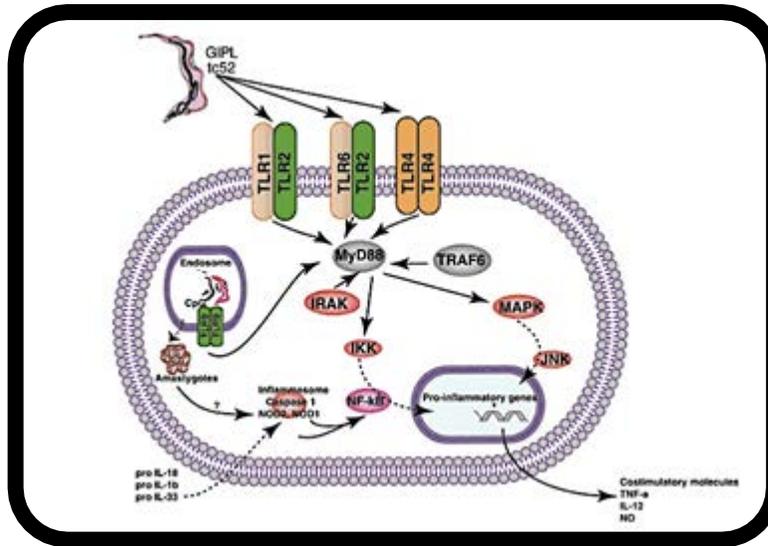


Figura 8- Mecanismos de reconocimiento de *T. cruzi* en macrófagos (30).

Algunos autores han descrito PAMMS procedentes del parásito que inducen la producción de citocinas como se muestra a continuación:

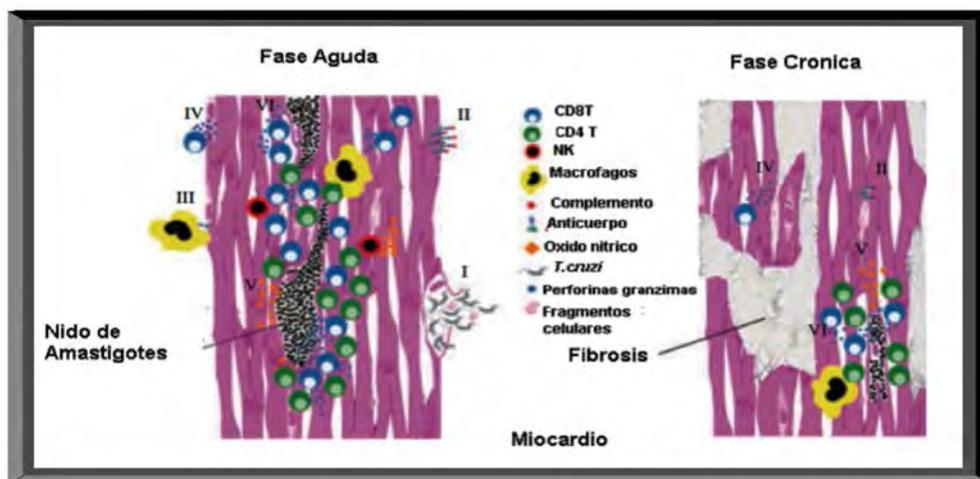
ANTIGENO	CITOCINA QUE INDUCE	REFERENCIA
Glicosilfosfatidilinositol	Sinergiza con IFN- γ , induce la producción de óxido nítrico en macrófagos	(99)
Antígeno Tc52	Sinergiza con IFN- γ , induce IL-1, IL-12 e IL-10	(98)
Cruzipaina	Estimula macrófagos para secretar IL-10 y TGF- β , lo que favorece la reproducción de <i>T. cruzi</i> . Induce IL-4, IL-5 e IL-10 y genera bajos niveles de IFN- γ e IL-12.	(101)
Antígeno de membrana de cinetoplastidos (KMP-11) K1	Estimula en linfocitos CD8+ la producción de IFN- γ	(102)
Antígeno binante TcSSP4	Estimula la producción de IL-1 α , IL-6, IL-12, IFN- γ y TNF- α	(103)
Trans-sialidasa	IL-6	(100)
CRA Antígeno citoplásmico	Estimula en los linfocitos T CD8+ la producción de IFN- γ y TNF- α .	(104)

Tabla 5- Antígenos de *T. cruzi* que inducen expresión de citocina.

INMUNOPATOGENIA DE LA CARDIOPATÍA EN LA ENFERMEDAD DE CHAGAS

El proceso inmunopatogénico de la cardiopatía chagásica es muy complejo; inicia con el desarrollo de diferentes mecanismos desencadenados por la multiplicación intracelular del amastigote con lo que se genera lisis de las células miocárdicas y la activación de la respuesta inmune específica contra *T. cruzi* con la consecuente liberación de componentes de la célula huésped que genera como consecuencia autoinmunidad con auto-anticuerpos y células T reactivas; estos auto-anticuerpos pueden generar lesiones mediante la vía del complemento y activación de macrófagos (33). Los linfocitos T citotóxicos no solo lisan las células infectadas, sino también contribuyen a la destrucción de las células adyacentes; al respecto, a la fecha se han descrito anticuerpos con reactividad cruzada con múltiples estructuras del vertebrado; esta lesión tisular, genera la producción de $\text{TNF-}\alpha$, con producción de óxido nítrico, el cual también se produce localmente de forma directa con lo que finalmente se genera la lesión cardíaca por estrés oxidativo (34).

Este proceso continúa en la fase crónica a pesar de la disminución de la parasitemia tisular, con la formación de pequeños focos inflamatorios con el consecuente daño tisular para finalmente generar fibrosis con el desarrollo de la miocardiopatía dilatada característica, según se muestra en la siguiente figura:



I-Multiplicación de *T. cruzi*
II-Autoanticuerpos
III-Activación de macrófagos

IV-Generación de Infocitos TCD8+ auto-reactivos
V-Destrucción de células adyacentes
VI-Daño cardíaco extenso por estrés oxidativo

Figura 9- Inmunopatogenia de la cardiopatía chagásica. (Modificado de 34)

Otros investigadores describen 4 mecanismos involucrados en el desarrollo de la lesión en la cardiopatía. Trastornos del sistema nervioso autónomo, alteraciones microvasculares, alteraciones producidas por la propia presencia del parásito y lesiones miocárdicas mediadas por la respuesta del sistema inmune (35)

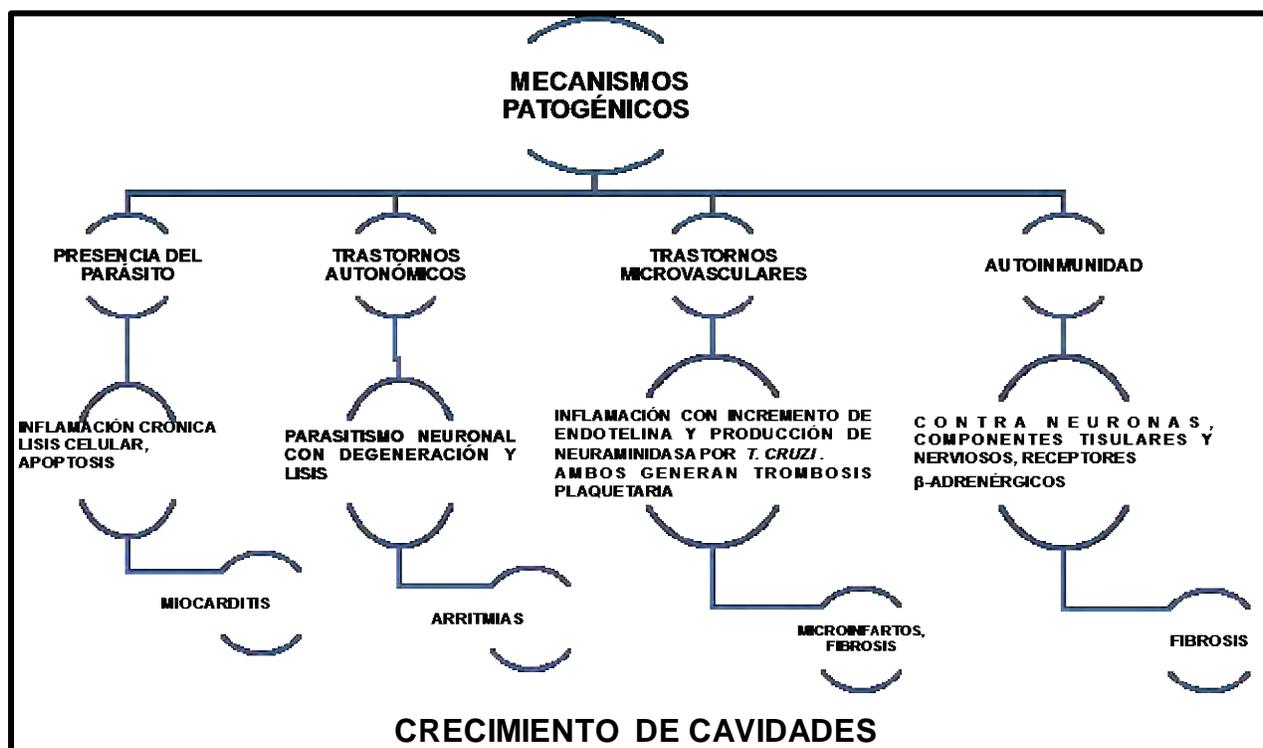


Figura 10- Mecanismos involucrados en las lesiones crónicas generadas por *T. cruzi*.

TRATAMIENTO ANTIPARASITARIO DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS

El tratamiento contra la infección por *T. cruzi* consiste en el empleo de dos fármacos, nifurtimox “Lampit” (Bayer) y benznidazol “Radanil” (Roche). El nifurtimox (1972) y el benznidazol (1974) han sido aceptados por casi todos los ministerios de salud de Latinoamérica, incluido México y se consideran antiparasitarios específicos contra *T. cruzi*; estas drogas inicialmente fueron empleadas exclusivamente para la fase aguda y en los últimos años, para la fase crónica de la infección-enfermedad en población infantil y joven. Las metas del tratamiento específico contra la infección por *T. cruzi* son eliminar al parásito de las personas infectadas para disminuir la probabilidad de desarrollar patología cardíaca o digestiva, cortar la cadena de transmisión de *T. cruzi* y disminuir la tasa de infección (20).

El mecanismo de acción del nifurtimox se basa en la capacidad del fármaco de reducirse en forma de aniones superóxido, peróxido de hidrogeno y radicales hidroxilo; estos radicales se unen a las biomoléculas estructurales de *T. cruzi* y originan peroxidación de lípidos y por lo tanto, alteraciones de la membrana celular, degradación de ADN y mutagénesis. *T. cruzi*, presenta bajos niveles de enzimas

como la glutatión-reductasa, con función de reducir el peróxido de hidrógeno y radicales libres lo cual lo hace vulnerable a dichos radicales (36).

La acción parasiticida del benznidazol, se debe a la producción de metabolitos reducidos del grupo nitro, los cuales se unen covalentemente a macromoléculas celulares (de igual forma que el nifurtimox), incluyendo ADN, provocando una interrupción en la producción de proteínas (36).

CITOCINAS EN LA ENFERMEDAD DE CHAGAS

En la fase aguda de la enfermedad de Chagas, se desarrolla una respuesta que involucra principalmente la activación de células fagocíticas citotóxicas (CD8+) y NK. En esta fase se producen citocinas proinflamatorias con el fin de reclutar e inducir la activación de monocitos al sitio de infección (37); este proceso es importante para el control de la replicación del parásito mediante una respuesta tipo Th1 (IL-1, IFN- γ y TNF- α), donde las células fagocíticas son activadas por interferón gama (IFN- γ), el cual activa la sintetasa inducible de óxido nítrico de macrófagos (iNOS) y la generación de óxido nítrico (NO), con lo que se estimula la lisis parasitaria intracelular (38), además de inducir en el hígado la síntesis de proteínas de fase aguda (39, 40.)

El mecanismo más importante para una respuesta eficaz al inicio de la infección por *T. cruzi* es inducido por IFN- γ (41), al inducir la producción de óxido nítrico en macrófagos para iniciar el control de la parasitemia sanguínea durante la fase temprana de la enfermedad (42); existen citocinas que inducen susceptibilidad a *T. cruzi* reduciendo la producción de IFN- γ y óxido nítrico en macrófagos durante la fase temprana de la infección como puede ser IL-10 e IL-4; sin embargo, en la fase crónica sintomática, en miocardio, estas citocinas son referidas para el control de citocinas pro-inflamatorias y su baja expresión se asocia a susceptibilidad (43).

Es importante señalar que durante la fase aguda de la enfermedad, la respuesta Th1 con la producción de citocinas como TNF- α e IFN- γ , que en un principio protege al huésped de la infección, en etapas más avanzadas, se asocia con el daño tisular en miocardio con una respuesta inflamatoria exacerbada; por lo tanto, un adecuado control de estos mediadores por medio de citocinas anti-inflamatorias como IL-10 y TGF- β , atenúan este daño originado por la presencia de linfocitos T citotóxicos y macrófagos activados (48, 49, 50, 51).

En fase crónica, la principal citocina implicada es el TGF- β , cuya función es importante en la regulación de la formación y degradación de matriz extracelular, además de inducir la expresión de varios componentes de matriz extracelular (53), principalmente fibronectina, laminina y colágeno; por otro lado, se han descrito otras citocinas que regulan la fibrosis en miocardio que son consideradas profibrogénicas, como son el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), endotelina, factor de crecimiento

derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento básico de fibroblastos (BFGF), proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1), proteína inflamatoria de macrófagos 1-alfa (MIP-1 α), IL-1, IL-5, IL-8 e IL-13.

En la siguiente tabla se resume la función de las citocinas según la fase clínica.

CITOCINA	FASE CLÍNICA	FUNCION
IL-1 β	Crónica	Con actividad profibrogénica junto con IL-6 se asocia a disfunción del miocardio por apoptosis (35).
IFN- γ ,	Aguda y Crónica	Activación de fagocitos contra <i>T. cruzi</i> en fase aguda (47; 48), en fase crónica se asocia la respuesta Th1 en la cronicidad de la enfermedad.
IL-6	Crónica	Relacionada con disfunción del miocardio (35), y estimula la producción de IFN- γ (44).
TGF- β e IL-10	Aguda y crónica	TGF- β implicada en los procesos fibróticos como reguladora del proceso de cicatrización y deposición de matriz extracelular (53), IL-10 anti-inflamatoria reguladora del proceso inflamatorio crónico (52).
IL-2 e IL-15	Aguda y Crónica	Limita la función de los linfocitos por medio de apoptosis (45, 46). Mantiene las poblaciones de linfocitos T CD8+ por la inducción Bcl-2 y Bcl-xL que son inhibidores de la apoptosis celular (54).
IL-17	Crónica y Aguda	En linfocitos TH17, son capaces de reconocer auto-antígenos (56); o bien, es producida tempranamente en fase aguda, puede modular la respuesta Th1 y controlar el proceso inflamatorio.

Tabla 6- Función de algunas citocinas según la fase clínica de la infección-enfermedad

Algunos investigadores han asociado la resistencia y susceptibilidad en la infección-enfermedad de (57) Chagas con la expresión de algunas citocinas y receptores de quimiocinas que se presentan en la siguiente tabla:

PROTECCION	SUSCEPTIBILIDAD
IL-2, IL-12, IFN- γ , TNF- α , IL-10 Encontrados en mayor concentración en ratón y en pacientes asintomáticos.	IL-1, IL-6, IL-15, IFN- γ , TNF- α . Encontradas en gran cantidad en ratón y en pacientes cardiopatas. IL-10, IL-4. En baja proporción en pacientes cardiopatas (105, 106).
	IL-2. En ratón se asocian bajos niveles a susceptibilidad (107).
TNF- α La estimulación in vitro de macrófagos con IFN- γ , TNF- α , induce la disminución de amastigotes (51)	TGF- β , IL-10 En cultivos de macrófagos, la estimulación con altos niveles de TGF- β e IL-10, inhibe la acción tripanocida del IFN- γ (51).
IL-17-A En ratón, en fase aguda ayuda al control del parásito.	IL-17 En ratón, su alta expresión se asocia a destrucción del miocardio (79).
	CCL3 y CCL5 En ratón su alta expresión se asocia a destrucción del miocardio (108).
CCL3 Está involucrada en el reclutamiento de macrófagos durante la infección aguda.	CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CXCL9 y CXCL10. En ratón su alta expresión es encontrada en el infiltrado inflamatorio (109, 110).

Tabla 7- Principales citocinas y receptores de quimiocinas reportados como inductores de susceptibilidad y protección en la infección por *T. cruzi*.

En el siguiente esquema se muestran algunas de las citocinas involucradas en la enfermedad de Chagas en las fases agudas y crónica sintomática.

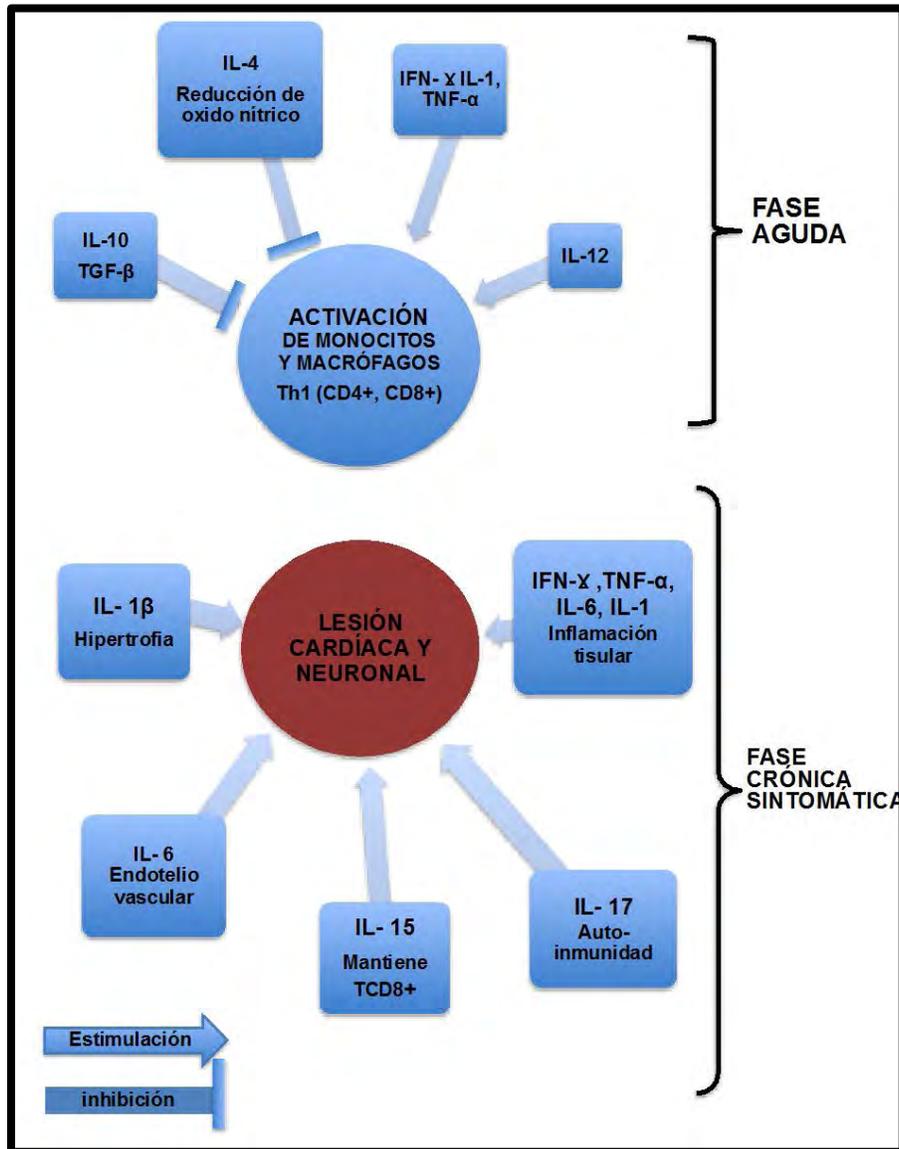


Figura 11- Principales citocinas presentes durante las fases aguda y crónica en la enfermedad de Chagas

JUSTIFICACIÓN

En la historia natural de la enfermedad, el 70% de los casos de los individuos que se infectan tiene una evolución favorable, con resolución no solo de la infección, sino también del proceso inflamatorio; el 30% restante evoluciona a la fase crónica sintomática, de los cuales el 27% presentarán manifestaciones cardíacas (la mayoría relacionadas con la fibrosis característica que se presenta especialmente en miocardio) y el 3% restante con lesiones en otros órganos, principalmente colon, esófago o SNC (26). La persistencia del parásito aunado a una respuesta inmune inflamatoria persistente induce las lesiones características de la enfermedad en fase crónica; sin embargo, los mecanismos inmunológicos que intervienen en el desarrollo de esta fase aún continúan esclarecerse (35); por esta razón, se requieren estudios en los cuales se analice esta respuesta inmune, específicamente con las citocinas involucradas en estos procesos (58) y su relación con las fases de la enfermedad de Chagas.

La información que existe en la patogénesis de la enfermedad de Chagas en relación a los mecanismos inmunes, se ha sustentado en estudios realizados principalmente en modelos experimentales como son ratón o cultivos celulares donde se sugiere que las citocinas son componentes integrales del sistema intercelular necesario para modular y controlar la enfermedad (59,60); sin embargo, el perfil de citocinas que se presenta durante la infección humana con *T. cruzi*, es poco conocido (58, 61); la mayoría de estos estudios han sido realizados principalmente en Sudamérica, donde se han estudiado generalmente adultos con patologías crónicas severas, al respecto, es bien sabido que el comportamiento del parásito varía según el país o región de origen (14) (por lo cual, se requieren estudios con población mexicana, como es el presente, en el cual se incluyen individuos menores de 18 años, asintomáticos y sintomáticos con patologías incipientes y severas ya que la cardiopatía en esta enfermedad, ha sido descrita principalmente en adultos por lo que se carece de información en menores de edad.

La respuesta Th1 que es inducida por citocinas específicas, principalmente por IFN- γ , es considerada como protectora durante la fase aguda; esta respuesta continua y carente de regulación, contribuye a la cronicidad de las manifestaciones cardíacas (51). Existen otras citocinas involucradas en la progresión del daño tisular hacia la fase crónica sintomática, donde es de suma importancia la regulación de los procesos fibróticos; al respecto, citocinas como el TGF- β (implicada en la deposición de la matriz extracelular y procesos fibróticos) junto con TNF- α , MIP-1 α , IL-1, IL-8 e IL-13, (62), actúan en miocardio donde la fibrosis, clínicamente, se refleja con motilidad anormal de las cavidades con deterioro de la función cardíaca global. En la respuesta anti-inflamatoria, la IL-10 regula la respuesta tipo TH1 y finaliza los procesos inflamatorios de la fase aguda; sin embargo, cuando su expresión es muy temprana puede inducir aumento en la parasitemia durante la fase aguda. También se ha demostrado que durante la fase crónica, el parásito puede incrementar la expresión de IL-10 y TGF- β en macrófagos, lo cual condiciona un incremento en la replicación de *T. cruzi* (63, 64); respecto a la IL-4, se ha observado que puede ser inducida por el parásito y desencadenar funciones inmunosupresoras inhibiendo la acción microbicida

del IFN- γ , también en macrófagos, por lo cual, se señala la importancia de estudiar las citocinas anti-inflamatorias que intervienen en la progresión de la fase crónica (65).

Actualmente existen dos fármacos con efectividad relativa durante la fase aguda, el Benznidazol, y el Nifurtimox (66, 67). A pesar de la menor efectividad observada en fase crónica varios análisis han sugerido que el tratamiento durante esta fase evita la progresión de la enfermedad aun cuando el parásito no sea eliminado del todo (68, 69). Uno de los principales factores que influye en la eliminación del parásito, es la acción cooperativa entre los efectos del fármaco y la respuesta inmunológica del huésped (70, 71); al respecto, poco se sabe acerca de los cambios en la respuesta inmune después del tratamiento, específicamente durante las fases crónicas sintomática y asintomática de la enfermedad, por lo que se requieren estudios adicionales para comprender el impacto del tratamiento en el sistema inmunológico de estos pacientes (61), por esta razón, en el presente trabajo también se analiza la respuesta de las citocinas en los pacientes después de haber sido tratados.

HIPÓTESIS

La capacidad de los pacientes para enfrentar la infección por *T. cruzi*, depende del equilibrio entre la respuesta inmune inflamatoria y anti-inflamatoria.

OBJETIVOS

1. Determinar el perfil de las citocinas pro-inflamatorias IL-1 β , IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-6, IL-17, quimiocinas IL-8, MIP-1 α y anti-inflamatorias IL1-RA, IL-4, IL -10 , IL-13 y TGF- β en individuos mexicanos infectados con *T. cruzi*.
2. Analizar si existen diferencias entre los niveles de citocinas en individuos infectados con *T.cruzi* en diferentes fases de la enfermedad y su evolución clínica.
3. Analizar si existen diferencias en el perfil de citocinas en los pacientes tratados y no tratados.

METODOLOGÍA

GRUPOS DE ESTUDIO

La conformación de la muestra fue a partir de un grupo de individuos seropositivos a la infección por *T. cruzi*. El tamaño de la muestra fue de 33 pacientes mexicanos en diferentes fases de la infección-enfermedad originarios de los estados de Querétaro, San Luis Potosí y Veracruz.

La caracterización del perfil clínico-cardiológico de los individuos cursando las fases crónica sintomática y crónica asintomática, se realizó por medio de un estudio clínico-epidemiológico, el cual consistió en una historia clínica *ad-hoc* y tamizaje serológico, posteriormente la confirmación serológica mediante ELISA, IFI y WB (este último en caso de ser necesario en los casos con valores dudosos o discordantes) y finalmente, se realizó a cada paciente el estudio cardiológico que consistió en estudio electrocardiográfico (ECG) y estudio ecocardiográfico (ECO), los cuales se realizaron en los servicios de cardiología pediátrica y Ecocardiografía en el Instituto Nacional de Cardiología “Dr. Ignacio Chavez”.

Criterios de selección para la población de estudio

Inclusión:

- Ser de nacionalidad mexicana, seropositivo a la infección por *Trypanosoma cruzi*.
- Aceptar participar en el estudio de investigación mediante firma de la carta de consentimiento informado.

Exclusión:

- Presentar otras patologías cardiovasculares
- Presentar alteraciones congénitas con afectación cardiovascular

Eliminación:

- No concluir el estudio serológico o clínico-cardiológico
- Muestra insuficiente o contaminada
- Embarazo.

Los grupos de estudio, se caracterizaron clínicamente mediante los criterios propuestos por Kuschner en 1985, con modificaciones y la inclusión de un tercer grupo, según se muestra a continuación:

Grupo 1. Crónicos Asintomáticos

Seropositivos a *T. cruzi* sin alteraciones en el trazo electrocardiográfico, con estudio de ecocardiograma normal o con lesiones incipientes consideradas normales.

Grupo 2. Crónicos Sintomáticos Incipientes

Seropositivos a *T. cruzi* con BIRDHH o con hipertrofia de septo interventricular o de pared posterior, con estudio de ecocardiograma con lesiones incipientes.

Grupo 3. Crónicos Sintomáticos con lesiones francas

Seropositivos a *T. cruzi* con BIRDHH, BRDHH y/o con otras alteraciones, con estudio de ecocardiograma que muestra lesiones francas.

ESTUDIO ECOCARDIOGRÁFICO

El tipo de lesión cardíaca que presenta un individuo con enfermedad de Chagas, se puede analizar por medio de estudio ecocardiográfico el cual puede ser bidimensional o tridimensional y permite mostrar el engrosamiento del septo interventricular, de la pared posterior, disminución de la fracción de expulsión, dilatación de cavidades, principalmente de ventrículo izquierdo, hipertensión pulmonar y alteraciones en la movilidad.

ELISA INDIRECTA PARA LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-*T. cruzi*

Para la detección de anticuerpos IgG anti-*T. cruzi*, se realizó la técnica de ELISA Indirecta (72) en microplacas de poliestireno de 96 pozos con fondo plano (Corning Life Sciences Corp. MA. USA.), fijadas con 8 µg/mL de un extracto antigénico de *T. cruzi*; se incubaron durante la noche a 4° C; posteriormente se bloquearon durante una h con PBS leche semidescremada al 5% (200 µL por pozo) a temperatura ambiente (T.A.); las placas fueron lavadas 3 veces con PBS-Tween 20 al 20%. Posteriormente se incubaron 100 µL de sueros controles positivo alto, positivo bajo, negativo y sueros problema en dilución 1:100 durante 30 min a 37°C; se realizaron 3 lavados y se incubó con 100 µL del conjugado anti IgG humano-peroxidasa (HRP-goat anti human IgG, invitrogen, cat. 6 2-8420) en dilución 1: 20,000 (previamente titulado) durante 30 min a 37°C, se realizaron 5 lavados y la reacción se reveló con el sustrato y el cromógeno (peróxido de hidrógeno en solución tampón de fosfato citrato pH5, OPD), la reacción se detuvo a los 30 min con 100 µL por pozo de ácido sulfúrico 1N. La lectura de la D.O. se realizó en espectrofotómetro de microplacas a 490 nm (ELISA Microplate Reader, modelo 550, Bio-Rad) (ANEXO 3).

ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE)

La separación por peso molecular de los componentes del extracto antigénico se realizó por electroforesis en geles discontinuos de poliacrilamida en condiciones reductoras con gel concentrador al 5% y gel separador al 12.5% con dodecil-sulfato de sodio (SDS) al 10% (Laemmli, 1970), en un equipo de electroforesis (Mini Protean III®, Cell-Bio-Rad) a una diferencia de potencial constante de 150 Volts durante aproximadamente 60 min, con una fuente de poder Bio-Rad Modelo 200/2.0. Se usó amortiguador de corrimiento constituido por 0.025 M Trizma-base (Tris hidroximetilaminometano), 0.192 M glicina y dodecil-sulfato de sodio (SDS) al 0.1%, pH 8.3. Para realizar la corrida electroforética, el volumen de muestra se ajustó para contener aproximadamente 30 µg de proteína por carril en un amortiguador de muestra comercial (Bio-Rad No. cat 161-0737). Se emplearon marcadores de peso molecular comerciales con rango entre 15 y 250 k Da (Bio-Rad). Un gel fue teñido con azul de Coomassie R-250 (Sigma) y otro con las mismas características fue utilizado para la electroinmunotransferencia (ANEXO 1)

ELECTROINMUNOTRANSFERENCIA (Western-blot)

Los ensayos de Western Blot se realizaron después del corrimiento electroforético, se realizó la transferencia a membranas de nitrocelulosa con poro de 0.45 µm en un aparato Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer (Bio-Rad®) a una diferencia de potencial constante de 15 volts durante 30 min. Una vez concluida la transferencia, la nitrocelulosa fue bloqueada con PBS/Tween 20 0.3%/leche 5% durante 2 h a temperatura ambiente en agitación ligera. Se realizaron 3 lavados y se incubaron los sueros testigo reactivos a *T. cruzi* y no reactivos en dilución 1:200 a 4°C en agitación ligera durante la noche. Se realizaron tres lavados y posteriormente se incubaron con el conjugado anti IgG humana unido a peroxidasa (HRP-goat anti human IgG, *invitrogen*, cat. 62-8420) en dilución 1:20 000, durante 2 h (T.A.). Se realizaron 5 lavados y se reveló la reacción con 3,3' Diaminobenzidina (DAB, Bio-rad, Cat. No. 170-6535) en oscuridad durante 15 min. La reacción se frenó con agua destilada, las membranas fueron secadas y guardadas a temperatura ambiente (73) (ANEXO 2).

DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE CITOCINAS EN SUERO POR BIOPLEX

El perfil de citocinas se determinó mediante la cuantificación de las mismas con el KIT Multiplex Suspensión Array System Bio Rad®, el cual es un inmunoensayo basado en los fundamentos de la ELISA en “sándwich” con el empleo de anticuerpos monoclonales unidos en forma covalente a microesferas, las cuales se unen a las citocinas diana que estén presentes en la muestra; en este sistema, el segundo anticuerpo está conjugado a una molécula fluorescente, esta fluorescencia es medida por medio de un citómetro y procesada por un software que analiza la presencia de citocinas y calcula su concentración (Bio-Rad Manager Software). Se utilizó una microplaca de 96 pozos y se colocaron 50 µL del *pool* de microesferas o *cocktail* de perlas (multiplex bead working solution Bio-Rad®) con anticuerpos monoclonales específicos contra los analitos de interés. Se agregaron 50 µL de los estándares y de las muestras de suero glicerinado en dilución 1:16 (como lo menciona el manual del kit); se incubó 1 h a temperatura ambiente con agitación constante (300 rpm). La detección de analitos se realizó con una mezcla de anticuerpos policlonales solución 10x de anticuerpo de detección 25 µL y se incubó 1 h. En seguida se adicionó 1x de estreptavidina -PE y 50 µL del buffer de ensayo Bio-Rad® y nuevamente se incubó durante 30 min. Por último, las microesferas se suspendieron en 125 µL de buffer de ensayo por aspiración, con solución amortiguadora de lavado. La lectura de la placa se realizó en plataforma Luminex (estación Bio-Plex Multiplex 200 sistema), en donde las esferas se aspiran para hacerlas pasar por un canal en donde cada una es incidida por dos diferentes láser, el primero, en rojo, excita la esfera y detecta el código de la misma, para discriminar entre una molécula y otra; el segundo, verde, excita el marcaje fluorescente y de esta forma, cuantifica la señal emitida por cada una de las esferas. El equipo cuenta con un software de análisis (software versión 6.0) que permite la utilización de métodos de regresión que dan como resultado la concentración en pg/mL (ANEXOS 5 y 6).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La asociación de la diferencia en los niveles de citocinas se comparó con muestras de controles sanos. Se sometieron a análisis estadístico con la prueba de U-Mann Whitney y Kruskal-Wallis para evaluar diferencias en las concentraciones de citocinas; se consideró significancia de $P \leq 0.05$, se excluyeron los valores calculados como valor atípico conocido como "outlier". Todos los análisis se hicieron con el programa Prism (Graph-Pad).

U-Mann Whitney se utilizó al considerar las siguientes características:

- Comparar las diferencias de concentración entre citocinas (considerando que las mediciones de los grupos son independientes y las variables son continuas).
- Bajo la hipótesis nula, las distribuciones de partida de ambas distribuciones es la misma.
- Bajo la hipótesis alternativa, los valores de las muestras son diferentes.
- $p \leq 0.05$.

RESULTADOS

POBLACIÓN ESTUDIADA

La población estudiada pertenece a los estados de San Luis Potosí (13 individuos), Veracruz (2 individuos) y Querétaro (7 individuos). El diagnóstico serológico se confirmó al mostrar reactividad en dos pruebas serológicas. En aquellos casos en que se confirmó la administración y fecha del tratamiento antiparasitario específico, se realizó seguimiento serológico, posterior al mismo. El análisis de la población se dividió en tres grupos según los resultados de los estudios del ECG y ECO.

Grupo 1

El Grupo 1, estuvo compuesto por 13 individuos seropositivos, con trazo ECG normal antes del tratamiento y con alteraciones en el ECG consideradas normales y que no afectan la función global del corazón. La distribución por sexo fue de 9 femeninos y 4 masculinos; respecto a la edad, 3 fueron de 7, 8 y 9 años de edad y el resto entre 12 y 15 años. Todos presentaban ECG con trazos normales después del tratamiento; sin embargo, 4 mostraron bradicardia sinusal como se muestra en la tabla 8.

EDO. FOLIO	SEXO	EDAD	ELISA IFI	ECG PRE-TX. ECG POST-TX.	TRATAMIENTO	ECOCARDIOGRAMA
SLP 495	F	17	POSITIVO	TRAZO NORMAL	NO IDENTIFICADO	LESIONES INCIPIENTES
SLP 1296	F	8	POSITIVO	TRAZO NORMAL NORMAL	BENZNIDAZOL	NORMAL
SLP 921	M	16	POSITIVO	TRAZO NORMAL BRADICARDIA SINUSAL	BENZNIDAZOL	NORMAL
SLP 854	F	18	POSITIVO	TRAZO NORMAL BRADICARDIA SINUSAL	BENZNIDAZOL	NORMAL
SLP 704	F	17	POSITIVO	TRAZO NORMAL	PENDIENTE	NORMAL
QRO 68	F	18	POSITIVO	TRAZO NORMAL TRAZO NORMAL	NIFURTIMOX	NORMAL
SLP 876	M	14	POSITIVO	TRAZO NORMAL BRADICARDIA SINUSAL	BENZNIDAZOL	LESIONES INCIPIENTES
QRO 70	F	9	POSITIVO	TRAZO NORMAL TRAZO NORMAL	BENZNIDAZOL	NORMAL
SLP 470	M	17	POSITIVO	TRAZO NORMAL	NO IDENTIFICADO	NORMAL
SLP 79	F	12	POSITIVO	TRAZO NORMAL BRADICARDIA SINUSAL	BENZNIDAZOL	NORMAL
SLP 485	F	17	POSITIVO	TRAZO NORMAL TRAZO NORMAL	BENZNIDAZOL	LESIONES INCIPIENTES
QRO 467	M	7	POSITIVO	TRAZO NORMAL TRAZO NORMAL	BENZNIDAZOL	NORMAL
SLP M-29	F	6	POSITIVO	TRAZO NORMAL TRAZO NORMAL	BENZNIDAZOL	NORMAL

Tabla 8. Características del Grupo 1

NO IDENTIFICADO- Tratamiento sin la certeza de haber sido administrado. **PRE-TX.:** Trazo obtenido antes del tratamiento. **POST-TX:** Trazo obtenido después del tratamiento.

Grupo 2

El Grupo 2 se constituyó por 9 individuos con serología positiva, que presentaron ECG con bloqueo incompleto de rama derecha del haz de His (BIRDHH) o bien alteraciones en el ECO sugestivas de daño incipiente al miocardio como hipertrofia del septo interventricular o de pared posterior; a este grupo se le realizó seguimiento serológico y electrocardiográfico antes y después del tratamiento específico. La distribución por sexo fue de 3 pacientes femeninos y 6 masculinos, las edades comprendidas en este grupo son de un caso de 9 años y el resto de 12 a 18 años. Todos los pacientes después de recibir el tratamiento continuaron con BIRDHH. En el caso del paciente SLP-138, se observa que aun cuando el trazo del ECG fue normal, el ECO mostró alteraciones.

EDO. FOLIO	SEXO	EDAD	ELISA IFI	ECG PRE-TX. ECG POST-TX.	TRATAMIENTO	ECOCARDIOGRAMA
SLP 208	F	15	POSITIVO	BIRDHH BIRDHH	BENZNIDAZOL	NORMAL
SLP 901	F	14	POSITIVO	BIRDHH BIRDHH	BENZNIDAZOL	NORMAL
SLP 150	M	12	POSITIVO	BIRDHH BIRDHH	BENZNIDAZOL	LESIONES INCIPIENTES
SLP 138	F	12	POSITIVO	TRAZO NORMAL	NO IDENTIFICADO	LESIONES FRANCAS
QRO 42	M	9	POSITIVO	BIRDHH BIRDHH	BENZNIDAZOL	NORMAL
SLP 1225	M	12	POSITIVO	BIRDHH BIRDHH	BENZNIDAZOL	LESIONES INCIPIENTES
SLP 918	M	13	POSITIVO	BIRDHH BIRDHH	BENZNIDAZOL	LESIONES INCIPIENTES
SLP 706	M	18	POSITIVO	BIRDHH BIRDHH	BENZNIDAZOL	LESIONES INCIPIENTES
SLP 251	M	15	POSITIVO	BIRDHH BIRDHH	BENZNIDAZOL	NORMAL

Tabla 9. Características del Grupo 2

NO IDENTIFICADO- Tratamiento sin la certeza de haber sido administrado. **PRE-TX.-** Trazo obtenido antes del tratamiento. **POST-TX-** Trazo obtenido después del tratamiento.

Grupo 3

El Grupo 3 estuvo integrado por 11 individuos menores de 18 años; el ECG con bloqueo completo de rama derecha del haz de His (BRDHH) o bloqueo incompleto de rama derecha del haz de His (BIRDHH) con crecimiento de ventrículo izquierdo o BIRDHH con bradicardia sinusal o fracción de expulsión de ventrículo izquierdo disminuida (FE). La distribución por sexo fue de 4 individuos del sexo femenino y 7 del masculino, las edades comprendidas en este grupo fueron de un individuo de 6 años y el resto entre 12 y 18 años; llama la atención el individuo VER CP-16 que a pesar de mostrar ECG con trazo normal, en el ECO mostró lesiones francas además de hipertensión pulmonar.

EDO. FOLIO	SEXO	EDAD	ELISA IF	ECG PRE-Tx. ECG POST-Tx.	TRATAMIENTO	ECOCARDIOGRAMA
VER CP-9	M	18	POSITIVO	BIRDHH, CRECIMIENTO DE VENTRICULO IZQUIERDO POST-Tx. MI SMOT RAZO	NIFURTIMOX BENZNIDAZOL	LESIONES FRANCAS HIPERTENSIÓN PULMONAR FE-BAJA
SLP 154	F	13	POSITIVO	BIRDHH BRADICARDIA SINUSAL	BENZNIDAZOL	LESIONES INCIPIENTES CON HIPERTENSION PULMONAL
SLP 318	M	15	POSITIVO	BIRDHH BRADICARDIA SINUSAL	BENZNIDAZOL	LESIONES FRANCAS
SLP 422	M	16	POSITIVO	BIRDHH BRADICARDIA SINUSAL	BENZNIDAZOL	LESIONES INCIPIENTES FE-BAJA
SLP M-37	M	14	POSITIVO	BRDHH	NO IDENTIFICADO	NORMAL
VER CP-16	M	17	POSITIVO	TRAZO NORMAL TRAZO NORMAL	NIFURTIMOX	LESIONES FRANCAS CON HIPERTOFIA E HIPERTENSIÓN PULMONAR
QRO 202	M	13	POSITIVO	BIRDHH TRAZO NORMAL	BENZNIDAZOL	LESIONES INCIPIENTES
QRO 432	M	15	POSITIVO	BIRDHH, SUGIERE CRECIMIENTO AURÍCULA DERECHO	BENZNIDAZOL	LESIONES FRANCAS FE-BAJA
SLP 157	F	12	POSITIVO	BIRDHH	BENZNIDAZOL	LESIONES FRANCAS FE-BAJA
SLP 991	F	16	POSITIVO	BIRDHH, BRADICARDIA	NO IDENTIFICADO	LESIONES FRANCAS HIPERTENSIÓN PULMONAR
SLP 1139	F	6	POSITIVO	BIRDHH NORMAL	BENZNIDAZOL	PARED POSTERIOR ENGROSADA

Tabla 10. Características del Grupo 3 NO IDENTIFICADO- Tratamiento sin la certeza de haber sido administrado. **PRE-TX-** Trazo obtenido antes del tratamiento. **POST-TX-** Trazo obtenido después del tratamiento. **FE-** Fracción de expulsión de ventrículo izquierdo menor al 55%.

DISTRIBUCION POR SEXO DE LOS GRUPOS

En la distribución por sexo de los casos, se observa incremento del sexo masculino en los individuos con manifestaciones severas y crónicas.

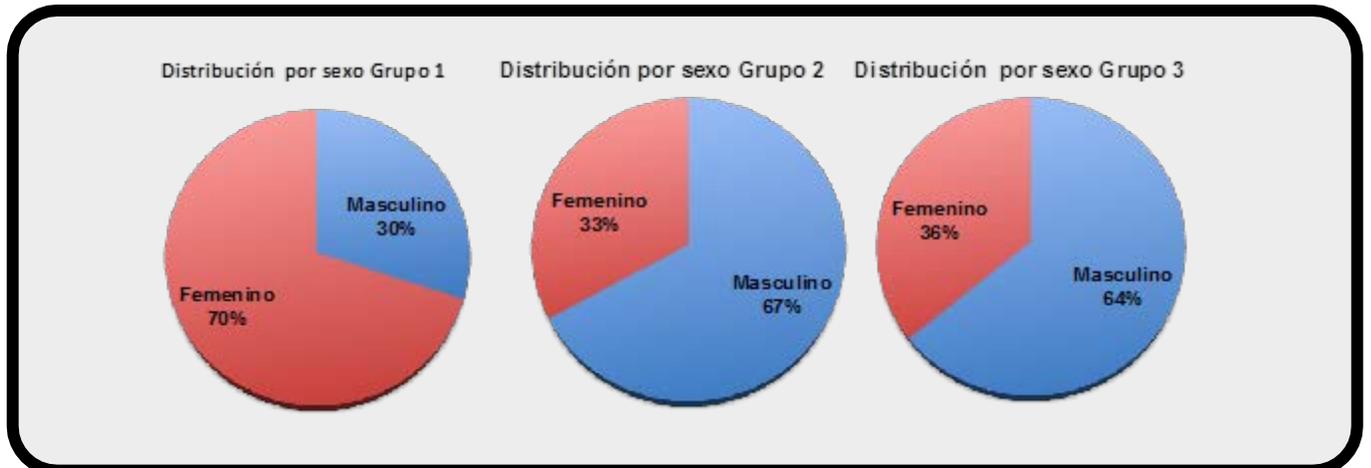


Figura 12- Porcentaje de la distribución por sexo de los casos.

ELECTROINMUNOTRANSFERENCIA DE LOS CASOS ESTUDIADOS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS INMUNODOMINANTES.

En la figura 13 se observan los componentes inmunodominantes en algunos de los individuos de los grupos estudiados (1, 2 y 3). Se observan 2 componentes con relevancia, uno de 45 kDa que se encuentra en todos los casos que presentan alteraciones en el ECG y el otro, de 38 kDa, altamente específico para determinar la infección por *T. cruzi*.

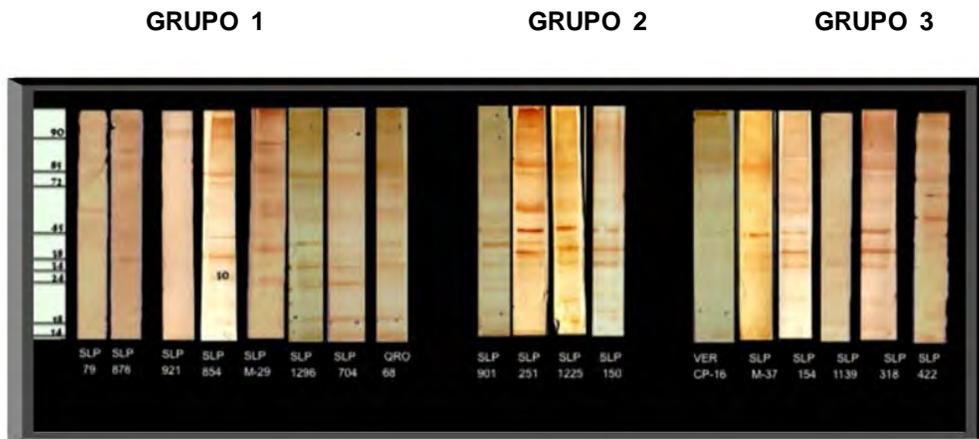


Figura-13-Componentes inmunodominantes de los pacientes.

SDS-PAGE al 10% en condiciones reductoras. Sueros en dilución 1:200. Revelado con 3,3' Diaminobenzidina

CONCENTRACIONES DE CITOCINAS EN INDIVIDUOS INFECTADOS CON *T. cruzi*

En la Figura 14 se observa que la concentración de las citocinas pro-inflamatorias IL-1 β (a1), IFN- γ (a2), TNF- α (a3), IL-6(a4), IL-8(a5), IL-2 (a7), IL-17(a9), IL-15(a8) y las quimiocinas IL-8 (a5), MIP-1 α (a6), en los pacientes infectados de los 3 grupos y de los controles seronegativos, donde se observa que los pacientes infectados muestran concentraciones incrementadas de estas citocinas en comparación con los sanos en quienes se aprecian lecturas muy bajas o cercanas al cero. Se realizó la prueba estadística de U-Mann Whitney donde se aprecia una diferencia estadística entre medianas $p < 0.0001$ en relación con controles sanos.

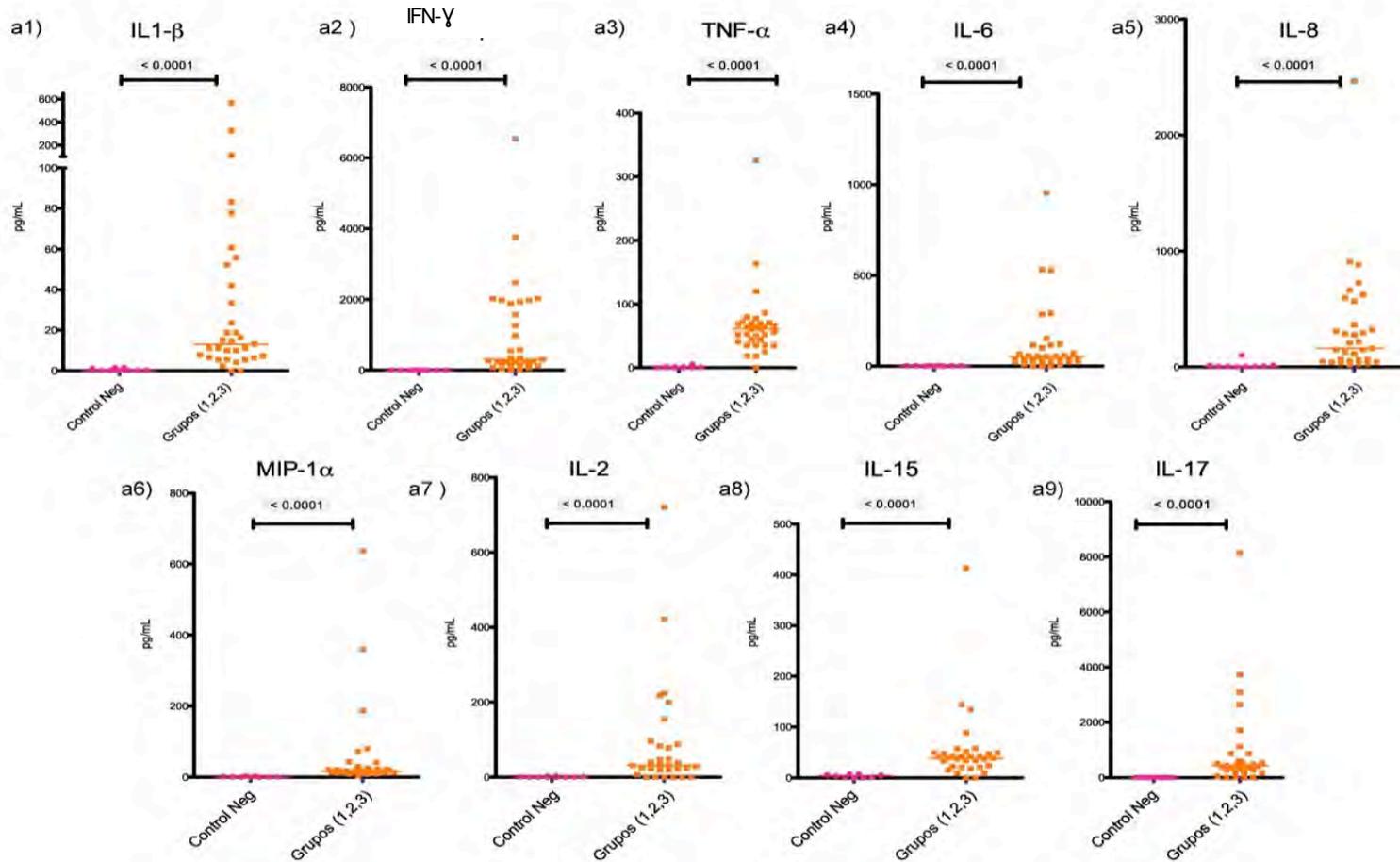


Figura 14- Gráficas a1)IL-1 β , a2)IFN- γ , a3)TNF- α , a4)IL-6, a5)IL-8,a6) MIP-1 α , a7)IL-2, a8) IL-15, a9) IL-17. Infectados con *T.cruzi* (■)-. Controles sanos - (●).Líneas horizontales – Valores de la mediana. Los valores de p son mostrados en la figuras.U-Mann Whitney $p \leq 0.05$. Se observa la mayor concentración en los individuos infectados con *T.cruzi*

En la Figura 15 se observa la distribución de la concentración de citocinas en los sueros de los pacientes infectados con *T. cruzi* de los grupos 1, 2 y 3 en comparación con los controles seronegativos a la infección en quienes se aprecian lecturas muy bajas o cercanas al cero. Se realizó el análisis de U-Mann Whitney donde se compararon las medianas encontrando una diferencia significativa < 0.0001 de las concentraciones de las citocinas anti-inflamatorias IL1RA, IL-13, TGF- β , IL-4, e IL-10 donde se observa un patrón incrementado de las mismas en los individuos infectados con *T. cruzi* respecto a los controles no infectados.

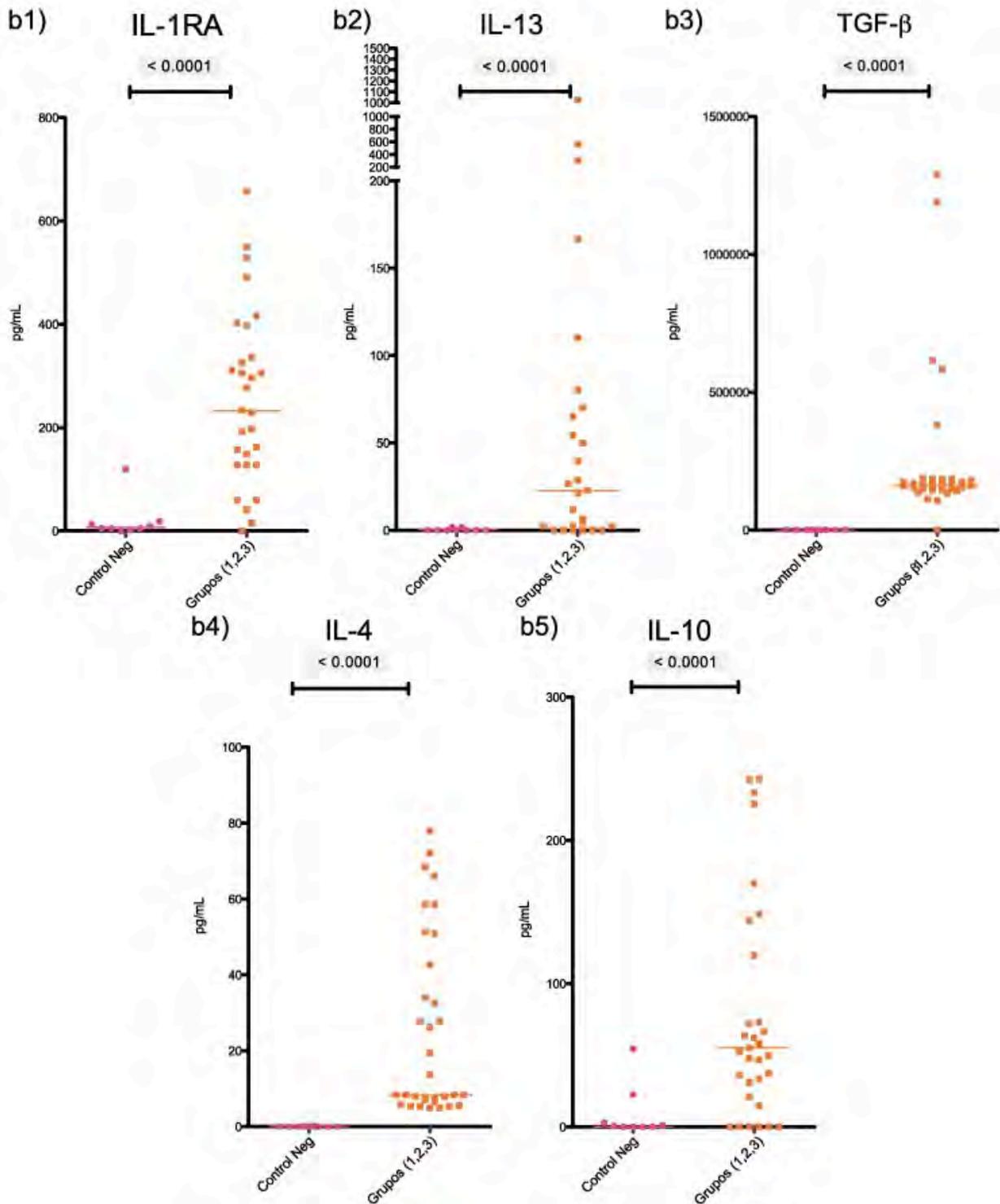


Figura 15- Graficas b1)IL1RA,b2)IL-13,b3)TGF- β , b4)IL-4, b5)IL-10. Infectados con *T.cruzi*(■)-. Controles sanos (●). Líneas horizontales - Valores de la mediana.Los valores de p son mostrados en la figuras.U-Mann Whitney $p \leq 0.05$. Se observa la mayor concentración en los individuos infectados con *T.cruzi*

COMPARACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE CITOCINAS ENTRE GRUPOS

En la caracterización clínica de los grupos en asintomáticos (Grupo 1), con lesiones incipientes (Grupo 2) y con lesiones francas (Grupo 3), se pueden apreciar niveles elevados en las citocinas pro-inflamatorias en el Grupo 3. El análisis estadístico de U-Mann Whitney muestra diferencia estadística en las medianas de las concentraciones en IFN- γ (c1), TNF- α (c2), IL-1 β (c3), e IL-6(c4).

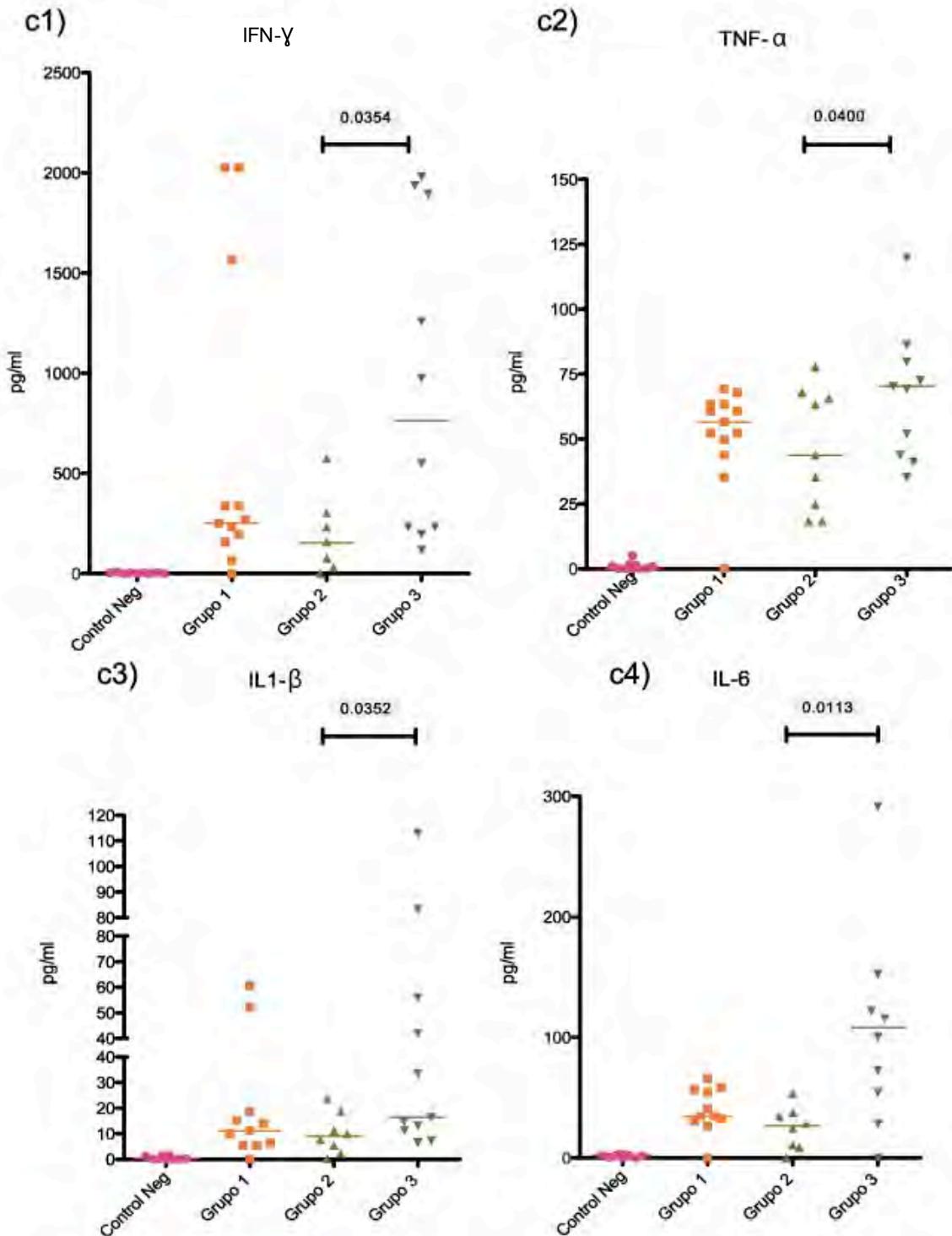


Figura 16- Graficas: c1) IFN- γ , c2) TNF- α , c3) IL-1 β , c4) IL-6 Control Negativo- (●). Grupo 1 (sin alteraciones) - (■). Grupo 2 (con BRDHH) - (▲). Grupo 3 (con BRDHH o BIRDHH con otras alteraciones) - (▼). Líneas horizontales -Mediana.
 Los valores de *p* son mostrados en la figuras. U-Mann Whitney $p \leq 0.05$. Observándose mayor concentración en la concentración de las citocinas pro-inflamatorias en el grupo 3.

Adicionalmente, se observó un incremento de la concentración de IL-2 (d1) con diferencia estadística, particularmente en el Grupo 3. No se observaron diferencias significativas en los niveles de IL-8, IL-17, IL-15 y MIP-1 α entre los diferentes grupos de pacientes.

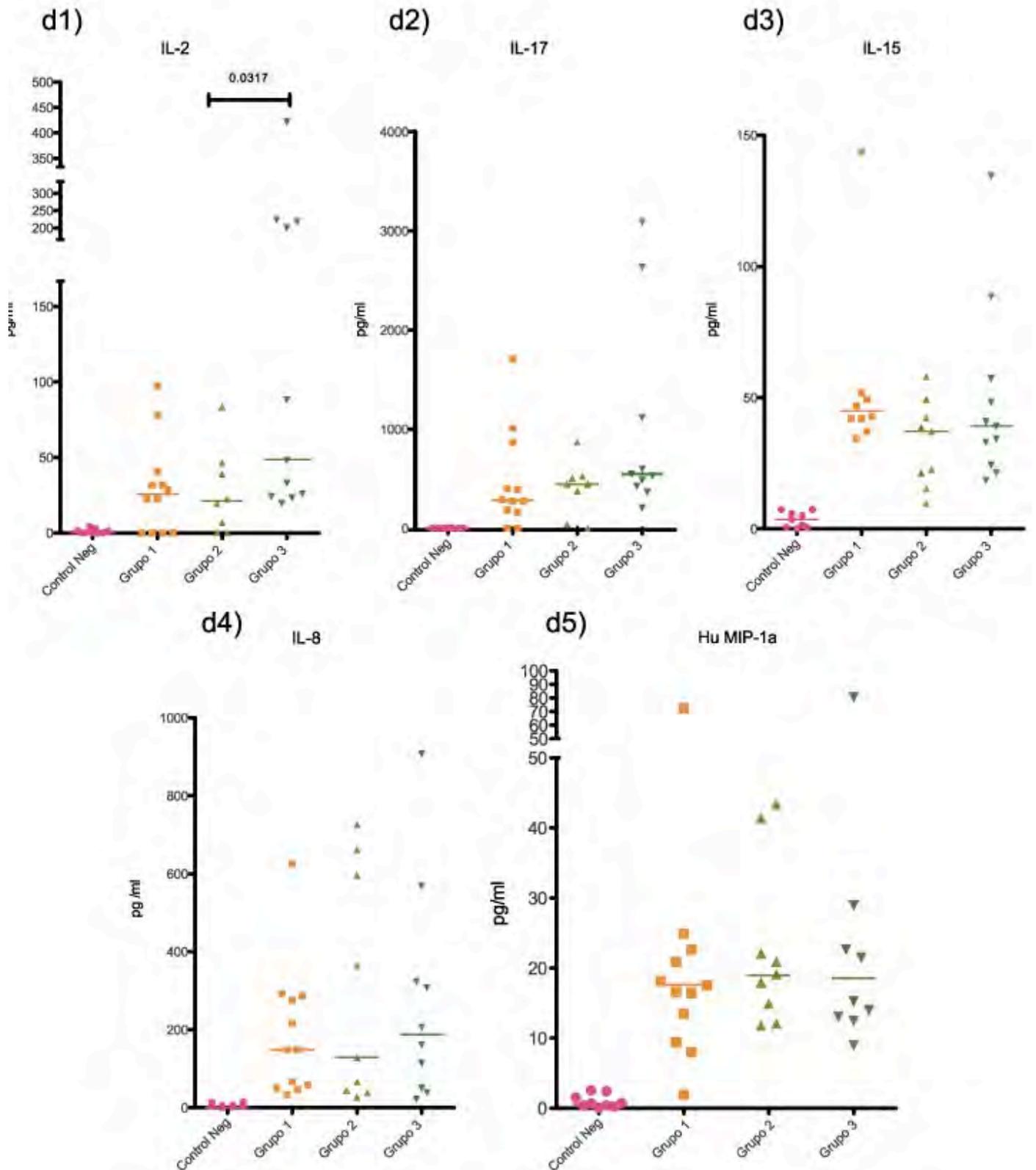


Figura 17 Graficas: d1) IFN- γ , d2) TNF- α , d3) IL-1 β , d4) IL-6 d5) MIP-1 α . Control Negativo- (●). Grupo 1 (sin alteraciones) - (■). Grupo 2 (con BIRDHH) - (▲). Grupo 3 (con BRDHH o BIRDHH con otras alteraciones) - (▼). Líneas horizontales - Mediana. Los valores de P son mostrados en las figuras. U-Mann Whitney - $P \leq 0.05$.

En la caracterización clínica de los grupos en asintomáticos (Grupo 1), con lesiones incipientes (Grupo 2) y con lesiones francas (Grupo 3), se puede apreciar que las citocinas anti-inflamatorias, especialmente en el Grupo 3 presentan un incremento en la concentración de las mismas, excepto TGF- β el cual muestra una concentración similar entre grupos; por otro lado, se destaca que mediante el análisis de U-Mann Whitney se encontró diferencia estadística en las medianas de las concentraciones de IL-10 (e2) entre los pacientes de los grupos 2 y 3.

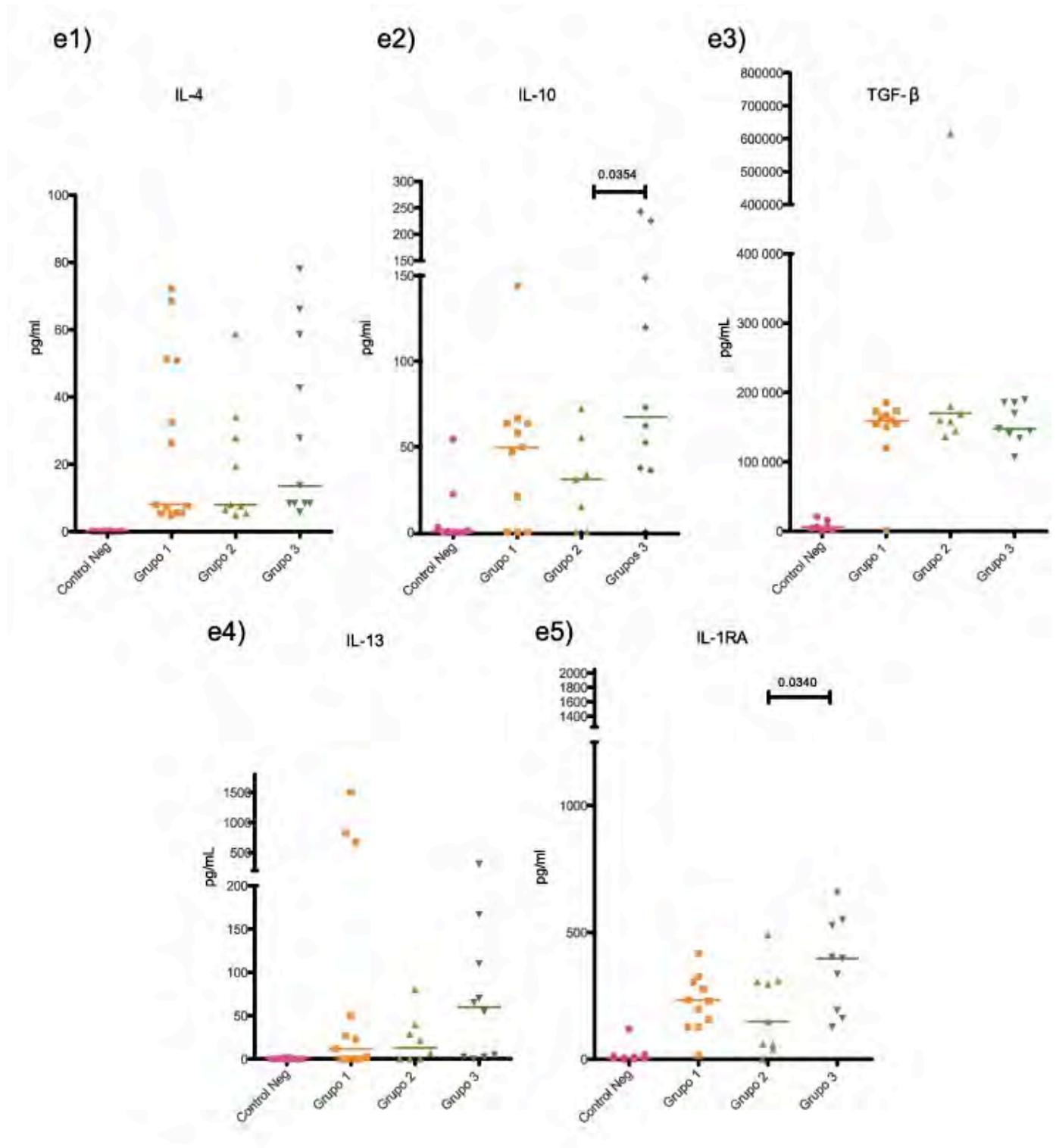


Figura 18-Graficas: e1) IL-4, e2)IL-10, e3)TGF- β , e4) IL-13 e 5) IL-1RA Control Negativo- (●). Grupo 1 (sin alteraciones) - (■). Grupo 2 (con BIRDHH) - (▲). Grupo 3 (con BRDHH o BIRDHH con otras alteraciones) - (▼). Líneas horizontales - Mediana. Los valores de *p* son mostrados en la figuras. U-Mann Whitney $p \leq 0.05$. Observándose mayor concentración en las citocinas IL-10, IL1RA en el grupo 3.

EFFECTO DEL TRATAMIENTO EN ESPECÍFICO ANTI-PARASITARIO EN LAS CONCENTRACIONES DE CITOCINAS

Adicionalmente, se compararon los niveles de citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento en muestras obtenidas antes y después de la terapia antiparasitaria específica, de los 3 grupos estudiados; al respecto, se encontró disminución en la concentración de las citocinas IFN- γ , TNF- α , e IL-15 con U-Mann Whitney diferencia estadística entre medianas del grupo de pacientes tratados respecto a los no tratados.

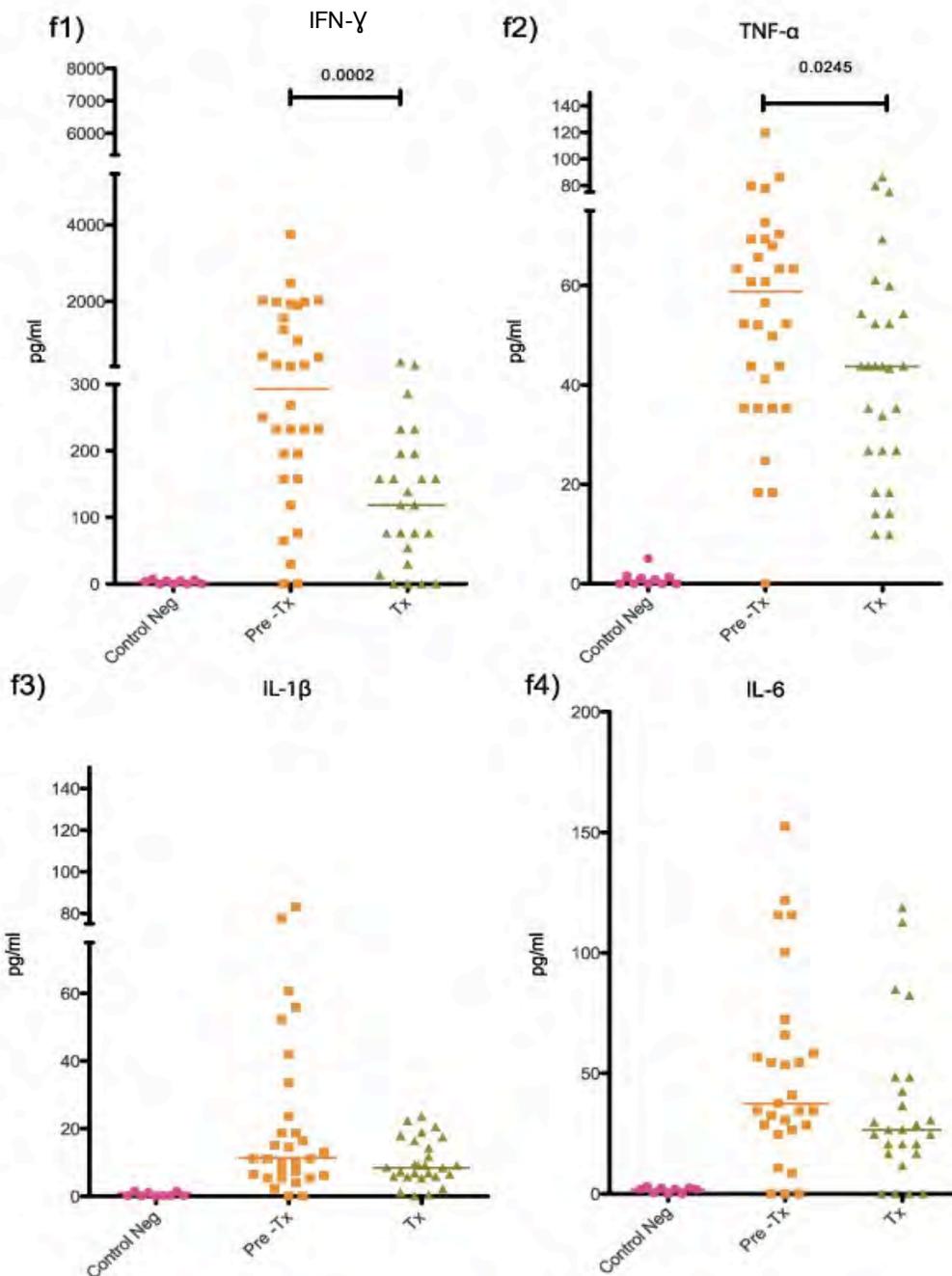


Figura 19- Graficas: f1) IFN- γ , f2) TNF- α , f3) IL-1 β , f4) IL6. Control Negativo- (●).Pre Tx- Antes del tratamiento (■) Tx- después del tratamiento (▲). Líneas horizontales -Mediana. Los valores de p son mostrados en la figuras. U-Mann Whitney $p \leq 0.05$. Observándose una disminución de la concentración de las citocinas IFN- γ e TNF- α , en los pacientes tratados

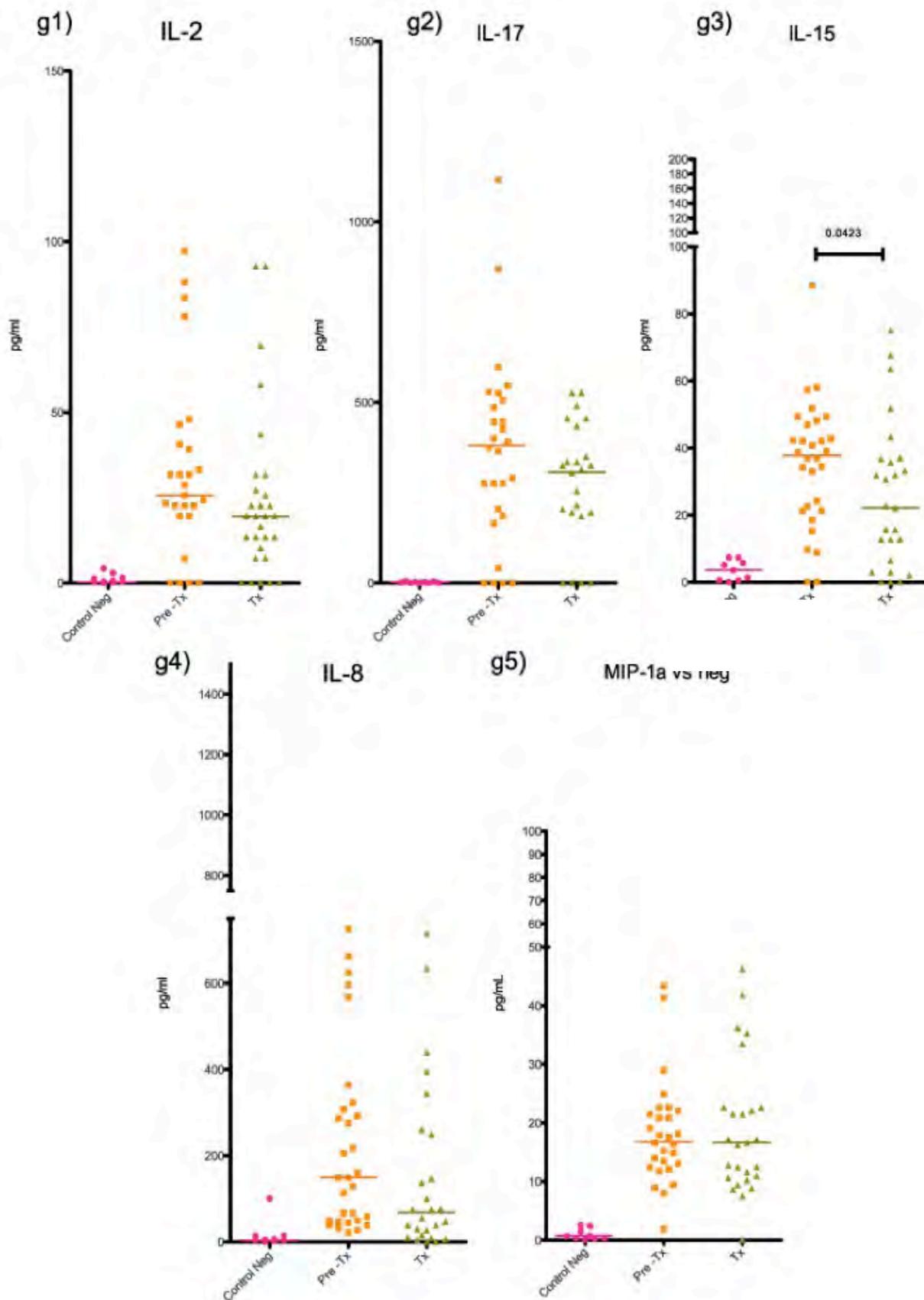


Figura 20-Gráficas: g1) IL-2, g2) IL-17, g3) IL-15, g4) IL-8, g5) MIP-1a. Control Negativo- (●). Pre Tx- Antes del tratamiento (■) Tx- después del tratamiento (▲). Líneas horizontales - Mediana. Los valores de p son mostrados en las figuras. U-Mann Whitney $p \leq 0.05$. Observándose una disminución de las citocinas en los pacientes tratados excepto en MP-1a.

También se observaron menores concentraciones de citocinas anti-inflamatorias como IL-1RA, IL-4 e IL-10 en los pacientes después del tratamiento. No se observaron cambios significativos en los niveles de, TGF- β e IL-13 en relación con el uso de tratamiento.

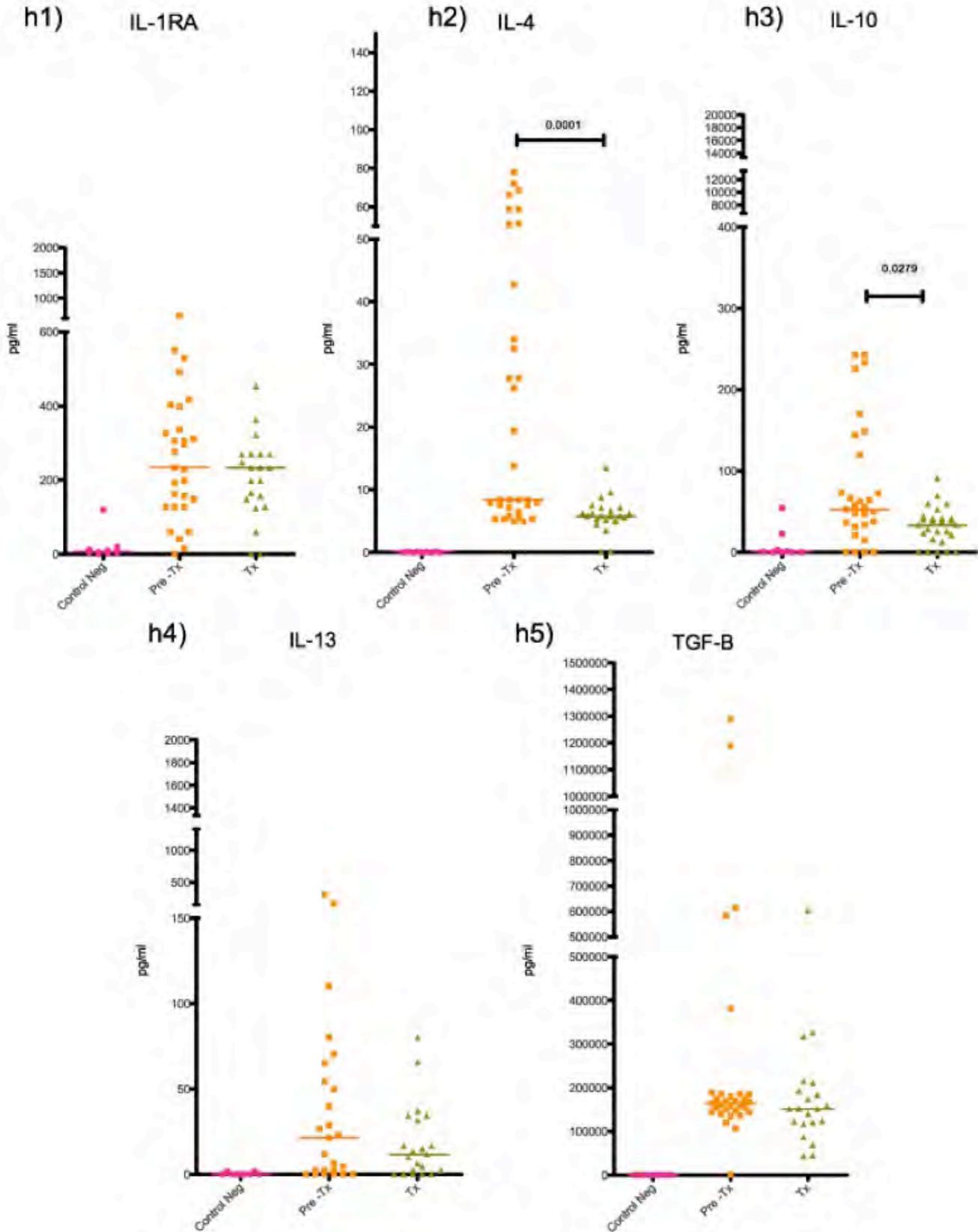


Figura 21-Graficas: h1) 1RA, h2) IL-4, h3)IL-10, h4) IL-13, h5) TGF- β .Control Negativo- (●).Pre Tx- Antes del tratamiento (■) Tx- después del tratamiento (▲).Líneas horizontales - Mediana.Los valores de p son mostrados en la figuras. U-Mann Whitney $p < 0.05$. Observandose una disminución de las citocinas IL-4 e L-10 en los individuos tratados.

ANÁLISIS COMPARATIVO DE CITOCINAS ESTADÍSTICOS ENTRE GRUPOS

	Grupo 1 n=13	Grupo 2 n=9	Grupo 3 n=11 ¹	Valor de P Grupo 2 vs 3	% De aumento entre Grupos 2 y 3
Edad	(7-15)	(9-18)	(6-18)		
Sexo F/M	9 /4	3 /6	(4/7)		
IgG anti T. cruzi (D.O)	[.259- .198]	[.198-.331]	[.184-302]		
PROINFLAMATORIAS					
IFN-γ	259.5	157.8	763.4	<u>0.0354</u>	383.78
TNF-α	56.55	43.79	70.36	<u>0.0400</u>	60.68
IL-1β	11.19	8.82	16.38	<u>0.0352</u>	85.71
IL-6	34.57	26.64	108.1	<u>0.0113</u>	305.78
IL-8	149.1	128.9	183.7	0.9349	42.51
MIP-1α	17.53	19.09	18.36	0.9048	3.8
IL-2	25.73	21.19	48.02	<u>0.0317</u>	126.62
IL-15	44.88	37.03	39.09	0.3821	5.56
IL-17	282.4	445.8	538	0.0789	20.68
ANTI INFLAMATORIAS					
IL-1RA	229	148.3	397.9	<u>0.0340</u>	168.31
IL-4	7.96	7.96	13.77	0.1695	72.99
IL-10	49.7	30.98	67.66	<u>0.0354</u>	118.40
IL-13	11.78	13.94	59.84	0.1416	329.27
TGF-β	5237	160125	168824	.2508	5.43

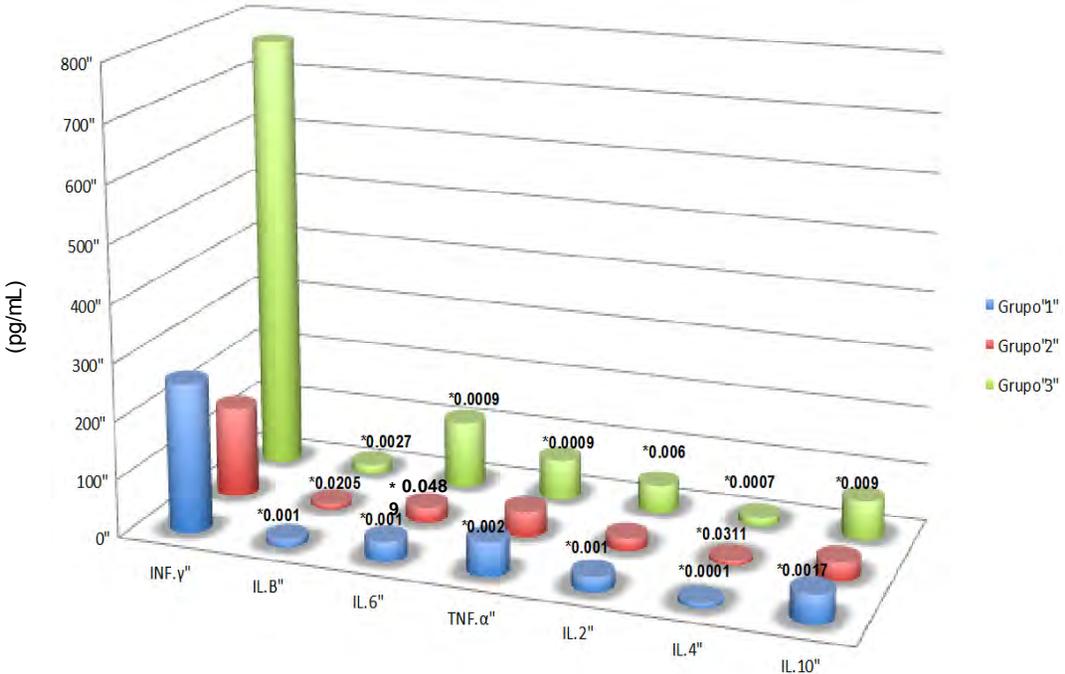
Tabla 11- Medianas de grupos. Los valores de p obtenidos a través de U-Mann Whitney $p \leq 0.05$

**ANÁLISIS COMPARATIVO DE CITOCINAS ENTRE PACIENTES
TRATADOS Y NO TRATADOS**

	TRATADOS	MEDIANA NO TRATADOS	VALOR DE P	% DE DISMINUCION
PROINFLAMATORIAS				
IFN-γ	118.3	286.0	<u>0.0002</u>	58.63
TNF-α	43.79	54.42	<u>0.0245</u>	19.53
IL-1β	8.620	11.19	0.1571	22.96
IL-6	26.64	36.06	0.0610	26.12
IL-8	65.45	149.1	0.0535	56.10
MIP-1α	16.57	17.05	0.8862	2.81
IL-2	19.66	25.74	0.1295	23.62
IL-15	22.36	37.83	<u>0.0423</u>	40.89
IL-17	305.0	382.8	0.1018	20.
ANTI-INFLAMATORIAS				
IL-1RA	233.2	233.7	.3250	0.21
IL-4	5.820	8.370	<u>0.0001</u>	30.46
IL-10	33.58	52.45	<u>0.0279</u>	35.97
IL-13	11.78	21.40	0.4377	44.95
TGF-β	151472	164120	0.2514	7.70

Tabla 12- Medianas de citocinas encontradas entre pacientes tratados y no tratados. Los valores de p obtenidos a través de U-Mann Whitney $p \leq 0.05$

Al comparar las concentraciones y medianas de las citocinas encontradas con diferencia estadística, según se observa en la siguiente Gráfica 1, el Grupo 3, presenta mayor concentración de las citocinas pro-inflamatorias IFN- γ , IL-6, TNF- α e IL-2, en de sus antagonistas anti-inflamatorias IL-4, e IL-10. Se encontraron las elevadas concentraciones del IFN- γ con respecto a TNF- α , IL-2, IL-4 e IL-10 con diferencia estadística (Gráfica 1). En el Grupo 2 se presenta menor concentración de citocinas, diferencia estadística encontrada en IFN- γ comparado con IL-1 β IL-6 e IL-4. Respecto al Grupo 1, se aprecian concentraciones elevadas de IFN- γ con diferencia estadística con todas las citocinas TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-2, IL-4 e IL-10. Los valores de las medianas se presentan en la tabla 13.



	Grupo 1 n=13	Grupo 2 n=9	Grupo 3 n=11
IFN- γ	259.5	157.8	763.4
TNF- α	12.62	8.82	16.38
IL-1 β	34.57	26.64	115.8
IL-6	58.67	43.79	70.36
IL-2	25.73	21.19	48.02
IL-4	7.96	7.96	13.77
IL-10	49.7	30.98	67.66

Tabla 13- Medianas de citocinas encontradas con diferencia estadística entre grupos.

Gráfica 1- Comparación de la concentración de citocinas encontradas con diferencia (pg/mL) IFN- γ , IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-2, IL-1RA, IL-4 e IL-10. Valores de U-Mann Whitney - $P \leq 0.05$. Los individuos con manifestaciones severas del grupo 3 muestran un incremento en la respuesta inflamatoria, principalmente de IFN- γ en comparación con la respuesta de sus antagonistas IL-10 y IL-4.

DISCUSIÓN

La enfermedad de Chagas tiene dos fases clínicas: la fase aguda y la fase crónica. La fase crónica se divide en crónica asintomática y sintomática. La fase crónica sintomática se caracteriza fundamentalmente por compromiso cardíaco o digestivo, generando los mega-síndromes. En México, el compromiso cardíaco es prevalente en los infectados por *T. cruzi*. Actualmente continúan en debate las variables que inducen que algunos individuos infectados con *T. cruzi*, el 70%, permanezcan asintomáticos y sólo el 30% de los infectados desarrollen la fase crónica sintomática (26). Análisis *in vitro* y en modelo animal proponen que las citocinas desempeñan un papel fundamental en la respuesta inmune contribuyendo a la progresión durante la fase crónica de la enfermedad. Araujo y Dutra en 2008 (53) (74), plantean que es importante conocer el papel de las citocinas durante la infección-enfermedad en humanos, principalmente en las fases crónicas incipientes y severas. Existe escasa información sobre el papel de las citocinas en la fase crónica de la enfermedad en niños y jóvenes menores de 18 años por lo que es importante comprender el impacto del tratamiento en el sistema inmunológico de los pacientes en la enfermedad de Chagas (61).

Por lo anterior, en este estudio se propuso medir la concentración de citocinas en individuos mexicanos menores de edad infectados con *T. cruzi* en fases tanto asintomática como crónica. Se obtuvieron tres grupos de estudio que fueron clasificados por los resultados del electrocardiograma y del ecocardiograma. El Grupo 1, fue clasificado como crónico asintomático (13 individuos), con un trazo electrocardiográfico normal y un ecocardiograma normal. Estos individuos son el grupo que representa el 70% mencionado de pacientes con infección pero sin manifestaciones patológicas. El Grupo 2, refirió a individuos crónicos sintomáticos incipientes (9 individuos). Estos pacientes muestran BIRDHH en su electrocardiograma y un ecocardiograma con lesiones incipientes. Finalmente el Grupo 3, comprende a los individuos crónicos sintomáticos severos (11 individuos) con electrocardiograma con BIRDHH o BRDHH y con un ecocardiograma con lesiones francas. Estos dos últimos representan el 30% de las estadísticas anteriormente señaladas como individuos crónicos con patología incipiente y severa (75).

Como se presenta en los resultados, los grupos sintomáticos tanto incipientes como severos (Grupos 2 y 3) están compuestos en su mayoría por individuos del sexo masculino (Figura 12).

En la epidemiología de esta enfermedad, se ha observado que, si bien en los individuos del sexo femenino muestran prevalencias más elevadas de infección, que en individuos del sexo masculino. Esto ha sido señalado en estudios en modelo de ratón al comparar en machos y hembras infectados los efectos de la progesterona y testosterona, en los cuales concluye que los machos presentan mayor mortalidad (76). Esta relación se confirma en casos humanos por la Secretaría de Salud, la cual en 2012 notifica 447 casos (62%) del sexo masculino y 269 (38%) del femenino (78).

Por otro lado, en otros estudios clínicos y de laboratorio se sugiere que las mujeres, al ser expuestas a algún antígeno, muestran mayor cantidad de inmunoglobulinas y a que su respuesta inflamatoria es mayor que la de los hombres, lo cual las hace más propensas a enfermedades autoinmunes (77). Esto es importante ya que al montar una respuesta inflamatoria mayor, las pacientes tienen la capacidad de eliminar al parásito en fase aguda y no progresar a fase crónica.

En el primer análisis de concentración de citocinas en suero se compararon los tres grupos contra los pacientes sanos. Nuestro primer hallazgo relevante fue encontrar que todos los individuos con anticuerpos *anti-T.cruzi* tienen niveles más elevados de las citocinas pro-inflamatorias IL-1 β , IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-6, IL-17 y también de citocinas anti-inflamatorias IL-4, IL-10, IL-13, TGF- β y quimiocinas IL-8, MIP-1 α , en relación con los controles sanos. La presencia de citocinas proinflamatorias ha sido descrita en la fase aguda, ayudando en la eliminación del parásito por medio de la activación de células fagocíticas citotóxicas (CD8+) y NK (37). Estas citocinas también han sido descritas en la fase crónica, contribuyendo a la patología de la enfermedad (51). La presencia de las citocinas anti-inflamatorias puede ser resultado tanto de un proceso de control de la respuesta inflamatoria propiciada por el huésped o de un proceso de regulación por parte del parásito, como se ha descrito en la fase aguda de la enfermedad de Chagas (30).

Los pacientes del Grupo 3 mostraron diferencia estadística y concentraciones elevadas de mediadores inflamatorios IFN- γ , TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-2 en comparación con el Grupo 2 (hasta 79% de aumento), así como de citocinas anti-inflamatorias IL-10 e IL-1RA (hasta 62.72% de aumento). Estos mediadores inflamatorios inician en la fase aguda y persisten durante la fase crónica, y son de fundamental importancia en la presentación y progresión de la insuficiencia cardíaca en la enfermedad de Chagas y en otras cardiopatías (83).

El IFN- γ es considerado el mecanismo central para una respuesta eficaz al inicio de la infección. En esta fase las células fagocíticas son activadas por el IFN- γ , el cual activa la sintetasa inducible de óxido nítrico de macrófagos (iNOS). Esta activación estimula la lisis parasitaria intracelular (38), al inducir la producción de óxido nítrico (NO) en macrófagos para iniciar el control de la parasitemia sanguínea durante la fase aguda asintomática (42). Esto puede relacionarse con la alta concentración de IFN- γ en individuos del Grupo 1. Sin embargo, altos niveles de esta citocina en individuos del Grupo 3 tiene repercusión a nivel de miocardio. Su expresión se asocia a susceptibilidad en la fase crónica asintomática (43) al inducir una respuesta celular TH1 citotóxica que produce daño crónico cardíaco, el cual está referido por medio del ECG y ECO presente en este grupo.

El TNF- α genera intermediarios reactivos del oxígeno, induce la deposición de la matriz extracelular y generando necrosis y apoptosis de cardiomiocitos (80, 81). Por otro lado, se ha visto que esta citocina muestra un efecto en cascada para la expresión de IL-6. Se han identificado niveles altos de estas dos citocinas en casos severos de cardiopatías crónicas por lo que se ha señalado a IL-6 como un marcador eficiente de nuevos episodios de falla cardíaca (82). Niveles altos de IL-8 se han descrito en otras cardiopatías con isquemia del miocardio y se asocia a esta citocina como un factor atrayente de plaquetas que induce la coagulación y causa trombosis microvascular (83,35). Aunado a esto la hipertrofia descrita en los pacientes con Chagas, se ha asociado a la presencia de IL-1 β , que induce unos péptidos que desregulan la osmosis celular en miocardio (105). Finalmente, IL-2 ha sido relacionada activamente con activación anormal de linfocitos T en otras miocardiopatías dilatadas (83). No se encontraron diferencias estadísticas en el Grupo 1 (asintomáticos) donde se puede suponer que se trata de individuos con lesiones tisulares pequeñas, no detectables, o bien, con infección reciente.

La fibrosis es un proceso importante en la fase crónica de la enfermedad, donde el TGF- β , descrito fundamentalmente como profibrótico está elevado en todos los pacientes infectados con *T. cruzi* en comparación con el grupo control. En la literatura, se menciona que tanto TGF- β y IL-10 son importantes reguladores entre el efecto inductor de lisis del parásito y el inicio del daño tisular de la respuesta Th1 en la infección disminuyendo la activación de las células fagocíticas (88) es bien sabido que TGF- β y IL-13 (84) se relacionan con la severidad de la disfunción cardíaca directamente en forma importante por la fibrosis degenerativa que inducen, lo que ocasiona trastornos tanto en la motilidad como en el crecimiento de las cavidades, otras citocinas profibrogénicas encontradas con patrón incrementado en los pacientes del Grupo 3 fueron la IL-1 β , IL-13 y MCP-1 sin diferencias estadísticas entre grupos de infectados, a diferencia de TNF- α , también profibrogénica, que sí mostró diferencia estadística entre grupos; sin embargo, la presencia de TGF- β , sin diferencia entre grupos puede indicar que existe desde la infección hasta el desarrollo de los procesos fibróticos activos (53, 85). El hecho de que no se encuentre diferencia entre grupos puede deberse a que estos pacientes tienen una fibrosis incipiente, lo cual se correlaciona con las lesiones encontradas en los estudios de ECG y ECO en los grupos 1 y 2, también cabe descartar que la presencia de esta molécula en enfermedad de Chagas es descrita como mal pronóstico y un factor para iniciar la fase crónica de la enfermedad (53).

Las evidencias de daño incipiente y franco en los grupos 2 y 3, detectadas con los estudios de ECO, se asocian principalmente con hipertrofia del septo interventricular y de la pared posterior de ventrículo izquierdo, que son consecuencia de los procesos inflamatorio y fibrótico propiciado por citocinas inflamatorias (TNF- α , IL-6, IFN- γ , IL-8 e IL-2) y profibroticas (TGF- β y TNF- α , MIP-1 α , IL-8 e IL-13) implicadas en la deposición de la matriz extracelular y procesos fibróticos; este proceso genera motilidad a normal de las cavidades con deterioro de la función cardíaca; el otro parámetro

analizado es la fracción de expulsión del ventrículo izquierdo, la cual es un indicador bien conocido que valora la función cardíaca global y que en los casos del Grupo 3 se aprecia baja como consecuencia del proceso descrito anteriormente y que es considerado de importancia para valorar el deterioro progresivo que se presenta en estos casos (86). En algunos de los casos del Grupo 3 existe hipertensión pulmonar, lo que podría deberse a la afectación de la circulación microvascular por incremento de la agregación plaquetaria y en la adhesión al endotelio, lo que ocasiona trombosis plaquetaria con isquemia en miocardio y a nivel pulmonar estos son efectos que se han asociado a la presencia de IL-8 (83).

La fibrosis miocárdica, también ha sido involucrada en la génesis de las taquiarritmias (taquicardia ventricular o fibrilación), principales causas de muerte súbita en pacientes chagásicos crónicos; esta fibrosis, además bloquea el impulso cardíaco, disminuyendo la velocidad de la conducción y los septos de colágeno entre los haces musculares podrían interferir con la conducción del impulso eléctrico generando las manifestaciones encontradas en el ECG como son los Bloqueos de Rama derecha de Haz de His.

La respuesta anti-inflamatoria, se encontró incrementada y con diferencia estadística en las citocinas IL-10, e IL-1RA en los pacientes del Grupo 3; al respecto, es bien sabido, que altas concentraciones de estas, son necesarias para la regulación de la inflamación, limitando la señal inflamatoria e inhibiendo la respuesta celular de monocitos y macrófagos, así como al inhibir la acción de TNF- α e IL-6 en un inicio de la infección (87). Algunos autores mencionan que *T. cruzi*, por medio de los TLRs es capaz de inducir la respuesta anti-inflamatoria ya que algunas moléculas de superficie como las glicoproteínas tienen la capacidad de inducir expresión de citocinas tanto por como anti-inflamatorias por medio de su interacción con los TLRs. En este estudio las citocinas como IL-10 y TGF- β son inducidas mediante estos mecanismos y al aumentar la expresión de estas citocinas en macrófagos se disminuye la respuesta contra el parásito y por consiguiente, se continúa la replicación de *T. cruzi* en los tejidos (87, 88). De Melo en 2012, reporta que IL-4 puede ser inducida por el parásito y desencadenar funciones inmunosupresoras sobre el IFN- γ , inhibiendo la acción anti-*T. cruzi* de los fagocitos, principalmente macrófagos (65); por lo tanto, la presencia de IL-10 e IL-4 en los pacientes del Grupo 3 puede deberse a una regulación propiciada por el parásito actuando a favor de sus procesos replicativos, este mecanismo de replicación contribuye al daño característico de la fase crónica (89) y también a la necesidad de regular la respuesta inflamatoria generada directamente por el paciente (90).

En los individuos del Grupo 3, también fue encontrada IL-1 β con diferencia estadística y en altas concentraciones en relación con el Grupo 2. IL-1 β tiene actividad profibrogénica y en conjunto con IL-6, ha sido relacionada con alteraciones del endotelio vascular en regiones donde se encuentra disfunción miocárdica, mediante mecanismos inductores de apoptosis (35). Por otro lado su

antagonista, IL-1RA, fue encontrada con diferencia estadística y en altas concentraciones con el Grupo 2. IL-1RA ha sido asociada en enfermedades cardíacas crónicas con necrosis del miocardio de otras etiologías no chagásicas (91). En este caso se podría suponer que IL-1RA, junto con la presencia de IL-8, está generando en estos pacientes procesos isquémicos que provocan microinfartos con necrosis del miocardio, lo cual repercute en las alteraciones de engrosamiento parietal descritas anteriormente como hallazgos del ECO.

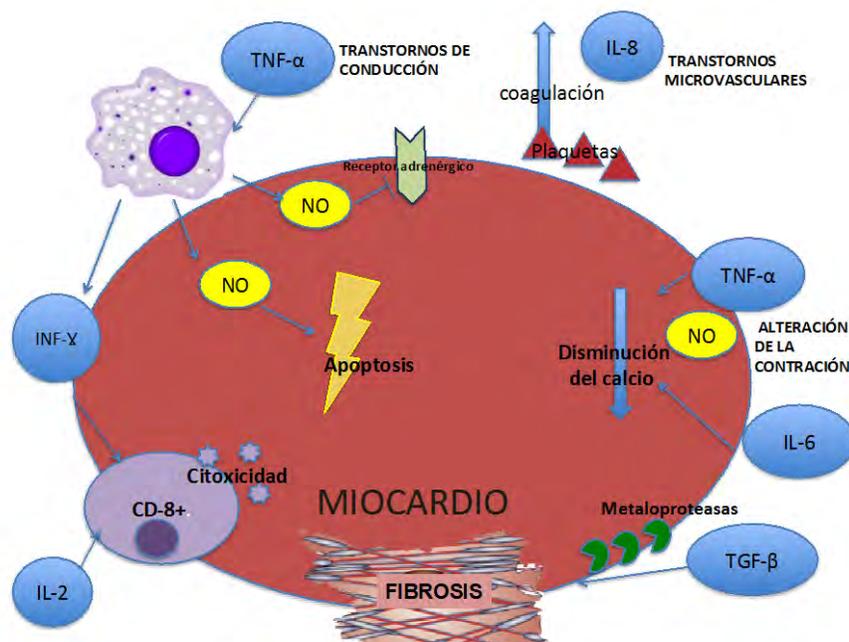


Figura 22- Acción de las citocinas presentes en los casos de miocardiopatía por *T. cruzi*.

En los casos estudiados en este trabajo, los parámetros del ECO valoran engrosamiento de las paredes del ventrículo izquierdo y del septo interventricular; estas manifestaciones presentes en algunos casos del Grupo 2 y de casi todos los del Grupo 3, son consecuencia del proceso fibrótico e inflamatorio, que ha sido descrito por algunos autores, a nivel de la respuesta inmune celular; llamada hipersensibilidad retardada tipo IV, en donde después de un segundo reto antigénico, los linfocitos T y citocinas de tipo TH1 inducen un proceso inflamatorio, ante la exposición repetida a antígenos del parásito y antígenos con reactividad cruzada. Lo anterior activa las células T de

memoria e induce la maduración para la infiltración de mononucleares al sitio de inflamación crónica al inducir lesiones fibróticas (35,92,93,94,95).

Respecto a la terapia anti-parasitaria aplicada, se observó una evidente disminución en la concentración de las citocinas después de la terapia antiparasitaria tanto pro como anti inflamatorias con disminuciones hasta del 58.63% (tabla 12). La disminución de la concentración de las citocinas IFN- γ (58%) y TNF- α (19%), IL-6 (26%), IL-8 (65%) estas últimas 2 sin diferencia estadística, impacta directamente sobre la respuesta Th1 que generan estas citocinas y su relación con la patología de la enfermedad de Chagas; en el caso de la disminución IL-15 (40%) con diferencia estadística, puede impactar a nivel de los procesos de autoinmunidad relacionados con la estimulación de los linfocitos T, ya que la IL-15 puede mantener activas poblaciones de células T y NK en ausencia de estimulación antigénica (54); también se encontró disminución en IL-4 (30%) e IL-10 (35%) que acompañadas de las citocinas anteriormente mencionadas, han sido reportada en la literatura principalmente con la terapia de Benznidazol. Se ha reportado que el Benznidazol tiene influencia directamente en la expresión de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) por medio de la inhibición de NFK- β en los macrófagos (96), además de los efectos que realiza directamente sobre el parásito (36), Sathler-Avelar, en 2012 identifica previamente en menores de edad, una notable disminución después del tratamiento, de IL-12 e IL-10, estas concentraciones obtenidas directamente de células CD4, así como bajos niveles de IFN- γ , proveniente de células NK y bajos niveles de TNF- α y de IL-10 proveniente de células B, respecto a un grupo de pacientes no tratados. Con base en lo anterior, se puede apreciar que existe una regulación a la baja o una disminución en la respuesta inmune innata y adaptativa después del tratamiento que se refleja en la disminución de la concentración de estas citocinas, este proceso puede ser de buen pronóstico al prevenir el daño cardíaco propiciado por las citocinas (97), lo cual impacta positivamente a los pacientes del Grupo 2 y 3 para que no se continúen la severidad de sus lesiones.

Las respuestas inflamatoria y anti-inflamatoria en los individuos con manifestaciones severas muestran disminución con incremento en la respuesta inflamatoria, principalmente de IFN- γ en altas concentraciones en comparación con sus antagonistas, básicamente IL-10 e IL-4 (Grafica 1), lo anterior sido descrito como una desregulación del proceso inflamatorio y progresión de esta respuesta con un incremento perfil de citocinas inflamatorias de tipo Th1 con poca cantidad de IL-4 e IL-10 lo que genera (52) la falta de control de estas citocinas pro-inflamatorias y profibróticas en fase crónica, repercute clínicamente en estos individuos y como se puede observar en la gráfica 1, la concentración de citocinas anti-inflamatorias es menor, por lo que esta respuesta inflamatoria no es suficiente para regular la respuesta del IFN- γ , estos pacientes al mostrar claramente el desequilibrio entre ambas respuestas, al focalizarse en una continua respuesta inflamatoria condicionan procesos crónicos y progresivos con mal pronóstico clínico. En el caso de Grupo 2

podemos observar una menor concentración de todas las citocinas comparadas en relación con los grupos 1 y 3. Lo anterior se ha descrito como un proceso de inmunosupresión que generalmente se da en fase aguda. Cabe destacar que estos individuos están incipientes, con lo cual suponemos la presencia de IL-2, que puede estar limitando la respuesta inmune como se ha descrito en la literatura (45, 46) ya que mantiene la homeostasis en la respuesta inmune controlando la expansión clonal al inducir apoptosis por señalización (vía *Fas/FasL*). Esta función podría ser el mecanismo responsable de la inmunosupresión observada.

La evolución clínica de los individuos infectados es de gran interés, ya que no existen aún, marcadores que nos puedan predecir o esclarecer este proceso. Estos resultados sugieren que la etiología de las lesiones en los pacientes del Grupo 3, está asociada a mayores niveles de IFN- γ , TNF- α , IL-6, IL-2, IL-1RA e IL-10 por lo cual, su presencia y concentración, puede utilizarse como marcadores de daño incipiente o de progresión en la enfermedad de Chagas; respecto a los perfiles de la electroinmunotransferencia en los casos estudiados se aprecian componentes glicoproteicos relevantes, de 34 y 38 k Da; respecto a lo cual se puede determinar infección por *Trypanosoma cruzi* y que al incrementar el número de casos, se podría determinar según la fase clínica, alguno asociado a la presencia de lesiones incipientes o severas que aunado a las concentraciones de citocinas permitiría desarrollar marcadores biológicos para el seguimiento de estos casos y determinar evolución clínica, pronóstico y eficacia terapéutica.

CONCLUSIONES

1. Los pacientes infectados con *T.cruzi* presentan alta concentración de citocinas tanto pro como anti-inflamatorias que no existe en el grupo control.
2. La fase crónica sintomática se correlaciona con niveles altos de citocinas pro-fibróticas e inflamatorias IFN- γ , TNF- α , IL-1 β , IL-6 y de IL-2, IL1RA e IL -10 citocinas reguladoras de la inflamación, que aportan susceptibilidad en estos individuos; lo anterior se correlaciona con trastornos de conducción y fibrosis cardíaca, por lo que estos perfiles de citocinas, pueden ser utilizados como marcadores de lesiones activas en corazón.
3. Los pacientes tratados presentan disminución de IFN- γ , TNF- α , IL-15, IL-4 e IL -10, por lo que pueden ser marcadores para determinar eficacia o falla medicamentosa en la terapia antiparasitaria.

PERSPECTIVAS

- Es necesario un estudio estadístico multivariado de correlación de variables para relacionar las lesiones activas con la presencia de citocinas en suero.
- También es necesario medir citocinas expresadas a nivel de células T para conocer la respuesta directamente celular.

REFERENCIAS

- 1) UNAM, SSA, OPS. Manual para el Diagnóstico de la Infección por *Trypanosoma cruzi*. México D.F. 2006; 45 p.
- 2) 62ª Asamblea Mundial de la Salud. Punto 12.12, Orden del Día Provisional, 20 de marzo de 2009. Enfermedad de Chagas: control y eliminación. OMS/A62/17/2009.
- 3) Organización Panamericana de la salud. Estimación cuantitativa de la enfermedad de Chagas en las Américas. OMS 2006, Montevideo, Uruguay. OPS/HDM/CD/425-06.
- 4) Salazar Schettino PM, Barrera M, Bucio M. Transmisión de *Trypanosoma cruzi* por transfusión sanguínea. Primer caso humano en México. Rev. Mex Patol Clin. 1989; 36:57-59
- 5) WHO: Sustaining the drive to overcome the global impact of neglected tropical diseases: second WHO report on neglected tropical diseases. [enero 2013]. Disponible en: http://www.who.int/neglected_diseases/9789241564540/en/
- 6) Mazzotti L. Dos casos de enfermedad de Chagas en el estado de Oaxaca. Gac Med Méx. 1940; 70:417-420.
- 7) Salazar Schettino PM, Castejón J, Rodríguez H, Tay J. Miocarditis chagásica crónica en México. Tercer caso comprobado por exámenes parasitológicos. Prensa Med Mex. 1979; 44:115-120.
- 8) Salazar Schettino PM, Tay J, Bucio MI, Haro I, Anzures ME, Flores AS. Primer caso de megaesófago con serología positiva a *Trypanosoma cruzi*. Rev Inv Salud Pub Mex. 1984; 26: 452-455.
- 9) Tay J, Salazar-Schettino PM, Ontiveros A, Jiménez J, Haro I de, García Y, Gutiérrez QM. Epidemiologic study of Chagas' disease in a town in Oaxaca, Mexico. PAHO Bulletin 1986; 20: 358-65.
- 10) Salazar Schettino PM, Cabrera Bravo M, Bucio Torres MI, Haro Arteaga I de. Diagnóstico morfológico de las parasitosis. 3a. ed. México: Méndez Editores, SA de CV. 2011
- 11) Levine ND, Corliss JO, Cox PEG. A newly revised classification of the protozoa. J Protozool. 1980; 27: 37-58.
- 12) Chagas C. Nova tripanozomíaze humana. Estudos sobre a morfologia o ciclo evolutivo de *Schizotrypanum cruzi* n.gen.,sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1909; 1:159-128.
- 13) Cano MI, Gruber A, Vázquez M, Cortés A, Levin M, González A, et al. Molecular karyotype of *Trypanosoma cruzi* CL-Brener reference clone of the *T. cruzi* genome project. Mol Biochem Parasitol. 1995; 71: 27-38.
- 14) Zingales B, Andrade SG, Briones MRS, Campbell DA, Chiari E, Fernandes O, et al. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009; 104(7):1051-1054.
- 15) Pinto CM, Kalko EKV, Cottontail I, Wellinghausen N, Cottontail VM. TcBat, a bat-exclusive lineage of *Trypanosoma cruzi*, in the Panama Canal Zone, with comments on its classification and the use of the 18S rRNA gene for lineage identification. Infection, Genetics and Evolution. 2012; 12: 1328-1332.

- 16) Miles MA, Toye PJ, Oswald SC, Godfrey DG. The identification by isoenzyme patterns of two distinct strain-groups of *Trypanosoma cruzi* circulating in a rural area of Brazil. *Trans R Soc Med Hyg.* 1977; 71:217-225.
- 17) Burgos JM, Diez M, Vigilano C, Bisio M, Risso M. Molecular identification of *Trypanosoma cruzi* discrete typing units in end-stage chronic Chagas heart disease and reactivation after heart transplantation. *Clin Infect Dis.* 2010; 51: 485-95.
- 18) Salazar-Schettino PM, de Haro I, Cabrera M. Tres especies de triatomíneos y su importancia como vectores de *Trypanosoma cruzi* en México. *Medicina (Buenos Aires).* 2005; 65: 63-69.
- 19) Teixeira ARL, Nascimento RJ, Sturm NR. Evolution and pathology in Chagas disease: a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2006; 101(5), 463-491.
- 20) OMS, 2007. Reporte sobre la Enfermedad de Chagas del Grupo de Trabajo Científico. Programa Especial de Investigaciones y Enseñanzas sobre Enfermedades Tropicales. TDR/SWG/09. Ginebra. Suiza.
- 21) Galvão C, Carcavallo R, Da Silva D, Jurberg J. A checklist of the current valid species of the subfamily Triatominae Jeannel, 1919 (Hemiptera, Reduviidae) and their geographical distribution, with nomenclatural and taxonomic studies notes. *Zootaxa.* 2003; 202:1-36.
- 22) Salazar-Schettino PM, Rojas-Wastavino G, Cabrera-Bravo M, Bucio-Torres MI, Martínez-Ibarra JA, Monroy-Escobar MC, et al. A revisión of thirteen species of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) vectors of Chagas disease in Mexico. *J Selva Andina Res Soc.* 2010; 1(1):57-80.
- 23) Vargas F. Biología de vectores de la enfermedad de Chagas en el norte de Perú. Ensayos sobre la eliminación de *Rhodnius ecuadoriensis*. V Reunión de la comisión Intergubernamental de la Iniciativa Andina Lima-Perú. OPS, 2004. (http://www.fiocruz.br/chagas_esp/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=83).
- 24) Molina ZJ, Rosales JL, Silva L, Molina D. Prevalencia de *Trypanosoma cruzi* en triatomíneos silvestres de Nuevo León. *Salud Pub Mex.* 2007; 1: 37-44.
- 25) Carvallo R, Galindez-Giron J, Jurberg J, Lent G, editors. Geographical distribution and latitudinal dispersion. *Atlas of Chagas Disease vectors in the Americas.* Vol. III. Editora Rio de Janeiro. 1999. p. 747-792.
- 26) Moncayo A. Progress towards the elimination of transmission of Chagas disease in Latin America. *World health statistics quarterly. Rapp. Trimest. Statist. Sanit. Mond* 1997; 50(3-4):195-198.
- 27) Salazar-Schettino PM, Perera R, Ruíz-Hernández AL, Bucio-Torres MI, Zamora-González C, Cabrera Bravo M, Harnden A. Chagas disease as a cause of symptomatic chronic myocardopathy in Mexican children. *Pediatr Infect Dis J.* 2009; 28: 1011-1013.
- 28) OMS. Serie de Informes Técnicos, 905. Control de la enfermedad de Chagas, Segundo Informe del Comité de Expertos de la OMS. Ginebra, 2002.
- 29) Abbas KA, Lichtman HA, Pober JS. *Inmunología celular y molecular.* 4ª ed. España: McGraw-Hill Interamericana; 2009.

- 30) Salazar F. Regulation of innate immunity during *Trypanosoma cruzi* infection. Control of Innate and Adaptive Immune Responses During Infectious Diseases. 5th ed: ISBN:978-1-4614-0483. USA, Springer, p.60, 2011.
- 31) Campos MA, Almeida IC, Takeuchi O, Akira S, Valente EP, Procópio DO, et al. Activation of toll-like receptor-2 by glycosylphosphatidylinositol anchors from a protozoan parasite. J Immunol. 2001; 167:416-423.
- 32) Guiñazú N, Pellegrini A, Carrera-Silva EA, Aoki MP, Cabanillas AM, Gironés N, et al. Immunization with a major *Trypanosoma cruzi* antigen promotes pro-inflammatory cytokines, nitric oxide production and increases TLR2 expression. Int J Parasitol. 2007; 37:1243-1254.
- 33) Kierszenbaum F. Views on the autoimmunity hypothesis for Chagas' disease pathogenesis. FEMS Immunol Med Microbiol; 2003; 37: 1-11.
- 34) Gutiérrez F, Guedes P, Gazzinelli R, Silva J. The role of parasite persistence in pathogenesis of Chagas heart disease. Parasite Immunol. 2009; (11):673-685.
- 35) Marín-Neto JA, Cunha-Neto E, Maciel BC, Simões MV. Pathogenesis of chronic Chagas heart disease. Circulation. 2007; 115: 1109-1123.
- 36) Maya JD, Repetto Y, Agosin M, Ojeda JM, Tellez R, Gaule C, Morello A. Effects of nifurtimox and benznidazole upon glutathione and trypanothione content in epimastigote, trypomastigote and amastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. Mol Biochem Parasitol. 1997; 86:101-106.
- 37) Souza PE, Rocha MO, Rocha-Vieira E, et al. Monocytes from patients with indeterminate and cardiac forms of Chagas' disease display distinct phenotypic and functional characteristics associated with morbidity. Infect Immun 2004; 72: 5283–5291.
- 38) Cardoni RL. La respuesta inflamatoria en la infección aguda con *Trypanosoma cruzi*. Medicina (Buenos Aires). 1997; 57(2): 227-234.
- 39) Scharfstein J, Barcinski MA, Leon LL. Induction of the acute-phase protein serum amyloid P in experimental Chagas' disease. Inf Immun. 1982; 35: 46-51.
- 40) Heremans H, Carlier Y. Interleukin-6 (IL-6) production in mice infected with *Trypanosoma cruzi*: Effect of its paradoxical increase by anti-IL-6 monoclonal antibody treatment on infection and acute-phase and humoral immune responses. Inf Immun. 1994; 62: 692-696.
- 41) Antúnez MI, Cardoni RL. Early IFN-gamma production is related to the presence of interleukin (IL)-18 and the absence of IL-13 in experimental *Trypanosoma cruzi* infections. Immunol Lett. 2001; 79(3):189-196.
- 42) Ho JL, Reed SG, Sobel J, Arruda S, He SH, Wick EA, Grabstein KH. Interleukin-3 induces antimicrobial activity against *Leishmania amazonensis* and *Trypanosoma cruzi* and tumoricidal activity in human peripheral blood-derived macrophages. Infect Immun. 1992; 60:1984–1993.
- 43) Hiyama K, Hamano S, Nakamura T, Nomoto K, Tada I. IL-4 reduces resistance of mice to *Trypanosoma cruzi* infection. Parasitol Res 2001; 87: 269–274.
- 44) Gao W, Pereira MA. Interleukin-6 is required for parasite specific response and host resistance to *Trypanosoma cruzi*. Int J Parasitol. 2002; 32(2):167-170.

- 45) Zúñiga E, A costa R E, Montes C, G ruppi A . A poptosis de Linfocitos as ociada a enfermedades infecciosas. Medicina (Buenos Aires). 2001; 62: 189-196.
- 46) Lopes MF, Nunes MP, Henriques-Pons A, *et al.* Increased susceptibility of Fas ligand-deficient gld mice to *Trypanosoma cruzi* infection due to a Th2-biased host immune response. Eur J Immunol 1999; 29: 81-89.
- 47) Hoft DF, Eickhoff CS. Type 1 immunity provides optimal protection against both mucosal and systemic *Trypanosoma cruzi* challenges. Infect. Immun. 2002; 70: 6715-6725.
- 48) Gomes J A, Bahia-Oliveira LM, *et al.* Evidence that development of severe cardiomyopathy in human Chagas' disease is due to a Th1-specific immune response. Infect Immun. 2003; 71(3): 1185-1193.
- 49) Russo M, Starobinas N, Do Santos RR, Minoprio P, Eisen H, Joskowicz MH. Susceptible mice present higher macrophage activation than resistant mice during infections with myotropic strain of *Trypanosoma cruzi*. Parasite Immunol. 1989; 11: 385-395.
- 50) Tarleton RL, Sun J, Zhang L, Postan M. Depletion of T cell populations results in exacerbation of myocarditis and parasitism in experimental Chagas' disease. Inf Immun. 1994; 5 (62): 1820-1829.
- 51) Cardoni R., Antúnez M, Abrami A. Respuesta TH1 en la infección experimental con *Trypanosoma cruzi*. Medicina (Buenos Aires). 1999; 59: 84.
- 52) Abel L, Rizzo LV, Ianni B, Aibuquerque F, Bacal F, Carrara D, *et al.* Chronic Chagas' disease cardiomyopathy patients display an increased IFN-gamma response to *Trypanosoma cruzi* infection. J Autoimmun. 2001; 17: 99-107.
- 53) Araujo-Jorge TC, Waghbi MC, Soeiro MNC, Keramidas M, Bailly S, Feige JJ. Pivotal role for TGF- β in infectious heart disease: the case of *Trypanosoma cruzi* infection and its consequent chagasic cardiomyopathy. Cytokine Growth Factor Rev. 2008; 19: 405-413.
- 54) Fonseca SG, Reis MM, Coelho V, Nogueira LG, Monteiro SM, Mairena EC, *et al.* Locally produced survival cytokines IL-15 and IL-7 may be associated to the predominance of CD8+ T cells at heart lesions of human chronic Chagas disease cardiomyopathy. Scand J Immunol. 2007; 66: 362-371.
- 55) Hermann E, Alonso-Vega C, Berthe A, Truyens C, Flores A, Cordova M, *et al.* Human Congenital Infection with *Trypanosoma cruzi* Induces Phenotypic and Functional Modifications of Cord Blood NK Cells. Pediatr Res. 2006; 60(1): 38-43.
- 56) Bonney KM, Taylor JM, Daniels MD, Epting CL, Engman DM. Heat-Killed *Trypanosoma cruzi* Induces Acute Cardiac Damage and Polyantigenic Autoimmunity. PLoS ONE. 2011 Jan; 6(1):e14571+.
- 57) Campos MA, Closel M, Valente EP, Cardoso JE, Akira S, Alvarez-Leite JI, *et al.* Impaired production of proinflammatory cytokines and host resistance to acute infection with *Trypanosoma cruzi* in mice lacking functional myeloid differentiation factor 88. J Immunol. 2004; 172: 1711-1718.
- 58) Dutra WO, Menezes CA, Villani FN, da Costa GC, da Silveira AB, Reis D, Gollob KJ: Cellular and genetic mechanisms involved in the generation of protective and pathogenic

immune responses in human Chagas disease. Mem Inst Oswaldo Cruz 2009, 104:208–218

- 59) Zhang L, Tarleton RL. Characterization of cytokine production in murine *Trypanosoma cruzi* infection by in situ immunocytochemistry: lack of association between susceptibility and Type 2 cytokine production. Eur J Immunol 1996; 26: 102–109.
- 60) Antunez MI, Cardoni RL. IL-12 and IFN-gamma production, and NK cell activity, in acute and chronic experimental *Trypanosoma cruzi* infections. Immunol Lett. 2000; 71:103–109.
- 61) Sathler-Avelar R, Vitelli-Avelar DM, Elói-Santos SM, Gontijo ED, Teixeira-Carvalho A, Martins-Filho OA: Blood leukocytes from benznidazole-treated indeterminate chagas disease patients display an overall type-1-modulated cytokine profile upon short-term in vitro stimulation with *Trypanosoma cruzi* antigens. BMC infectious diseases. 2012; 12(1): 123.
- 62) Magalhães-Santos, Isis F, & Andrade, Sonia G. Participation of cytokines in the necrotic-inflammatory lesions in the heart and skeletal muscles of *Calomys callosus* infected with *Trypanosoma cruzi*. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 2005; 100(5), 555-561
- 63) Garzón E, Borges, MC, Cordeiro-da-Silva A, Nacife V, Meirelles, MDN, Guilvard E, Ouassi, A. *Trypanosoma cruzi* carrying a targeted deletion of a Tc52 protein-encoding allele elicits attenuated Chagas' disease in mice. Immunology letters. 2003; 89(1), 67-80.
- 64) Gazzinelli RT, Oswald IP, Hieny S, James SL, Sher A. The microbicidal activity of interferon- γ -treated macrophages against *Trypanosoma cruzi* involves an L-arginine-dependent, nitrogen oxide-mediated mechanism inhibitable by interleukin-10 and transforming growth factor- β . European journal of immunology. 1992; 22(10), 2501-2506.
- 65) de Melo AS, de Lorenna VM, de Moura Braz SC, Docena C, de Miranda Gomes Y. IL-10 and IFN- γ gene expression in chronic Chagas disease patients after in vitro stimulation with recombinant antigens of *Trypanosoma cruzi*. Cytokine. 2012; 58: 207–12.
- 66) Sosa Estani S, Segura EL, Ruiz AM, Velazquez E, Porcel BM, Yamotis C: Efficacy of chemotherapy with benznidazole in children in the indeterminate phase of Chagas' disease. AmJTrop Med Hyg 1998, 59: 526–529.
- 67) de Andrade AL, Zicker F, de Oliveira RM, Almeida Silva S, Luquetti A, Travassos LR, Almeida IC, de Andrade SS, de Andrade JG, Martelli CM: Randomised trial of efficacy of benznidazole in treatment of early *Trypanosoma cruzi* infection. Lancet 1996, 343:1407–1413.
- 68) García S, Ramos CO, Senra JF, Vilas-Boas F, Rodrigues MM, Campos-de-Carvalho AC, Ribeiro-Dos-Santos R, Soares MB: Treatment with benznidazole during the chronic phase of experimental Chagas' disease decreases cardiac alterations. Antimicrob Agents Chemother 2005
- 69) Viotti, R., Vigliano, C., Lococo, B., Petti, M., Bertocchi, G., Álvarez, M. G., & Armenti, A. Clinical predictors of chronic chagasic myocarditis progression. Revista Española de Cardiología (English Edition). 2005; 58(9), 1037-1044.
- 70) Michailowsky V, Murta SM, Carvalho-Oliveira L, Pereira ME, Ferreira LR, Brener Z, Romanha AJ, Gazzinelli RT: Interleukin-12 enhances in vivo parasitocidal effect of benznidazole during acute experimental infection with a naturally drug-resistant strain of *Trypanosoma cruzi*. Antimicrob Agents Chemother 1998, 42: 2549–255

- 71) Sathler-Avelar R, Vitelli-Avelar DM, Massara RL, Borges JD, Lana M, Teixeira- Carvalho A, Dias JC, Elói-Santos SM, Martins-Filho OA: Benznidazole treatment during early-indeterminate Chagas' disease shifted the cytokine expression by innate and adaptive immunity cells toward a type 1-modulated immune profile. *Scand J Immunol* 2006, 64:554–563.
- 72) Voller A, Draper C, Bidwell D, Bartlett A. Microplate enzyme-linked immunosorbent assay for Chagas disease. *Lancet*. 1975;:424-428.
- 73) Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci*. 1979; (9):4350–4354.
- 74) Dutra WO, Gollob KJ. Current concepts in immunoregulation and pathology of human Chagas disease. *Curr Opin Infect Dis*. 2008; 21(3):287-292.
- 75) Tarleton RL. Pathology of American trypanosomiasis. En: Warren KS, editor. *Immunology and molecular biology of parasitic infections*. London: Blackwell Sc Pub. 1993. p. 64-71.
- 76) Tay J, Guerrero Alonso T, Salazar-Schettino PM. Efecto de las hormonas (progesterona y testosterona) sobre la patogenicidad de *Trypanosoma cruzi*. *Rev Latinoam Microbiol*. 1978; 20: 45-50.
- 77) Cutolo M, Sulli A, Serio B, Accardo S, Masi AT. Estrogens, immune response and autoimmunity. *Clin and Exp Rheum*. 1995; 13:2
- 78) Sistema Único de Información para la Vigilancia Epidemiológica/DGE/SSA.
- 79) da Matta Guedes PM, Gutierrez FRS, Maia FL, Milanezi CM, Silva GK, Pavanelli WR, et al. IL-17 Produced during *Trypanosoma cruzi* Infection Plays a Central Role in Regulating Parasite-Induced Myocarditis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010; 4(2):e604+.
- 80) Lima, ES, Andrade, ZA, & Andrade, SG. TNF- α is expressed at sites of parasite and tissue destruction in the spleen of mice acutely infected with *Trypanosoma cruzi*. *International journal of experimental pathology*. 2001; 82(6), 327-336.
- 81) Engel D, Peshock R, Armstrong RC, Sivasubramanian N, Mann DL. Cardiac myocyte apoptosis provokes adverse cardiac remodeling in transgenic mice with targeted TNF overexpression. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004; 287:1303-1311.
- 82) Gwechenberger M, Mendoza LH, Youker KA, Frangogiannis NG, Smith CW, Michael LH et al.. Cardiac myocytes produce interleukin-6 in culture and in viable border zone of reperfused infarctions. *Circulation*. 1999; 99: 546–551.
- 83) Adamopoulos S, Parissis JT, Kremastinos DT. A glossary of circulating cytokines in chronic heart failure. *European journal of heart failure*, 2001; 3(5), 517-526.
- 84) Kaviratne M, Hesse M, et al. IL-13 activates a mechanism of tissue fibrosis that is completely TGF-beta independent. *J. Immunol*. 2004; 173: 4020-4029.
- 85) Wagbi Mc, Keramidis M, Bailly S, Degraeve W. Uptake of host cell transforming growth factor by *Trypanosoma cruzi* amastigotes in cardiomyocytes. *Am J Pathol*. 2005; 167(4): 993-1003.

- 86) Acquatella H. Echocardiography in Chagas heart disease. *Circulation* 2007; 115:1124-31. <http://doi.org/bq7pr6>.
- 87) Laucella SA, Segura EL, Riarte A, Sosa Estani S. Soluble platelet selectin (s-P-Selectin) and soluble vascular adhesion molecule-1 (s-VCAM-1). Decrease during therapy with benznidazole in children with Indeterminate form of Chagas' disease. *Clin Exp Immunol*. 1999; 118: 423-427.
- 88) Hunter, CA, Ellis-Neyes LA, Sliker T, Kanaly S, Grünig G, Fort M, Araujo FG. IL-10 is required to prevent immune hyperactivity during infection with *Trypanosoma cruzi*. *The Journal of Immunology*. 1997; 158(7), 3311-3316.
- 89) Poncini CV, Alba Soto CD, Batalla E, Solana ME, Gonzalez Cappa SM. *Trypanosoma cruzi* induces regulatory dendritic cells *in vitro*. *Infect Immun*. 2008; 76: 2633-2641.
- 90) Roffê E, Rothfuchs AGG, Santiago HC, Marino APP, Ribeiro-Gomes FL, Eckhaus M, et al. IL-10 limits parasite burden and protects against fatal myocarditis in a mouse model of *Trypanosoma cruzi* infection. *J Immunol*. 2012; 188(2):649-660.
- 91) Arend, WP, Malyak M, Guthridge CJ, Gabay C. Interleukin-1 receptor antagonist: role in biology. *Ann Rev of Immunol* 1998; 16(1), 27-55.
- 92) Andrade ZA. Immunopathology of Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94, 1999; (Suppl. I): 71-80.
- 93) Tarleton RL. The role of T cells in *Trypanosoma cruzi* infections. *Parasitol Today* 1995; 11: 7-9.
- 94) Tarleton RL, Grusby MJ, Postan M, Glimcher LH. *Trypanosoma cruzi* infection in MHC-deficient mice: further evidence for the role of both class I and class II-restricted T cells in immune resistance and disease. *Int Immunol* 1996; 8: 13-22.
- 95) dos Reis GA. Cell-mediated immunity in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Parasitol Today*, 1997; 13: 335-342.
- 96) Revelli S, Page CLE, Piaggio E, Wietzerbin J, Bottasso O. Benznidazole, a drug employed in the treatment of Chagas' disease, down-regulates the synthesis of nitrite and cytokines by murine stimulated macrophages. *Clin Exp Immunol*. 1999 Nov; 118(2):271-7.
- 97) Waghbi MC, de Souza EM, de Oliveira GM, Keramidas M, Feige JJ, Araújo-Jorge TC, Bailly S. Pharmacological inhibition of transforming growth factor beta signaling decreases infection and prevents heart damage in acute Chagas' disease. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009; 53: 11.
- 98) Fernandez-Gomez R, Esteban S, Gomez-Corvera R, Zoulika K, Ouaisi A. *Trypanosoma cruzi*: Tc52 released protein-induced increased expression of nitric oxide synthase and nitric oxide production by macrophages. *J Immunol*. 1998; 160:3471-3479.
- 99) Camargo MM, Andrade AC, Almeida IC, Travassos LR, Gazzinelli RT. Glycoconjugates isolated from *Trypanosoma cruzi* but not from *Leishmania* species membranes trigger nitric oxide synthesis as well as microbicidal activity in IFN-gamma-primed macrophages. *J Immunol*. 1997; 159 (12):6131-6139.
- 100) Saavedra E, Herrera M, Gao W, Uemura H, Pereira MA. The *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase, through its COOH-terminal tandem repeat, upregulates interleukin 6 secretion in

- normal human intestinal microvascular endothelial cells and peripheral blood mononuclear cells. *J Exp Med.* 1999 Dec 20;190(12):1825-36.
- 101) Giordanengo L, Guíñazú N, Stempin C, Fretes R, Cerbán F, Gea S. Cruzipain, a major *Trypanosoma cruzi* antigen, conditions the host immune response in favor of parasite. *Eur J Immunol.* 2002; 32:1003-1011.
 - 102) Diez H, López MC, Thomas MC, Guzmán F, Rosas F, Velazco V, et al. Evaluation of IFN γ production by CD8 $^{+}$ T lymphocytes in response to the K1 peptide from KMP-11 protein in patients infected with *Trypanosoma cruzi*. *Parasite Immunol.* 2006; 28: 101-105.
 - 103) Ramos LA, López Monteón A, Talamás Rohana P, Rosales Encina JL. Recombinant SSP4 protein from *Trypanosoma cruzi* amastigotes regulates nitric oxide production by macrophages. *Parasite Immunol.* 2004; 26:409-418.
 - 104) Lorena VMB, Verçosa AFA, Machado RCA, Cavalcanti MGAM, Silva ED, Ferreira AGP, et al. Cellular immune response from chagasic patients to CRA or FRA recombinant antigens to *Trypanosoma cruzi*. *J Clin Lab Anal.* 2008; 22: 91-98.
 - 105) Petersen CA, Burleigh BA. Role for IL-6 in *Trypanosoma cruzi*-induced cardiomyocyte hypertrophy. *Infect Immun.* 2003; 71(8): 4441-4447.
 - 106) Reed S G, Brownell CE, Russo DM, Silva JS, Grabstein KH, Morrissey PJ. 1994. IL-10 mediates susceptibility to *Trypanosoma cruzi*. *Immunol.* 1994; 153(7):3135-3140.
 - 107) Majumder S, Kierszenbaum F. Mechanisms of *Trypanosoma cruzi*-induced down-regulation of lymphocyte function. Inhibition of transcription and expression of IL-2 receptor gamma (p64IL-2R) and beta (p70IL-2R) chain molecules in activated normal human lymphocytes. *The Journal of Immunology.* 1996; 156(10):3866-3874.
 - 108) Sullivan NIL, Eickhoff CS. Host. Importance of the CCR5–CCL5 Axis for Mucosal *Trypanosoma cruzi* protection and B cell activation. *J Immunol.* 2011; 187(3): 1358-1368.
 - 109) Aliberti JC, Souto JT, et al. Modulation of chemokine production and inflammatory responses in interferon-gamma- and tumor necrosis factor-R1-deficient mice during *Trypanosoma cruzi* infection. *Am J Pathol.* 2001; 158(4):433-40.
 - 110) Hardison JL, Wrightsman RA, Carpenter PM, Lane TE, Manning JE. The chemokines CXCL9 and CXCL10 promote a protective immune response but do not contribute to cardiac inflammation following infection with *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun.* 2006; 74(1):125–134.
 - 111) Vecile, E, Dobrina A, Salloum FN, Van Tassell BW, Falcione A, Gustini E, Abbate. Intracellular Function of Interleukin-1 Receptor Antagonist in Ischemic Cardiomyocytes. *PloS one* 2013; 8(1), e53265

ANEXOS

ANEXO 1

ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA

(SDS-PAGE en Mini-Protean 3 Cell, BIO-RAD)

La muestra debe contener aproximadamente 30 µg de proteína.

GEL DE SEPARACIÓN:

CONCENTRACIÓN	5%	7.5%	10%	12.5%	15%	20%
Acrilamida / bis (ml)	2.5	3.75	5	6.25	7.5	10
Agua* (ml)	8.5	7.25	6	4.75	3.5	1
TRIS 1.5 M pH 8.8 (ml)	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75
SDS-10% (µl)	150	150	150	150	150	150

Mezclar y desgasificar 15 min al vacío o a 37°C / 10-15 min

PERS. AMON. 10% (µL)	75	75	75	75	75	75
TEMED (µl)	5	5	5	5	5	5

Mezclar suavemente

Añadir unas gotitas DE Alcohol i so-propilico en la superficie del gel y retirar con papel absorbente después de la polimerización.

El Persulfato de Amonio al 10% se prepara al momento.

GEL CONCENTRADOR (5%)

ACRILAMIDA / BIS	425 (µl)
AGUA*	2.275 (ml)
TRIS 0.5 M pH 6.8	400 (µl)
SDS-10%	31.25 (µl)

Mezclar y Desgasificar 15 min al vacío o a 37°C / 10-15 min

PERS. AMON. 10%	15.5 (µL)
TEMED	1.55 (µL)

La muestra se pone en ebullición durante 5 min con el amortiguador de muestra.

Realizar la corrida electroforética a 150 o 200 volts.

ANEXO 2

REACTIVOS Y SOLUCIONES PARA LA ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA

ACRILAMIDA / BIS/ACRILAMIDA

- Pesar 29.2 g de acrilamida + 0.8 g de N'N'-Bis-Metil Acrilamida.
- Aforar a 100 ml con agua*, filtrar y cubrir con aluminio.
- Guardar a 4°C.

NOTA: La acrilamida sin polimerizar es neurotóxica por lo que se debe manejar con cuidado especialmente en piel.

1.5 M Tris-HCl, pH 8.8

- Pesar 13.61 g DE TRIS-BASE (TRIZMA BASE)
- Disolver en 40 ml de agua*
- AJUSTAR EL pH a 8.8 con 6N HCl
- Aforar a 75 ml
- Esterilizar y guardar a 4°C.

0.5 M Tris-HCl, pH 6.8

- Pesar 6 g de tris-base
- Disolver en 80 ml de agua*
- Ajustar el pH a 6.8 con 6 n HCL
- Aforar a 100 ml con agua*
- Esterilizar y guardar a 4°C.

SDS-10%

- Pesar 1 g de SDS
- Disolver en agua estéril*
- Aforar el volumen a 10 ml.
- GUARDAR A 4°C.

BUFFER DE MUESTRA:

	2 x	8 x
- Agua (ml)	14.2	3.55
- Tris 0.5 m pH 6.8 (ml)	5	5
- Glicerol (ml)	10	10
- SDS 10% (ml)	8	8
- Azul de bromofenol 0.5% (ml)	0.8	0.8

β-mercaptoetanol: agregar 50 µl para cada 950 µl de muestra antes de usarse

Guardar a temperatura ambiente en oscuridad.

AMORTIGUADOR DE CORRIDA 10X, pH 8.3

- Tris-base - 30.3 g
- Glicina -144 g
- SDS - 10 g
- Agua* -aforar a 1000 ml
- No ajustar pH con ácidos o bases
- Guardar a 4°C.

COLORANTE AZUL DE COOMASSIE

Azul de Coomassie (R-250)	0.1% en:
Ac. acético	10 ml
Metanol	40 ml
Agua*	50 ml

TEÑIR DURANTE 10 MIN.

SOLUCION. PARA DESTEÑIR EL GEL

Ac. Acético	- 10 ml
Etanol	- 15 ml
Agua *	- 75 ml

* AGUA DESIONIZADA ESTÉRIL

ANEXO 2

ELECTROINMUNOTRANSFERENCIA (WESTERN-BLOT en Trans-Blot Semi-Dry, BIO-RAD)

REALIZAR LA SEPARACIÓN ELECTROFORÉTICA

Todo el procedimiento se realizará con cuidado de no tocar el gel ni la membrana de nitrocelulosa
EQUILIBRAR EN EL AMORTIGUADOR DE TRANSFERENCIA A 4°C:

Geles de acrilamida durante 20-60 min.
Membranas y papeles filtro durante 5-10 min.

MONTAJE DEL "SANDWICH":

Desmontar el gel de la cámara de electroforesis y colocar las muestras cuidando de evitar la presencia de burbujas especialmente entre el gel y la nitrocelulosa:

Papel filtro
Gel
Membrana de nitrocelulosa
Papel filtro

TRANSFERENCIA:

Colocar las muestras en la cámara de transferencia con la membrana de Nitrocelulosa hacia la placa inferior y el gel hacia la superior.

Tapar la cámara y realizar la transferencia en un rango de 10 volts/30 min o 15 volts/15 min. Sin exceder de 25 volts (12 volts/22 min.)

AMORTIGUADOR DE TRANSFERENCIA pH 8.1-8.4*:

Tris base (25mM)	3.03 g
Glicina (192mM)	14.4
Metanol 20% (v/v)	200 ml
AFORRAR A 1000 ml CON AGUA*	

* NO AJUSTAR EL pH CON ACIDOS NI BASES

Marcar la membrana y secarla entre 2 hojas de papel filtro.

BLOQUEO:

Con PBS/TWEEN 20 0.3% /leche descremada deshidratada 5% (DIFCO, 232100) durante 2 horas a t.a. en agitación ligera.

LAVADOS:

Realizar 2 lavados rápidos en agitación con pbs-tween 0.3%
Incubación de sueros:

INCUBAR A 4°C EN AGITACIÓN DURANTE LA NOCHE

Las diluciones se realizan en PBS/Tween 0.3%/leche 5%.

La dilución a emplear se definirá en diferentes concentraciones según el origen del suero a probarse. En caso de tratarse de sueros humanos será en dilución entre 1:100-1:50 y en caso de sueros hiperinmunes (obtenidos en conejo o ratón) en dilución 1:500.

LAVADOS:

Lavados de 10 min. Cada uno con PBS-Tween 0.3% A T.A. en agitación.

INCUBACION CON EL CONJUGADO

El conjugado se diluye en PBS-Tween 0.3%.

La incubación se realiza durante 2 horas a t.a. en agitación ligera.

El conjugado deberá haber sido titulado previamente.

LAVADOS:

5 lavados de 5 min. Cada uno con PBS-Tween 0.3% A T.A. en agitación.

REVELADO DE LA PRUEBA CON EL SUSTRATO

CHLORO-1-NAPHTOL (4CN)

Tris HCl/NaCl 10 mM - 8.5 ml +
5.1 mg de chloronaphtol en 1.7 ml de METANOL FRIO
AGREGAR 5 µl de H₂O₂ al 30%

Tris HCl (10mM)/NaCl (0.14M) pH 7.5
Tris HCl 0.158 g
AGUA* 100 ml - ajustar pH a 7.5
NaCl 0.819 g
Esterilizar y guardar a 4°C

Colocar en oscuridad durante 15-30 min. En agitación ligera (T.A.).

Frenar la reacción con agua desionizada, dejar secar y guardar.

Si se desea pueden conservarse en agua desionizada.

3,3, Diaminobenzidina (DAB) 50 - 25 mg

PBS pH 7.2 100 - 50 ml
H₂O₂ al 30% 50 - 25 µl

Colocar en oscuridad durante 15-30 min. En agitación ligera (t.a).

Frenar la reacción con agua desionizada, dejar secar y guardar con agua desionizada estéril

ANEXO 3

TECNICA DE ELISA

ADSORCIÓN

La adsorción del antígeno se realiza sobre placas Costar, de fondo plano de alta densidad de poliestileno de 96 pozos. Se incubó a 4 °C en cámara húmeda durante la noche.
A las 12 hrs, se realizaron 3 lavados de 3 minutos cada uno con PBS Tween.

BLOQUEO

Se bloquearon los sitios inespecíficos de la placa con PBS-leche durante una hora
Se realizan 3 lavados.

ELISA INDIRECTA

Incubación del primer anticuerpo

Se colocan los sueros controles positivos alto, bajo, negativo y sueros problema en dilución

Se incubó la caja 30 minutos a 37 °C.

Se lava tres veces

Incubación del segundo anticuerpo

Se agregó el conjugado Anti IGG Peroxidase Conjugate (ZIMED) en dilución en PBS Tween leche 30min a 37°C. Se lavó 5 veces.

REVELADO

Al amortiguador de sustrato se le agregó o-Phenylenediamine (Sigma) OPD en Buffer citrato con 10 ul de peróxido.

Se detuvo la reacción a los 15 minutos con 100 µL/por pozo de SO₄H₂ 2.5N.

Se utilizó un micro lector de ELISA (Microplate Reader Bio Rad modelo 550) a 490 y 595 nm.

ANEXO 4

PREPARACION DE REACTIVOS PARA ELISA

PBS pH 7.2 1X

Fosfato di sódico dodecahidratado ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	2.9 g
Fosfato monopotásico anhidro (KH_2PO_4)	0.2 g
Cloruro de potasio (KCl)	0.2 g
Cloruro de sodio (NaCl)	8.0 g
Agua desionizada	aforar a 1000 ml
Esterilizar y guardar a 4°C hasta su uso.	

PBS-TWEEN 20 0.05%

Tween 20 al 20% (con agua desionizada)	2.5 ml
PBS 1X pH 7.2	aforar a 1000 ml

PBS-Leche 5% y 1%

Se preparan con leche descremada y deshidratada (DIFCO, 232100)
El diluyente será PBS pH 7.2.

NOTA: Deberán ser de preparación reciente para el día.

AMORTIGUADOR DEL SUSTRATO pH-5

Fosfato di sódico dodecahidratado ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	26.97 g
Acido cítrico	3.0 g
Agua desionizada	aforar a 100 ml

Ajustar pH, esterilizar y guardar en refrigeración a 4°C.

A partir de esta solución: tomar 8 ml que se llevan a 25 ml con agua desionizada, agregar una tableta de o-fenilendiamina (OPD) de 10 mg e inmediatamente antes de revelar la reacción se agregan 10 µl de PERÓXIDO DE HIDRÓGENO (H_2O_2) al 30%.

ACIDO SULFÚRICO 1 N (SOLO PARA ELISA)

Ac. Sulfúrico (H_2SO_4) (98% de pureza)	55 ml
Agua bidestilada	aforar a 100 ml

ANEXO 5

TÉCNICA MULTIPLEX BIOPLEX

Tratamiento de la muestra y la curva estándar.

La muestra se preparó con las en una dilución 1:16 con el diluyente de la muestra.

Preparación de la curva estándar.

Una vez reconstituido se debe mantener en hielo (se mantiene estable durante un máximo de 12 horas solamente).

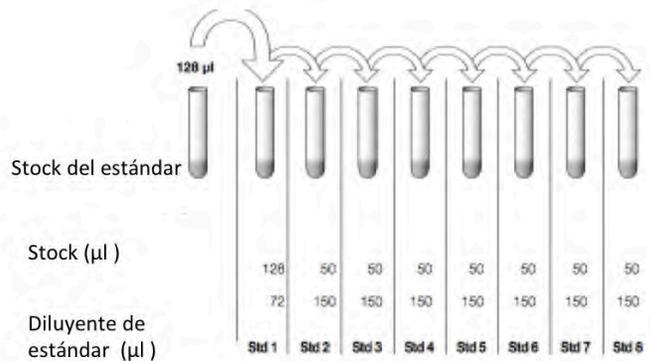
1. Golpear suavemente el vial de vidrio que contiene en una superficie sólida para asegurar la pastilla esta en el fondo. Reconstituir el estándar del liofilizado con 500 μ l del diluyente del estándar. No utilice el buffer para diluir los estándares.
2. Suavemente del vial de vidrio vortexear 1-3 segundos e incubar en hielo durante 30 min.

Etiquetar un conjunto de tubos de Eppendorf de 1,5 ml realizar concentraciones mostradas en la figura: estándar 1 (std 1) al estándar 8 (std 8).

3. Añadir 128 μ l del stock del estandar en un Eppendorf de 1.5 ml que contiene 72 μ l del diluyente estándar. Vortexear suavemente.

4. Continuar haciendo diluciones seriadas tal como se muestra en la figura. Después realizar cada dilución y agitar suavemente y cambiar la punta de la pipeta.

NOTA: Cada estándar es una dilución de 4 veces de la anterior.
Mantener todos los tubos en hielo durante todo este procedimiento hasta que esté listo para su uso.



TECNICA MULTIPLEX BIOPLEX

Desarrollo de la técnica Multiplex-Bioplex.

1-Prehumer la placa (que contiene una membrana) de 96 pocillos con 100 ml de buffer de ensayo Bio- Plex.

2-Coloque la placa prehumedecida y retire el buffer por filtración al vacío. Seque la parte inferior de la placa con una toalla de papel limpia (preferiblemente sin pelusa).

3-Posteriormente lavar 1 vez con 100 µl por pozo de buffer de lavado Bio- Plex. Retirar el buffer de lavado por filtración al vacío. Seque la parte inferior de la placa para evitar la contaminación cruzada.

4-Vortear la solución que contiene el cóctel de perlas o microesferas (multiplex bead working solution Bio-Rad ®) durante 15-20 segundos a velocidad media posteriormente agregar con la pipeta de 50 µl en cada pocillo.

5- Posteriormente lavar 2 veces con 100 µl por pozo de buffer de lavado Bio- Plex Retirar el buffer de lavado por filtración al vacío.

6-Golpee suavemente la parte inferior de cada estándar estándar 1 (std-1) al estándar 8 (std- 8).

Pipetear 50 µl de estándar y muestra diluida (1:16) en cada pozo. Cambie la punta de la pipeta después agregar el volumen requerido por muestra. Cubra toda la placa con la cinta adhesiva para cubrir la placa. Coloque la placa en un agitador de microplacas y a continuación, cubrir con papel de aluminio.

Aumentar la velocidad del agitador gradualmente a 1100 rpm, mantener la los primeros 30 segundos de incubación, a continuación, reducir la velocidad a 300 rpm e incubación a temperatura ambiente durante 30 min.

7-Al terminar la primera incubación, colocar la placa sobre una superficie plana y retirar lentamente la cinta con la que se sellada la placa, con cuidado de no inclinar la placa y a que la muestra se puede mezclar de un pozo a otro. Colocar la placa en absorción al vacío.

8-Lavar 3 veces con 100 µl de Buffer de lavado Bio-Plex. Retirar el Buffer por filtración al vacío después de cada lavado. Secar la parte inferior de la placa con una toalla de papel limpia (preferiblemente sin pelusa) después de cada lavado para evitar la contaminación cruzada. Colocar la placa en el soporte de la placa de plástico incluido en el kit.

9-Preparar la solución que contiene del anticuerpo de detección. Nota: La solución que contiene el anticuerpo de detección se puede preparar 10 minutos antes de su uso.

Importante: Placa se debe mantener en la oscuridad mientras se prepara la solución.

a) Realizar una centrifugación de 30 segundos del vial que contiene el anticuerpo de detección antes de pipetear para recoger todo el volumen en la parte inferior del vial.

b) Diluir el anticuerpo de detección a una concentración 1x (Bio – Plex) utilizando la detección de diluyente de anticuerpo el anticuerpo de detección se prepara a 10x.

Anticuerpo de detección (10x)

No de pozos	10x Stock del anticuerpo Anticuerpo (µl)	Diluyente A (µl)	Volumen Total (µl)
96	300	2,700	3,000
48	150	1,350	1,500
32	100	900	1,000
24	75	675	750

c) El anticuerpo de detección 1x es estable durante un máximo de 4 horas cuando se almacena en la oscuridad a temperatura ambiente.

10- Vortexear la solución 10x de anticuerpo de detección trabajo suavemente y añadir 25 µl a cada pozo. Cubra toda la placa con una cinta para cubrir placas nueva (proporcionada en el kit). Coloque la placa en el soporte de plástico y posteriormente en un agitador de microplacas, luego cubrir con papel de aluminio. Aumentar la velocidad del agitador gradualmente a 1100 rpm, mantener la los primeros 30 segundos de incubación, a continuación, reducir la velocidad a 300 rpm e incubar a temperatura ambiente durante 30 min. Al final de la incubación retirar la placa del agitador y desechar cuidadosamente la cinta de sellado. Finalmente colocar la placa en filtración al vacío.

11- Lavar 3 veces con 100 µl de Buffer de lavado Bio-Plex. Retirar el de Buffer de lavado por filtración al vacío después de cada lavado. Seque la parte inferior de la placa con una toalla de papel limpia (preferiblemente sin pel usa) después de cada lavado. Coloque la placa en el soporte de plástico

12- Preparación de la estreptavidina -PE.

Nota: estreptavidina - PE se pueden hacer 10 min antes de su uso.

Importante: Placa debe de estar en oscuridad mientras se prepara la solución.

Preparación de le estreptavidina –PE

a. Se centrifuga por 30 seg el vial de estreptavidina - PE antes de pipetear para recoger todo el volumen en la parte inferior del vial.

b. Diluir la estreptavidina - PE 100 X con Buffer de ensayo Bio - Plex. Almacenar en la oscuridad después de la preparación. En la siguiente tabla se muestra la dilución dependiendo del número de muestras:

Pozos	Estreptavidina-PE(100x) (µl)	Buffer de ensayo Bio-Plex Assay(µl)	Volumen Total (µl)
96	60	5,940	6,000
48	30	2,970	3,000
32	20	1,980	2,000
24	15	1,485	1,500

c. El la dilución de estreptavidina - PE es estable durante un máximo de 4 horas cuando se almacena en la oscuridad a temperatura ambiente.

13- Vortexar la dilución de 1x de estreptavidina -PE vigorosamente y agregar se 50 µl de cada pozo. Cubrir la placa con una nueva cinta. Aumentar la velocidad del agitador gradualmente a 1100 rpm, mantener la los primeros 30 segundos de incubación, a continuación, reducir la velocidad a 300 rpm e incubación a temperatura ambiente durante 10 min. Al final de la incubación de 10 min. Retirar la placa del agitador y deseche la cinta de sellado. Retirar el tampón por filtración al vacío.

14- Lavar 3 veces con 100 µl de Buffer de lavado Bio-Plex. Retirar el de Buffer de lavado por filtración al vacío después de cada lavado. Seque la parte inferior de la placa con una toalla de papel limpia (preferiblemente sin pelusa) después de cada lavado. Coloque la placa en el soporte de plástico.

15- Se re-suspende las perlas de cada pozo con 125 µl con Buffer ensayo Bio- Plex. Cubrir la placa con una nueva cinta. Aumentar la velocidad del agitador gradualmente a 1100 rpm, durante 30 segundos inmediatamente e leer la placa en la estación Bio- Plex Multiplex.

16- La placa fue leída en la estación Bio-Plex Multiplex 200 sistem, software versión 6.0. La lectura de la concentración de citocinas en el sistema se realizó consultando la guía de usuario del software Administrador de Bio- Plex.

Reactivos del Kit

Reactivos
Estándar liofilizado (Standard Curve Cytokine)
Diluyente de la muestra (Bio-Plex® human serum sample diluent)
Diluyente estándar (Bio-Plex® standard diluent)
Diluyente del anticuerpo de detección (Bio-Plex® Detection antibody diluent)
Buffer de ensayo (Bio-Plex® Buffer Assay)
Buffer de lavado (Bio-Plex® Wash Buffer)
Coctel de perlas (Conjugated Magnetic Beads)
Anticuerpo de detección (Detection Antibody 10x) Anticuerpo de detección (Detection Antibody 20x)
Estreptavidina -PE (Streptavidin-PE)

No de catálogo de kit TGF-B No. De catálogo 171-304070M