



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

Obesidad como factor que modula la parasitemia y el tropismo
durante la Enfermedad de Chagas en modelo murino

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA:

Nancy Mendoza Bazán



Ciudad Universitaria, Cd. de Mx., 2017.



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor: Dr. Abel Gutiérrez Ramos**

VOCAL: **Profesor: Dr. Oscar Armando Pérez Méndez**

SECRETARIO: **Profesor: Dr. Fernando Martínez Hernández**

1er. SUPLENTE: **Profesor: Dr. Guillermo Celestino Cardoso Saldaña**

2° SUPLENTE: **Profesor: Dr. José Cordero Hernández**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

**LABORATORIO DE ECOLOGÍA DE AGENTES PATÓGENOS, HOSPITAL GENERAL
“DOCTOR MANUEL GEA GONZÁLEZ”.**

ASESOR DEL TEMA: DR. FERNANDO MARTÍNEZ HERNÁNDEZ

SUSTENTANTE: MENDOZA BAZÁN NANCY

ÍNDICE

1. RESUMEN	5
2. INTRODUCCIÓN	6
3. MARCO TEÓRICO	7
OBESIDAD	7
<i>Obesidad en el Mundo</i>	8
<i>Cambios metabólicos en la obesidad</i>	9
<i>Papel del tejido adiposo en la respuesta inmune</i>	12
<i>Obesidad e Infección</i>	14
TRYPANOSOMA CRUZI	14
<i>Ciclo de vida</i>	15
<i>Morfología</i>	17
<i>Genética del parásito</i>	18
ENFERMEDAD DE CHAGAS	20
<i>Distribución geográfica de la Enfermedad de Chagas</i>	20
<i>Vías de transmisión</i>	23
<i>Fases de la Enfermedad</i>	24
<i>Respuesta inmune del hospedero ante la Enfermedad de Chagas</i>	26
<i>Diagnóstico</i>	29
<i>Tratamiento</i>	30
4. ANTECEDENTES	31
OBESIDAD Y ENFERMEDAD DE CHAGAS	31
5. JUSTIFICACIÓN	33
6. OBJETIVOS	34
7. HIPÓTESIS	35
8. MÉTODOS Y MATERIALES	36
9. RESULTADOS	40
DIETA Y PESO	40
CARGA PARASITARIA EN SANGRE	41
TROPISMO	44
10. DISCUSIÓN	49

11. CONCLUSIONES	54
12. PERSPECTIVAS	55
13. BIBLIOGRAFÍA	56
ANEXO I	67
TÉCNICA FENOL-CLOROFORMO MODIFICADA	67
PROTOCOLO DE GULLICKSEN MODIFICADO	68

Índice de figuras

<i>Figura 1: Prevalencia de sobrepeso y obesidad en adultos de México.</i>	9
<i>Figura 2: Relación entre la expansión del tejido adiposo y el incremento del estado pro-inflamatorio...</i>	11
<i>Figura 3: Ciclo de vida de Trypanosoma cruzi.</i>	16
<i>Figura 4: Estadios morfológicos que presenta T. cruzi durante su ciclo de vida.</i>	18
<i>Figura 5: Distribución geográfica de las seis DTUs de T. cruzi</i>	19
<i>Figura 6: Rutas migratorias de América Latina y estimación del número de personas infectadas con T. cruzi en países no endémicos.</i>	21
<i>Figura 7: Distribución de la Enfermedad de Chagas en México por estado</i>	22
<i>Figura 8: Diversidad y distribución de los triatomíneos presentes en México</i>	23
<i>Figura 9: Fotografía de un ratón hembra alimentado con Dieta de cafetería (HO) junto a un ratón hembra alimentado con dieta estándar (HC)</i>	40
<i>Figura 10: Diferencia en el peso corporal</i>	41
<i>Figura 11: Carga parasitaria en sangre</i>	42
<i>Figura 12: Curva de carga parasitaria en sangre de ratones hembra</i>	43
<i>Figura 13: Curvas de carga parasitaria en sangre de ratones macho</i>	44
<i>Figura 14: Amplificación por PCR del gen miniexon para corazón de ratones macho</i>	45
<i>Figura 15: Amplificación por PCR del gen miniexon para corazón de ratones hembra.</i>	45
<i>Figura 16: Amplificación por PCR del gen miniexon para Intestino grueso de ratones macho</i>	46
<i>Figura 17: Amplificación por PCR del gen miniexon para Intestino grueso de ratones hembra</i>	46
<i>Figura 18: Amplificación por PCR del gen miniexon para Intestino delgado de ratones macho</i>	46
<i>Figura 19: Amplificación por PCR del gen miniexon para Intestino delgado de ratones hembra</i>	47
<i>Figura 20: Amplificación por PCR del gen miniexon para bazo de ratones macho</i>	47
<i>Figura 21: Amplificación por PCR del gen miniexon para bazo de ratones hembra</i>	47
<i>Figura 22: Amplificación por PCR del gen miniexon para tejido adiposo</i>	48

1. Resumen

La obesidad es un problema de salud mundial que se ha incrementado en los últimos años, se caracteriza por un exceso de tejido adiposo en el cuerpo que es perjudicial para la salud. Junto al notable aumento de la prevalencia de obesidad aparece un incremento paralelo en la susceptibilidad a padecer algunas infecciones por agentes patógenos, entre ellos el parásito *Trypanosoma cruzi*, agente causal de la enfermedad de Chagas.

Pocos estudios han abordado la relación que existe entre estos dos problemas de salud, comunes en México, por lo que el presente estudio tiene como objetivo comparar el desarrollo de la infección con *T. cruzi* de la cepa mexicana ninoa entre obesos contra aquellos con peso normal, empleando el modelo en ratones de la cepa Balb-c de obesidad inducida por dieta hipercalórica. Determinando la parasitemia, el tropismo por órgano y la diferencia de infección entre machos y hembras. Para ello, se hizo el seguimiento de la carga parasitaria en sangre, entre ambos grupos. Durante el pico máximo de parasitemia los ratones fueron sacrificados y se obtuvieron los órganos blancos de la infección (corazón, bazo, intestinos y tejido adiposo); de ellos se extrajo el DNA y se realizaron amplificaciones de secuencias de miniexon por PCR para determinar la presencia del parásito. Nuestros resultados mostraron una mayor carga parasitaria en los controles que en los obesos; así mismo, el corazón y los intestinos de los ratones con peso normal mostraron mayor presencia de DNA del parásito en contraste con los ratones obesos. Finalmente, ambos grupos de hembras mostraron una mayor parasitemia en comparación a los grupos de ratones macho. Nuestros datos sugieren que la obesidad inducida por dieta hipercalórica podría ser un factor protector a la infección con *T. cruzi*.

2. Introducción

La obesidad es un problema mundial de salud pública que ha incrementado en los últimos años. Éste es un síndrome de origen multifactorial que engloba factores conductuales, ambientales y genéticos que se caracteriza por la acumulación excesiva de tejido adiposo que es perjudicial para la salud (Muñoz *et al.*, 2004).

Estudios han demostrado que la obesidad ejerce efectos negativos sobre el sistema inmunológico (Milner y Beck, 2012; Lumeng, 2013), cambios que afectan tanto a la inmunidad humoral como a la inmunidad celular (Muñoz *et al.*, 2004); lo que implica, entre otros padecimientos, una mayor susceptibilidad a infecciones (Hedge y Dhurandhar, 2013).

Por otra parte, *Trypanosoma cruzi*, agente causal de la Enfermedad de Chagas, es un parásito ampliamente distribuido, y su relación con la obesidad ha sido recientemente abordada. Estos estudios han demostrado que el adipocito es un reservorio de este parásito, sugiriendo reinfecciones de los sujetos infectados y, en modelos murinos de obesidad se ha observado mayor muerte y parasitemia (Combs *et al.*, 2005; Nagajyothi *et al.*, 2008). Sin embargo, se desconoce si en individuos con obesidad, inducida por dieta hipercalórica, existe modificación del curso de la infección, diferencias en invasión de tejido, el comportamiento al emplear diferentes tipos de cepas con diferente fondo genético, así como al utilizar animales de diferente sexo. Por lo que se vuelve relevante realizar estudios acerca del efecto que ejerce la obesidad durante el curso de la infección con *T. cruzi*.

3. Marco Teórico

Obesidad

Recientemente las condiciones de vida de la humanidad han sido diversamente modificadas, debido a la urbanización. La disminución de actividad física y la mayor disponibilidad de alimentos de muy bajo nivel nutricional han ocasionado un aumento considerable en el número de personas con obesidad, llegando a ser un grave problema de salud pública a nivel mundial.

La obesidad se caracteriza por una acumulación excesiva de tejido adiposo con distribución corporal anormal; el cual se considera un factor de riesgo para padecer enfermedades crónico degenerativas tales como: diabetes mellitus tipo 2, enfermedades cardiovasculares, mayor susceptibilidad a padecer algunos tipos de cáncer e infecciones, trastornos locomotores, y dislipidemia e hipertensión, entre otros (Muñoz *et al.*, 2004; Sánchez-Castillo *et al.*, 2004; OMS, 2014).

Actualmente se sabe que la obesidad es un síndrome de origen multifactorial que engloba, un desequilibrio entre la ingesta y el gasto calórico, ocasionada por factores genéticos, factores ambientales, edad, sexo, disminución de termogénesis inducida por la dieta e incluso infecciones virales (Dhurandhar, 2001; Muñoz *et al.*, 2004).

La obesidad es definida, de acuerdo a los parámetros de la Organización Mundial de la Salud (OMS), con un valor de Índice de Masa Corporal (IMC) mayor o igual a 30 kg/m² (OMS, 2014), este índice es el parámetro más utilizado para determinar obesidad en adultos debido a que la medida es la misma para ambos sexos y se utiliza para adultos de todas las edades, sin embargo, su desventaja radica en que no distingue entre el peso asociado a masa grasa que el asociado con el tejido muscular, es decir, no considera la distribución de grasa corporal que influye en los riesgos para la salud (Gómez-García *et al.*, 2010; Ponce *et al.*, 2010).

Existen otros parámetros como el diámetro de la circunferencia abdominal y del brazo, la relación entre el diámetro cintura-cadera, el porcentaje de grasa corporal medido por impedancia bioeléctrica y el grosor del pliegue bicipital, tricípital y subescapular para determinar obesidad en adultos (Gómez-García *et al.*, 2010).

Obesidad en el Mundo

En el año 1998, la OMS clasificó la obesidad como epidemia mundial, para el año 2014, estimó que aproximadamente el 39% de la población mundial adulta (1900 millones de adultos) tienen sobrepeso, de los cuales, aproximadamente 600 millones de personas (13% de la población mundial adulta) son obesas (Sánchez-Castillo *et al.*, 2004; OMS, 2014), por lo que la obesidad ha sido nombrada el problema de salud pública número uno en el continente Americano (Dhurandhar, 2001).

Contrario a lo que se pensaba, la obesidad no es exclusiva de países desarrollados, con frecuencia se observa un aumento más rápido en los países en desarrollo, concentrándose el mayor número de casos en zonas urbanas (Sánchez-Castillo *et al.*, 2004; OMS, 2014.).

En particular, México ha presentado un importante incremento en la tasa de sobrepeso y obesidad que lo llevó a ocupar, a partir del año 2014, el primer lugar a nivel mundial de obesidad infantil y de población en general (OPS, 2014). Se estima que el 71.3% de la población mexicana de entre 20 y 60 años de edad de ambos sexos, tiene sobrepeso u obesidad (Barquera *et al.*, 2013).

En nuestro país, la mayor prevalencia de obesidad ($IMC \geq 30 \text{ kg/m}^2$) se observa en la región Norte del país (Baja California, Baja California Sur, Coahuila, Durango, Nuevo León, Sonora, Sinaloa, Tamaulipas y Zacatecas) en comparación a la región Centro (Aguascalientes, Colima, Guanajuato, Hidalgo, Jalisco, México, Michoacán, Nayarit, Querétaro, San Luís Potosí y Tlaxcala), la Ciudad de México y la región Sur (Campeche, Chiapas, Guerrero, Morelos, Oaxaca, Puebla, Quintana

Roo, Tabasco, Veracruz y Yucatán) (Figura 1), y al igual que en el panorama mundial, se observa que la prevalencia de obesidad en México es más alta en zonas urbanas que en zonas rurales y ligeramente más elevada en las mujeres en comparación a los hombres (ENSANUT, 2012; Barquera *et al*, 2013).

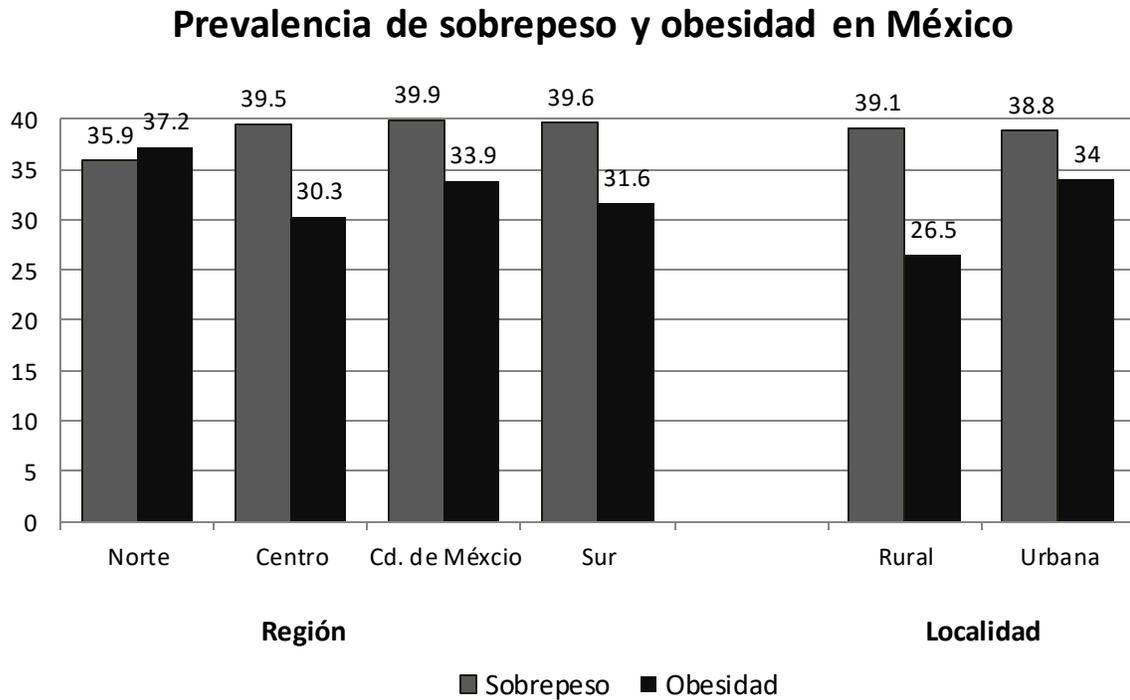


Figura 1: Prevalencia de sobrepeso y obesidad en adultos de México, de acuerdo a la región del país y tipo de localidad. Modificado de ENSANUT, 2012. Nota: Puntos de corte propuestos por la OMS. Sobrepeso 25-29.9 kg/m², Obesidad ≥ 30kg/m².

Cambios metabólicos en la obesidad

El tejido adiposo es el sitio donde el organismo guarda su principal reserva energética. Esta acumulación se lleva a cabo en el adipocito (unidad fundamental del tejido adiposo), el cual tiene la capacidad de almacenar ácidos grasos en forma de triglicéridos, reunidos en una gota citoplasmática única, debido a que cuenta con todas las enzimas necesarias de la lipólisis y de la lipogénesis (González *et al.*, 2002; Ponce *et al.*, 2010).

En periodos de sobrealimentación, el adipocito del humano adulto es capaz de modificar su tamaño, hasta 20 veces el diámetro de las células adiposas existentes (hipertrofia), y generar varios cientos de nuevos adipocitos maduros a partir de pre-adipocitos (hiperplasia), con el fin de almacenar el exceso de energía (González *et al.*, 2002; Flores-Lázaro *et al.*, 2011).

El tejido adiposo está constituido por diversos tipos celulares: pre-adipocitos, adipocitos, células del sistema inmune (monocitos y macrófagos), células endoteliales y células de tejido liso vascular (Desruisseaux *et al.*, 2007). Tradicionalmente considerado al tejido adiposo como almacén de energía, también se le considera como un órgano endócrino activo que secreta numerosas moléculas denominadas colectivamente adipocinas; éstos elementos le confieren propiedades autócrinas, endócrinas y parácrinas, jugando un papel importante en diversas funciones como mantener el balance energético a largo plazo, en el metabolismo de los lípidos y la glucosa, la modulación de la función hormonal y la reproducción; participa en la regulación de la presión arterial y contribuye en algunos aspectos del sistema inmune (Palomer *et al.*, 2005; Desruisseaux *et al.*, 2007; Flores-Lázaro *et al.*, 2011).

Las adipocinas principales son la leptina, la adiponectina, el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), la interleucina 6 (IL-6), el factor de crecimiento transformador beta (TGF- β), el inhibidor del activador del plasminógeno 1 (PAI-1), la angiotensina, la adipsina, la resistina y la proteína estimuladora de la acilación (ASP) (Palomer *et al.*, 2005).

Durante la obesidad incrementa la expresión génica de las adipocinas pro-inflamatorias, disminuye la de aquellas con funciones anti-inflamatorias y aumenta la infiltración de monocitos y la acumulación de macrófagos en el tejido adiposo; teniendo como resultado un cierto grado de inflamación que se denomina inflamación crónica de bajo grado, desencadenándose una serie de procesos fisiopatológicos relacionados a ésta que conducen al incremento de

comorbilidades asociadas con obesidad (Figura 2) (González *et al.*, 2002; Gómez-Ambrosi *et al.*, 2008).

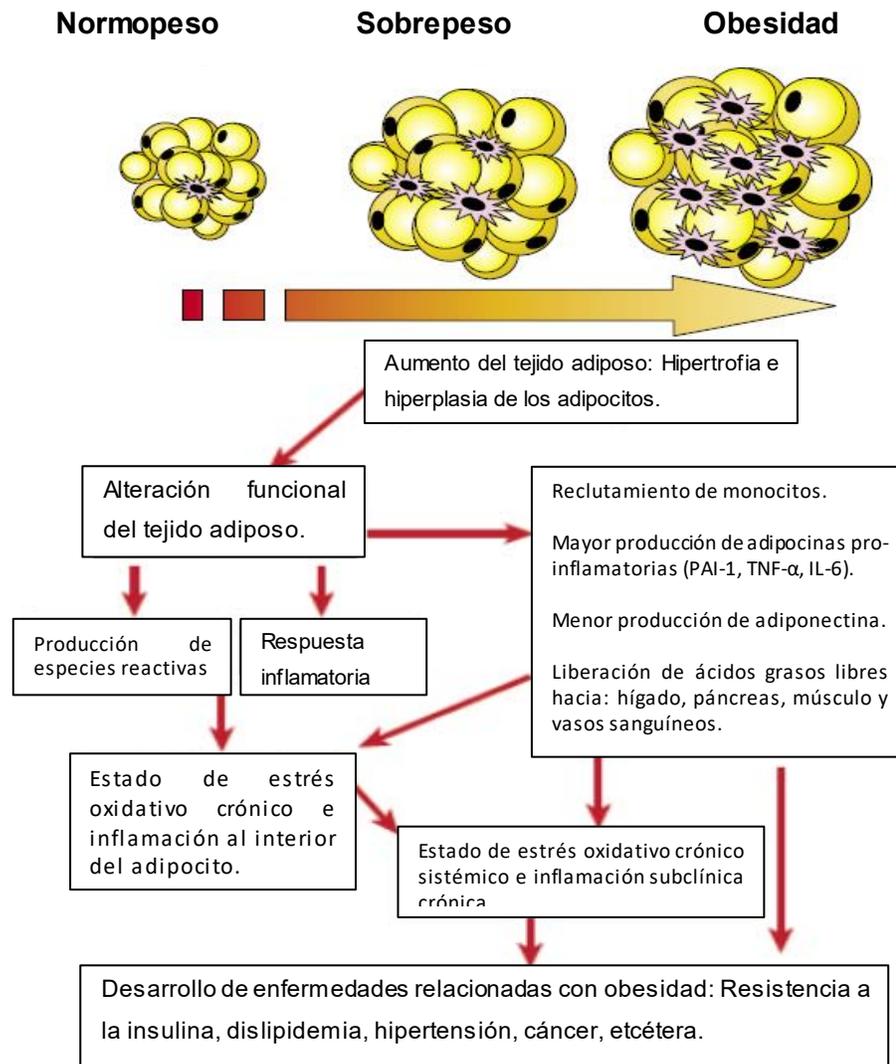


Figura 2: Relación entre la expansión del tejido adiposo y el incremento del estado pro-inflamatorio. A medida que aumenta el volumen del tejido adiposo, se modifica la producción de adipocinas y se desencadena una serie de procesos fisiopatológicos relacionados con la inflamación y el desenlace en enfermedades relacionadas con la obesidad. PAI-1: Inhibidor del activador de plasminógeno 1, TNF- α : Factor de necrosis tumoral α e IL-6: Interleucina 6. Modificado de Gómez-Ambrosi *et al.*, 2008 y Flores-Lázaro *et al.*, 2011.

La inflamación crónica de bajo grado a diferencia de la inflamación clásica, se caracteriza por no presentar los signos clásicos como: calor, rubor, tumor y dolor, pero es similar en cuanto a que comparte las alteraciones en los marcadores de inflamación típicos y las rutas de señalización (Gómez-Ambrosi *et al.*, 2008).

Papel del tejido adiposo en la respuesta inmune

El tejido adiposo juega un importante papel en la respuesta inmune. La regulación que ejerce sobre el sistema inmunológico se atribuye principalmente a los macrófagos y monocitos presentes en este tejido y a las adipocinas segregadas por los adipocitos maduros que actúan sobre células inmunes, modulando así la respuesta innata y adaptativa (Hedge y Dhurandhar, 2013).

Se conoce que el adipocito, al igual que los macrófagos, en respuesta a señales de agentes patógenos e inflamación induce la secreción de diversas citocinas pro-inflamatorias, tales como, TNF- α , IL-6 y PAI-1 (Berg y Scherer, 2005). También se ha demostrado que los preadipocitos muestran alta actividad fagocítica y cuentan con la capacidad de diferenciarse rápidamente a macrófagos (Charriere *et al.*, 2003).

Algunas adipocinas participan en la función que ejerce el tejido adiposo sobre los componentes inmunológicos: la Leptina, modula la activación de linfocitos, estimula la proliferación y diferenciación de macrófagos e induce la producción de citocinas pro-inflamatorias como TNF- α , IL-6 e IL-2; además se ha observado que un déficit de Leptina, tanto en humanos como en animales de experimentación, se traduciría en anomalías a nivel del sistema inmunológico, aumentando la susceptibilidad de éstos a las infecciones (Muñoz *et al.*, 2004; Pérez de Heredia *et al.*, 2012).

La Adiponectina, es una adipocina anti-inflamatoria que ejerce acciones relevantes sobre la inmunidad, en general, ésta reduce la respuesta de células T, inhibe la

actividad fagocítica y la producción de IL-6 y TNF- α , induce la producción de factores anti-inflamatorios como IL-10 e IL-1RA por los monocitos, macrófagos y células dendríticas humanas (Lago *et al.*, 2007).

La Resistina es secretada por adipocitos y células mononucleares y actúa sobre células mononucleares del torrente sanguíneo, y su función se correlaciona con la inducción de IL-6 y el TNF- α a través de la ruta del factor nuclear κ B (NF- κ B) (Lago *et al.*, 2007; Gómez *et al.*, 2009).

El TNF- α regula la producción de citocinas pro-inflamatorias (IL-6 e IL-1), induce la secreción de citocinas quimiotácticas (IL-8 y MCP) y la expresión de moléculas de adhesión (ELAM e ICAM-1) para atraer y acumular neutrófilos, macrófagos y células NK, mediando así los efectos en órganos periféricos (Hernández-Urzúa y Alvarado-Navarro, 2001; Cawthorn y Sethi, 2008).

La IL-6 tiene efectos pleiotrópicos: modula la inflamación, promueve la síntesis de proteínas de fase aguda y actúa sobre los linfocitos B (Hernández-Urzúa y Alvarado-Navarro, 2001; Gómez-Ambrosí *et al.*, 2008).

Recientemente, células hematopoyéticas inmaduras han sido observadas en el tejido adiposo, por lo cual éste se ha propuesto como un sitio de formación y maduración de precursores de células inmunes (Pérez de Heredia *et al.*, 2012).

En la obesidad se producen cambios inmunológicos que afectan a la inmunidad humoral en donde se observa una disminución en la secreción de anticuerpos, así como a la inmunidad celular que modula el recuento celular: se observa mayor número de neutrófilos, monocitos, linfocitos y bajos niveles de células T y B (Muñoz *et al.*, 2004; Pérez de Heredia *et al.*, 2012).

Obesidad e Infección

Se ha documentado que los cambios sobre la respuesta inmunológica ejercidos por la obesidad pueden ser considerados factor de susceptibilidad en infecciones bacterianas respiratorias, periodontales y post-operatorias nosocomiales, así como infecciones gástricas por *Helicobacter pylori*; en humanos adultos (Milner y Beck, 2012; Hedge y Dhurandhar, 2013).

En el año 2009, durante la pandemia de influenza A (H1N1), se reportó la obesidad como factor pronóstico de un resultado poco favorable ante esta infección. Se observó que la proporción de personas hospitalizadas, la duración de la estancia en la Unidad de Cuidados Intensivos e inclusive la mortalidad fue mayor en individuos obesos en comparación a los no obesos (Milner y Beck, 2012; Hedge y Dhurandhar, 2013).

En estudios realizados en modelos animales de obesidad inducida por modificación genética, se reportó que los animales obesos presentan una depuración deficiente ante la infección con *Klebsiella*, una mayor mortalidad frente a *Streptococcus pneumonia* y mayor susceptibilidad a infecciones hepáticas por *Listeria monocytogenes* (Ikejima *et al.*, 2006; Hedge y Dhurandhar, 2013).

Trypanosoma cruzi

El parásito protozoo *Trypanosoma cruzi* es el agente etiológico de la Enfermedad de Chagas, presenta un complejo ciclo de vida en el cual es comúnmente transmitido a los mamíferos, entre ellos el ser humano, por un insecto vector de la subfamilia Triatominae el cual transmite la fase infectiva del parásito en las heces del vector, he invade casi cualquier tipo de célula (Martínez-Velasco, 2004; Fuentes *et al.*, 2012).

Trypanosoma cruzi pertenece al Orden: Kinetoplástida, Familia: Trypanosomatidae, Género *Trypanosoma*, y dentro del género, al grupo denominado *Stercolaria* (de Pablos, 2010).

Ciclo de vida

El ciclo de vida de *T. cruzi* se desarrolla en organismos diferentes: insecto vector y mamífero hospedero. En él se reconocen cuatro formas distintas del parásito: tripomastigotes sanguíneos, amastigotes, epimastigotes y tripomastigotes metacíclicos (Figura 3) (Nagajyothi *et al.*, 2012).

El ciclo de vida de *T. cruzi* inicia cuando el insecto vector (triatominos), ingiere tripomastigotes sanguíneos al succionar sangre de algún mamífero infectado. Una vez ingeridos, muchos de estos tripomastigotes son lisados en el estómago del insecto; los sobrevivientes se transforman, pocos días después, a su forma epimastigote. Esta nueva forma migra al intestino del vector donde se divide por fisión binaria y se une a la membrana perimicrovilar (de Souza *et al.*, 2010; Nagajyothi *et al.*, 2012).

Estos pasos de adhesión son importantes para desencadenar, aproximadamente 3 a 4 semanas después, el proceso de transformación de la forma epimastigote (no infectiva) a la forma tripomastigote metacíclico (altamente infectiva para diversos mamíferos) (de Souza *et al.*, 2010; Nagajyothi *et al.*, 2012).

Usualmente, la transmisión a un nuevo hospedero toma lugar cuando los parásitos en las heces contaminadas del vector entran a las células de la dermis, a través de la mucosa de la nariz, la cavidad oral, la conjuntiva, lesiones abiertas en la piel o la herida causada por la picadura del triatominos al alimentarse (de Souza *et al.*, 2010; Nagajyothi *et al.*, 2012).

Una vez en el hospedero, los tripomastigotes metacíclicos invaden las células nucleadas cercanas al sitio de infección (fibroblastos, macrófagos, células

epiteliales y adipocitos) donde se diferencian a amastigotes (Desruisseaux *et al.*, 2007; de Souza *et al.*, 2010; de Pablos, 2010; Nagajyothi *et al.*, 2012).

Los cuales se encuentran en vacuolas parasitóforas, donde se multiplican por fisión binaria, cuando ocupan el citoplasma celular se diferencian a tripomastigotes, causando lisis de la célula infectada y liberándose a los espacios intracelulares, la linfa y a la circulación sanguínea como tripomastigotes sanguíneos. Posteriormente el vector puede succionar sangre con parásitos infectándose y cerrando el ciclo (Figura 3) (Tanowitz *et al.*, 2009; de Pablos, 2010; WHO, 2010).

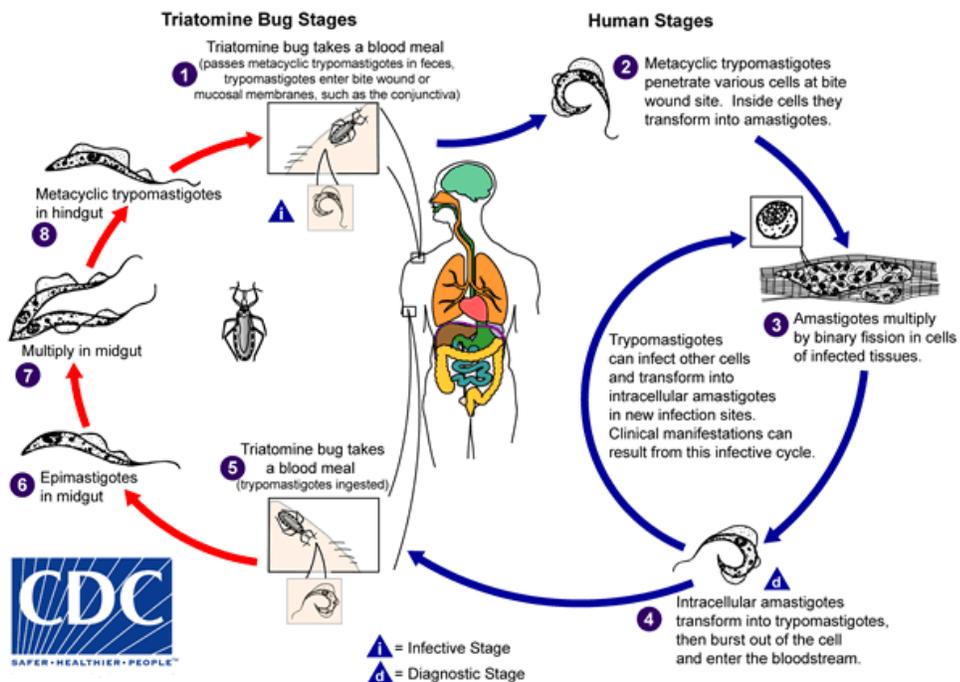


Figura 3: Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*. Se muestra las diversas formas del parásito en el vector invertebrado (triatominos) y el hospedero vertebrado (mamíferos). Tomada de la página del Centro de Control de Enfermedades (CDC).

Morfología

Las 4 formas que *T. cruzi* presenta durante su ciclo de vida, exhiben diferencias morfológicas:

El amastigote, es el estadio replicativo intracelular que se produce en el huésped mamífero. Presenta forma redondeada con tamaño de 2 a 2.5 μm , carece del flagelo, tiene un gran núcleo cerca del cual se encuentra el cinetoplasto a manera de disco. La replicación es por división binaria simple (Figura 4) (Guzmán-Marín *et al.*, 1999; de Souza, 2002).

El epimastigote, es la forma replicativa, no infectiva para el ser humano o mamífero, se encuentra en el vector invertebrado. Presenta un aspecto fusiforme con un tamaño de 20 a 40 μm de longitud, el cinetoplasto se encuentra situado delante del núcleo (Figura 4) (Guzmán-Marín *et al.*, 1999; de Souza, 2002).

El tripomastigote metacíclico, es la forma infectiva no replicativa, el cual se aloja en el intestino posterior de los insectos vectores, y cuya forma es la que puede infectar a hospederos mamíferos. Tiene una forma alargada que mide de 20-25 μm , la cual presenta un núcleo central, el cinetoplasto es de gran tamaño y un flagelo ondulante que contornea la célula y el cual le confiere movimiento (Figura 4) (Guzmán-Marín *et al.*, 1999).

El tripomastigote sanguíneo, se encuentra en torrente sanguíneo del hospedero mamífero, no tiene la capacidad de replicarse, pero sí de infectar nuevas células o al vector invertebrado. Presenta una forma alargada, un flagelo y membrana ondulante, el cinetoplasto es grande y alejado de la parte anterior del núcleo (Figura 4) (Guzmán-Marín *et al.*, 1999).

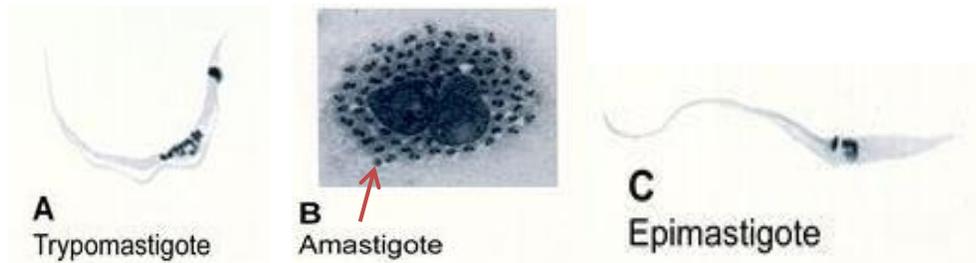


Figura 4: Estadios morfológicos que presenta *T. cruzi* durante su ciclo de vida. Tomada de de Souza *et al*, 2002.

Genética del parásito

Trypanosoma cruzi comprende un conjunto de poblaciones que circulan entre vectores, hombre y reservorios, tanto domésticos, peridomésticos y selváticos. Los diferentes aislados de *T. cruzi* provenientes de diversos hospederos de distintos sitios geográficos presentan variación en su morfología, en su diversidad genética, virulencia, susceptibilidad a agentes quimioterapéuticos, constitución antigénica, capacidad de infección para células hospederas, así como, diferencias en las patologías individuales y regionales de la enfermedad (Guzmán-Marín *et al.*, 1999; Martínez-Velasco, 2004).

Debido a lo anterior, se ha realizado un esfuerzo para caracterizar y clasificar los aislados de *T. cruzi*, para ello, se han empleado diferentes métodos moleculares nombrándolos como: zimodemas, esquizodemas, biodemas, clados y más recientemente, se han empleado Unidades Discretas de Tipificación (DTU por sus siglas en ingles). Clasificando actualmente a *T. cruzi* en seis DTU: TcI a TcVI, cada DTU es identificable por marcadores moleculares (Zingales *et al.*, 2009).

DTU TcI es la más abundante y de mayor distribución de todos los DTU en el continente americano, encontrándose predominante en Centroamérica, la región norte de Suramérica y México (Figura 5); siendo en este último el principal DTU genético que infecta a humanos. Este DTU está asociado con cardiopatía chagásica (Espinoza *et al.*, 2011).

DTU TcII se encuentra principalmente en las regiones centrales y sureñas de Sudamérica (Figura 5), se ha asociado con manifestaciones cardiacas, megaesófago y megacolon (Zingales *et al.*, 2012).

DTU TcIII se asocia con el ciclo selvático en Brasil (Figura 5). Está prácticamente ausente en los seres humanos, pero se ha identificado en perros domésticos (Zingales *et al.*, 2012).

DTU TcIV rara vez se encuentra en los seres humanos, pero es la causa secundaria de la Enfermedad de Chagas en Venezuela (Figura 5) (Zingales, 2011).

DTU TcV y TcVI se asocian a la Enfermedad de Chagas en Bolivia y Chile (Figura 5) (Zingales, 2011).

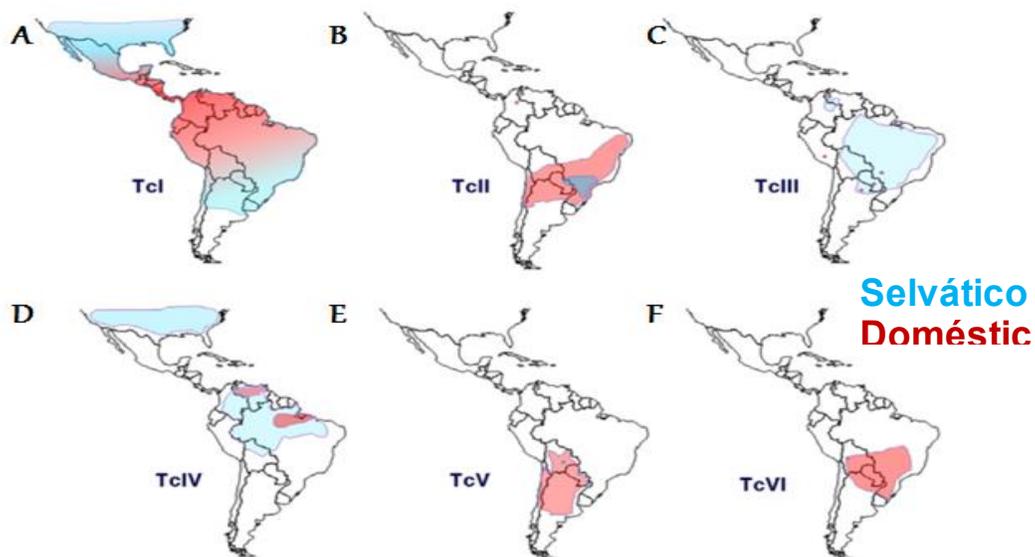


Figura 5: Distribución geográfica de las seis DTUs de *T. cruzi* y su correspondencia con ciclos de transmisión asociados a ambientes silvestre o domiciliarios. Tomada de Zingales *et al.*, 2012.

Enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas fue descrita por primera vez en 1909 por el médico Carlos Chagas, quien identificó al agente causal *T. cruzi* y a los insectos transmisores. Hasta la fecha la enfermedad se ha identificado en 21 países de América Latina y está estrechamente vinculada con aspectos socioeconómico-culturales (Rassi *et al.*, 2012; Roca Saumell *et al.*, 2015).

Esta enfermedad constituye uno de los principales problemas de salud pública en el mundo, se calcula que entre 6 y 8 millones de personas están infectadas con *T. cruzi* (OMS, 2015). La tasa de infección para esta enfermedad es de 300 mil individuos por año y la mortalidad es de aproximadamente 21 mil individuos por año, convirtiéndola en la tercera infección parasitaria más común en todo el mundo después de la Malaria y la Esquistosomiasis (Mantilla *et al.*, 2011).

Además, la importancia de la Tripanosomiasis radica en el impacto económico que genera, ya que es altamente morbil, presentándose durante el periodo más productivo de la vida de las personas infectadas, entre los 35 y 55 años de edad (Ramsey *et al.*, 2003; Fuentes *et al.*, 2012).

Distribución geográfica de la Enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas se distribuye desde América del Sur hasta la parte norte de América (México y el sur de los Estados Unidos de América); sumando un total de 21 países latinoamericanos endémicos de la enfermedad (Rassi *et al.*, 2012; Roca Saumell *et al.*, 2015). Sin embargo, en las últimas décadas, debido a los flujos migratorios, se han producido importantes cambios epidemiológicos, diagnosticándose un número considerable de personas en áreas no endémicas, principalmente en el norte de América (Estados Unidos y Canadá), Europa, Oceanía (Australia) y Asia (Japón) (Figura 6). La mayoría de individuos serológicamente positivos en estas áreas no endémicas suelen no ser conscientes

de su afección, pero son fuente potencial de la transmisión por vías no vectoriales (Machado *et al.*, 2012; Roca Saumell *et al.*, 2015).

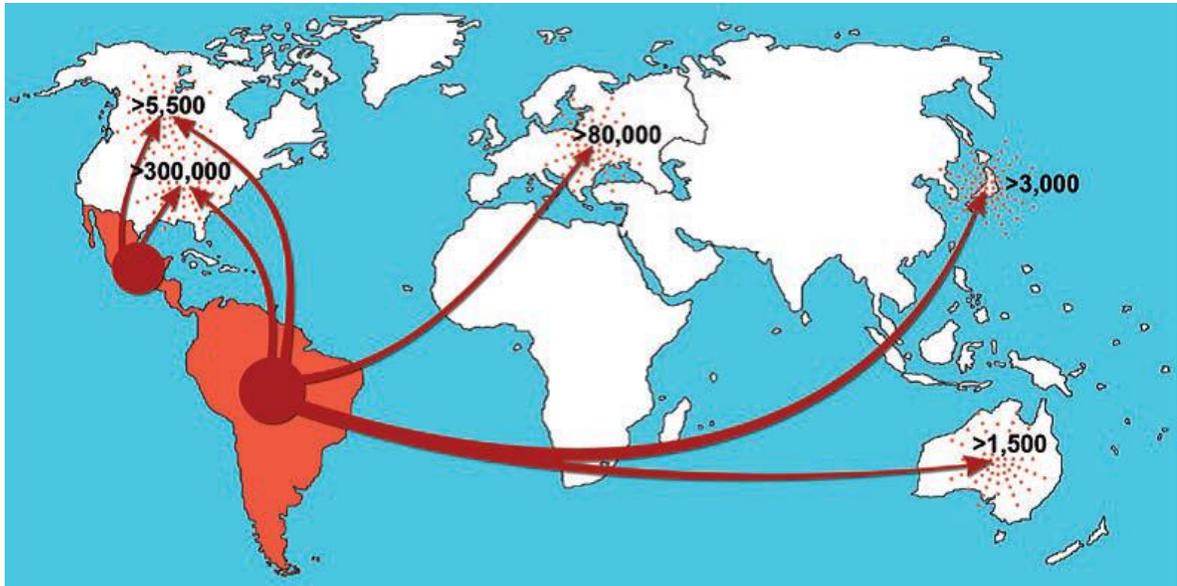


Figura 6: Rutas migratorias de América Latina y estimación del número de personas infectadas con *T. cruzi* en países no endémicos. Tomada de Grayson, 2010.

La prevalencia de individuos infectados por *T. cruzi* y la población en riesgo varía entre los países. El porcentaje de individuos infectados en México es del 1 al 6% de la población, sin embargo, junto con Brasil y Argentina, alberga el 60% del total de personas con Enfermedad de Chagas en el Mundo (Rassi *et al.*, 2012; Carod-Artal, 2013).

Actualmente se estima que 1 768 376 personas están infectadas con *T. cruzi* en la República Mexicana, en donde el 57% de esta población reside en zonas rurales y 8.9% en zonas suburbanas (Ramsey *et al.*, 2003). Los estados con mayor número de casos seropositivos reportados en la literatura son: Chiapas, Oaxaca, Guerrero, Morelos, Querétaro, Jalisco, Nuevo León y Nayarit (Figura 7) (Cruz-Reyes y Pickering-López, 2006).

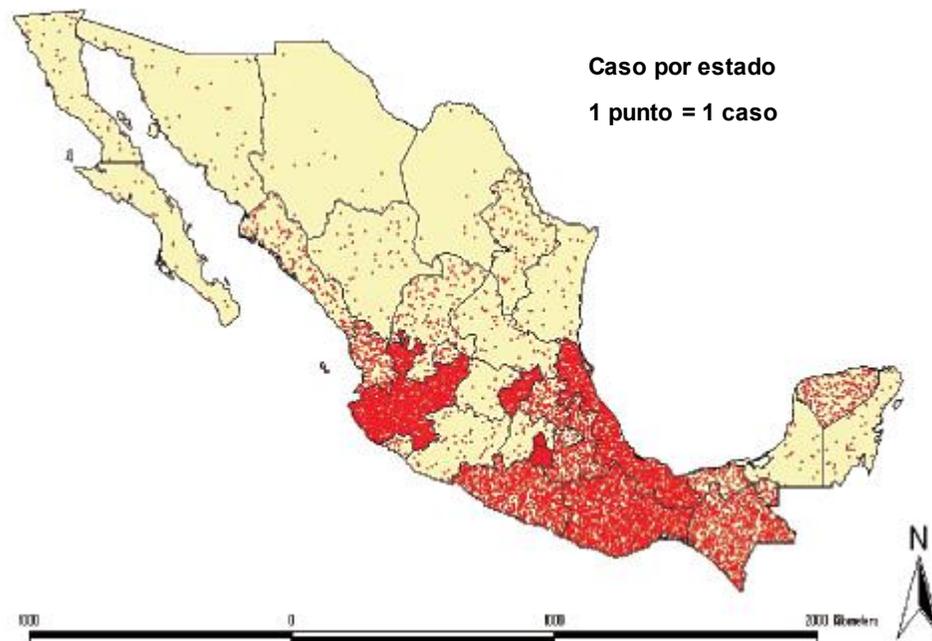


Figura 7: Distribución de la Enfermedad de Chagas en México por estado. Los puntos representan el promedio de la densidad para el estado, no la localización actual de cada caso. Tomado de Cruz-Reyes y Pickering-López, 2006.

En México, más del 85% de las infecciones ocurren por medio del vector, esto se relaciona con la presencia de 32 especies de triatomíneos hematófagos en el país, de los cuales 23 son endémicos de territorio nacional (Ramsey *et al.*, 2003).

Las especies de vectores de mayor importancia epidemiológica por su capacidad vectorial y su distribución en México son: *Triatoma barberi*, *T. dimidiata*, *T. phyllosoma*, *T. longipennis*, *T. mazzottii*, *T. pallidipennis*, *T. picturata*, *T. mexicana* y *T. gerstaeckeri* (Figura 8) (Ramsey *et al.*, 2003).



Figura 8: Diversidad y distribución de los triatominos presentes en México. Tomada de Martínez Hernández, 2003.

Vías de transmisión

Existen diferentes vías de transmisión por las que el ser humano puede infectarse con *T. cruzi*, entre ellas se encuentran las siguientes:

Transmisión vectorial. Se produce exclusivamente en áreas endémicas, la infección es a partir de insectos triatominos que tienen su ecosistema natural en el continente Americano. Estos insectos son conocidos comúnmente como “Vinchuca” en Bolivia, Argentina y Chile, “Chipo” en Venezuela, “Chiribico” en Colombia, “Chinche besucona u hocicona” en México o “Barberio” en Brasil, entre otros. El hombre puede infectarse con el parásito *T. cruzi* por las deyecciones de insectos infectados, que contienen tripomastigotes metacíclicos (Bern *et al.*, 2011; Roca Saumell *et al.*, 2015).

Transmisión por transfusión sanguínea. El riesgo de desarrollar Enfermedad de Chagas después de una transfusión de una unidad de sangre proveniente de un donante infectado ha sido estimado entre el 10 al 25% (Bern *et al.*, 2011). Debido a que los tripomastigotes son separados predominantemente en la fracción plaquetaria durante la centrifugación, se estima que es mayor el riesgo por transfusión de plaquetas que de cualquier otro componente sanguíneo (Rassi *et al.*, 2012).

Transmisión congénita, es una de las principales causas de infección en zonas urbanas y áreas no endémicas. Implica entre el 2-10% de los niños nacidos de madres infectadas con el parásito (Virreira *et al.*, 2003).

Transmisión por trasplante de órgano. Receptores no infectados reciben un órgano de un donante infectado con *T. cruzi*, llegando a desarrollar infección aguda (Bern *et al.*, 2011).

Transmisión oral. Constituye una ruta importante de transmisión en algunas regiones geográficas. Se da a través de alimentos y bebidas contaminados con parásitos (Mantilla *et al.*, 2011).

Fases de la Enfermedad

Se describen tres formas evolutivas para la Enfermedad de Chagas: fase aguda, fase crónica indeterminada (asintomática) y fase crónica determinada (sintomática) (Fuentes *et al.*, 2012).

FASE AGUDA

Esta fase se caracteriza por presentar parásitos en sangre y una reacción inflamatoria aguda. Con ausencia de tratamiento los síntomas persisten hasta por cuatro meses. Los síntomas son inespecíficos, se puede presentar fiebre, anorexia, diarrea, vómito, etc., siendo evidentes sólo en 5% de los infectados, con mayor frecuencia en niños (Mantilla *et al.*, 2011; Carod-Artal, 2013).

Cuando la vía de transmisión es vectorial, algunos pacientes presentan signos característicos de la enfermedad como una inflamación local en el sitio de inoculación e indurada eritematosa llamada Chagoma (Carod-Artal, 2013; Roca Saumell *et al* 2015), o si la inoculación se presenta en la conjuntiva se puede observar hinchazón unilateral del párpado superior e inferior, conocido como signo de Romaña (Bern *et al.*, 2011; Rassi *et al* 2012).

Durante la fase aguda, los parásitos infectan una gran variedad de tejidos, entre los cuales se encuentran ganglios linfáticos, bazo, hígado, músculo cardíaco, músculo esquelético, sistema nervioso y tracto intestinal (Espinoza *et al.*, 2011; Carod-Artal 2013).

La enfermedad aguda grave se produce en menos del 1% de los pacientes; presentando miocarditis aguda, derrame pericárdico y/o meningoencefalitis (Bern *et al.*, 2011), causando la muerte de las personas que los presentan.

El 95% de los pacientes con fase aguda se recupera de forma espontánea, para después entrar en la fase crónica asintomática o indeterminada (Fuentes *et al.*, 2012).

FASE CRÓNICA INDETERMINADA

Es un periodo de latencia caracterizada por una parasitemia baja o indetectable, además no se observa ningún síntoma clínico. Esta fase representa aproximadamente el 60 al 70% de los enfermos; los cuales aparentemente no presentan daño en órganos que pueda ser detectado a través de estudios radiológicos y electrocardiograma convencionales (Fuentes *et al.*, 2012; Rassi *et al.*, 2012). Sin embargo, estos individuos se caracterizan por presentar títulos de anticuerpos específicos contra *T. cruzi* (Carod-Artal, 2013).

Los individuos en esta fase pueden permanecer así hasta por un periodo de 10 a 30 años. Sin embargo, muchas otras personas permanecen asintomáticos por periodos más largos de tiempo e inclusive de por vida (Carod-Artal, 2013).

FASE CRÓNICA SINTOMÁTICA

Se estima que aproximadamente el 30% de las personas que cursan la fase crónica asintomática pueden desarrollar la fase crónica sintomática caracterizada por la presencia de síntomas clínicos tales como cardiopatía, megacolon o megaesófago (Fuentes *et al.*, 2012; Carod-Artal, 2013).

Uno de los problemas de la etapa crónica es que se puede manifestar durante el periodo más productivo de la vida, entre los 35 y 55 años de edad, por lo que requiere del empleo de terapias de soporte, como medicamentos, trasplantes de órganos, cirugías, etcétera, las cuales son costosas (Ramsey *et al.*, 2003), además, con el paso de los años, la infección puede causar muerte súbita o insuficiencia cardíaca por la destrucción progresiva del músculo cardíaco y/o digestivo (OMS, 2015).

Respuesta inmune del hospedero ante la Enfermedad de Chagas

El resultado de la enfermedad de Chagas está relacionado tanto con la virulencia del aislado o cepa del parásito como con la respuesta del hospedero a la infección (Machado *et al.*, 2012). El control de la infección con *T. cruzi*, observada en humanos y modelos animales de experimentación, depende tanto de la respuesta inmune innata como la adaptativa, éstas se activan durante la infección e involucran a macrófagos, células asesinas naturales (Natural Killer, NK), linfocitos T y B, producción de citocinas pro-inflamatorias, así como especies químicas reactivas intermediarias de Nitrógeno y Oxígeno (Machado *et al.*, 2012; Rezende-Oliveira *et al.*, 2012).

El reconocimiento inicial de los patógenos invasores por el sistema inmune es mediado principalmente por los receptores tipo Toll (TLR). En la infección con *T.*

cruzi, los antígenos derivados del parásito (ADN, glicoconjugados de la membrana, entre otros) desencadenan la respuesta inmune innata a través de su interacción con los TLR, en particular TLR-2, TLR-4 y TLR-9, que se encuentran en macrófagos y células dendríticas cercanas al sitio de infección (Basso, 2013). Esta activación induce la síntesis de diversas citocinas pro-inflamatorias como la interleucina 6 (IL-6), TNF- α e interleucina 12 (IL-12); activan la sintasa de óxido nítrico inducible (iNOS) aumentando la producción de moléculas de Oxígeno Nítrico (ON) con el que se elimina a los parásitos dentro de la vacuola una vez fagocitados por los macrófagos (Machado *et al.*, 2012b; Rezende-Oliveira *et al.*, 2012; Basso, 2013;).

Los antígenos de *T. cruzi* también activan células NK, las cuales a su vez producen INF- γ , que aumenta la producción de IL-12, TNF- α y ON en los macrófagos, lo que contribuye a la eliminación del parásito. A su vez, tanto macrófagos como células NK sintetizan citocinas reguladoras como IL-4 e IL-10, las cuales reducen los efectos nocivos asociados al exceso de estimulación del sistema inmune (Basso, 2013). Particularmente, la IL-10 es un potente inhibidor de INF- γ , por lo que la resistencia a la infección de *T. cruzi* es el resultado del balance entre las citocinas INF- γ e IL-10 (Machado *et al.*, 2012b). Además, las citocinas mencionadas promueven la generación de células tipo Th1 CD4⁺ y CD8⁺, importantes en el control de la infección aguda (Machado *et al.*, 2012b).

Una vez que la infección progresa, se activan los mecanismos de respuesta inmune adaptativa a través de las respuestas Th1 y Th2 (Basso, 2013). En la inmunidad adaptativa, los linfocitos Th1 proporcionan ayuda para la adecuada producción de anticuerpos y células citotóxicas T CD8⁺ (Rodrigues *et al.*, 2012).

La infección con *T. cruzi* induce la activación policlonal de linfocitos B, teniendo como resultado una hipergammaglobulemia. Las inmunoglobulinas de subclase IgG están involucradas en la eliminación del parásito a nivel local y sistémico a través de mecanismos tales como la fijación del complemento, aglutinación y

citotoxicidad (Basso, 2013). En especial, se observa que el anticuerpo IgG₂ puede contribuir junto con otros mecanismos a la reducción de la parasitemia al reconocer antígenos de *T. cruzi* y opsonizarlos, volviendo al parásito más susceptible a la lisis (Umekita y Mota, 2000).

Sin embargo, no hay que olvidar que el parásito cuenta con diversos mecanismos de evasión de la respuesta inmune del hospedero para lograr una infección efectiva.

T. cruzi tiene la capacidad de invadir casi cualquier célula nucleada del hospedero porque cuenta con diversas moléculas de superficie, tales como transalidasas y mucinas, que le permiten anclarse e invadir las células dando lugar a la formación de la vacuola parasitófora (Nardy *et al.*, 2015; Cardoso *et al.*, 2016).

Durante la unión de la vacuola parasitófora con el lisosoma, la supervivencia de *T. cruzi* es mediada por la segregación de enzimas antioxidantes, como peroxidasas y superóxido dismutasas (SODs) (Cardoso *et al.*, 2016), y el bloqueo de la transcripción de las citocinas secretadas por los macrófagos (Nardy *et al.*, 2015). La acidificación del medio que ocurre en esta unión contribuye a la ruptura de la membrana del, ahora, fagolisosoma y a la diferenciación en el citoplasma de la forma tripomastigote a la forma amastigote del parásito (Cardonna y Burleigh, 2011; Cardoso *et al.*, 2016).

Otros mecanismos de evasión de la respuesta inmune del hospedero por parte de *T. cruzi* son: las proteínas de superficie GP160 y calreticulina, las cuales evitan la lisis mediada por el complemento y la opsonización, y la activación policlonal de células B y la hipergammaglobulemia por mitógenos derivados del parásito; que deriva en la producción de anticuerpos no específicos para el parásito y por consiguiente no eficientes para controlar la infección (Cardoso *et al.*, 2016).

Diagnóstico

El diagnóstico de la Enfermedad de Chagas se establece con base a pruebas de laboratorio en personas que se sospecha de la presencia del parásito (Mantilla *et al.*, 2011).

El diagnóstico puede hacerse con pruebas parasitológicas directas e indirectas que demuestren la existencia de *T. cruzi*. Estas varían dependiendo la fase de la enfermedad en la que se encuentre la persona.

En la fase aguda los tripomastigotes en circulación pueden ser detectados por métodos directos (Xenodiagnóstico, examen microscópico por gota gruesa, frotis de sangre con tinción de Giemsa, microhematocrito y técnica de Strout) y por métodos moleculares (PCR en punto final y PCR en tiempo real) (Bern *et al.*, 2011; Mantilla *et al.*, 2011).

Durante la fase crónica de la enfermedad, la cantidad de parásitos en circulación es muy baja e incluso ausente; por tanto, la detección de anticuerpos IgG anti-*T. cruzi* circulantes (pruebas serológicas) ha sido el método más utilizado para su diagnóstico. De estos métodos, los más comunes son la hemoaglutinación, la inmunofluorescencia y ELISA, los cuales pueden dar lugar a tasas de sensibilidad y especificidad superior al 90% (Mantilla *et al.*, 2011; Roca Saumell *et al.*, 2015). De acuerdo a los criterios internacionales, se consideran a un paciente positivo a Tripanosomiasis cuando presenta dos técnicas serológicas positivas, cuando los resultados son discordantes o dudosos es necesario realizar una tercera prueba confirmatoria (Roca Saumell *et al.*, 2015).

En recién nacidos de madres con Enfermedad de Chagas es recomendable realizar pruebas parasitológicas directas (microhematocrito o PCR) durante el primer mes de vida para detectar el parásito o el DNA del mismo y reservar las pruebas serológicas a partir de los 9 meses de edad (Bern *et al.*, 2011; Roca Saumell *et al.*, 2015).

Tratamiento

Actualmente los únicos fármacos específicos para el tratamiento de la Enfermedad de Chagas son Nifurtimox y Benznidazol, los cuales fueron desarrollados hace más de 30 años (Fuentes *et al.*, 2012). Ambos fármacos están contraindicados en mujeres embarazadas y en pacientes con insuficiencia renal o hepática severa (Roca Saumell *et al.*, 2015).

Estos fármacos son útiles contra tripomastigotes circulantes de *T. cruzi* así como también contra las formas amastigotes. La eficacia varía entre pacientes, fase de la enfermedad y cepa del parásito (Corad-Artal, 2013).

La administración de estos fármacos durante la fase aguda, limita la carga parasitaria en sangre y los síntomas clínicos. Se desconoce la eficacia del tratamiento farmacológico durante la etapa crónica asintomática, y la eficacia del tratamiento es limitada durante la fase crónica sintomática (Fuentes *et al.*, 2012; Carod-Artal, 2013).

Ambos medicamentos presentan reacciones adversas, entre las más frecuentes se encuentran la anorexia, náuseas, vómitos y, en menor medida, dolor abdominal, diarrea, pérdida de peso, irritabilidad, somnolencia y alteraciones psiquiátricas (Corod-Artal, 2013; Roca Saumell *et al.*, 2015). La poca tolerancia a las reacciones adversas son un factor importante en el abandono del tratamiento (Fuentes *et al.*, 2012).

4. Antecedentes

Obesidad y Enfermedad de Chagas

La interacción entre el parásito *T. cruzi* y el tejido adiposo se conoce desde que se definieron, en 1940, los “lipochagomas” (inflamación de la bolsa adiposa de Bichat) en niños; posteriormente se observó un frecuente e inusual tropismo de *T. cruzi* hacia tejido adiposo murino, en el cual se observó que las gotas lipídicas eran rodeadas por la forma amastigote del parásito (Andrade *et al.*, 1995).

Sin embargo, fue en el año 2005 cuando se apreció la importancia del parasitismo del tejido adiposo durante la infección con *T. cruzi*, con la publicación de Combs y colaboradores. En ella se reportaba que el cultivo de adipocitos podía ser infectado con *T. cruzi* (cepa Brasil) con alta eficiencia; observándose un número considerable de parásitos intracelulares alrededor de las gotas lipídicas. Además esta infección influía en la expresión de citocinas, se reportaba un aumento de TLR-2, TNF- α , IL-1 β e INF- γ , así como disminución de adiponectina. En estudios *in vivo*, utilizaron ratones CD1 infectados con la misma cepa de *T. cruzi*, determinando la carga parasitaria en diferentes tejidos (tejido adiposo blanco, tejido adiposo marrón, corazón y bazo). Se observó que la mayor carga parasitaria la presenta el tejido adiposo blanco en comparación a los otros órganos en donde los parásitos se podían observar hasta 300 días después de la infección. Lo que llevó a concluir que los adipocitos pueden funcionar como reservorio del parásito en la fase crónica de la enfermedad.

Tres años después, en 2008, el grupo de Nagajyothi reportó que el cultivo de adipocitos, al ser infectados con *T. cruzi* cepa Tulahuén, presentan un incremento en la expresión de las citocinas y quimiocinas pro-inflamatorias: IFN- γ , TNF- α , CCL2, CCL5 y CXCL10, así como un incremento en la expresión de TLR-2 y TLR-9. Lo cual sugiere que el adipocito es un blanco importante de *T. cruzi* y contribuye en la respuesta inflamatoria que se presenta durante la Enfermedad de Chagas.

En 2010 Nagajyothi y colaboradores, reportaron que ratones db/db (obesos por carecer del receptor de leptina) al ser infectados con *T. cruzi* (cepa Brasil) tenían mayor mortalidad, parasitemia, reducción de masa grasa y bajos niveles de glucosa en sangre; además, mostraban aumento significativo de citocinas y quimiocinas en comparación con el grupo control. En 2011, demostraron que los receptores de lipoproteínas de baja densidad (rLDL) juegan un papel importante en la invasión de la célula del hospedero por *T. cruzi* y la subsecuente fusión de la vacuola parasitófora con el compartimento lisosomal de la célula infectada.

Teniendo en cuenta lo anterior, Nagajyothi y colaboradores (2014), realizaron un estudio con ratones CD1 infectados con *T. cruzi* (cepa Brasil), los cuales fueron alimentados por 35 días después de la infección con una dieta alta en grasas y el grupo control alimentados con dieta regular. Concluyeron que la dieta alta en grasa proporcionaba cierta protección a los ratones pues presentaban menor mortalidad, menor parasitemia, menor número de parásitos en tejido cardíaco, pero mayor carga parasitaria en tejido adiposo en comparación al grupo control.

Por otra parte, escasa información se sabe de la relación que pudiera tener la obesidad en humanos y la infección con *T. cruzi*, sólo Barreto y colaboradores en 2003 observaron que en una población mayor a 60 años en Bambuí, Brazil (área endémica de Enfermedad de Chagas) las personas con obesidad infectadas con *T. cruzi* son menos a las personas no obesas infectadas, además se observó mayor daño cardíaco en éstas últimas.

5. Justificación

Es bien sabido que el adipocito funciona como blanco y reservorio para el parásito *T. cruzi*. Además, se ha reportado que el tejido adiposo es capaz de desencadenar la respuesta inflamatoria específica para controlar la infección. Sin embargo, aún no se conoce lo que puede ocurrir en la interacción entre obesidad y diferentes cepas o aislados de *T. cruzi* ya que la mayoría de los ensayos han sido realizados con la cepa Brasil, la cual se desconoce si es similar a las cepas que circulan en el país.

Además, los pocos estudios realizados con relación a esta interacción han utilizado ratones obesos por modificación genética (*ob/ob*), que sólo pone en evidencia el papel crucial de la leptina en la inmunidad, y no es muy claro si el tipo de obesidad inducida por alimentación hipercalórica juega un papel importante en el desarrollo de la enfermedad.

Además se sabe que la cantidad de grasa acumulada entre ratones machos y hembras es diferente, por lo tanto la respuesta inmunitaria, la susceptibilidad, la resistencia y el desarrollo de la enfermedad pudieran ser diferentes. Sin embargo, hasta la fecha no se ha realizado un ensayo que considere estos puntos.

Como ya se comentó el desarrollo de la Enfermedad de Chagas en modelo murino es altamente similar en humanos por lo que los resultados obtenidos pudieran ayudar a esclarecer lo que sucede en la infección de humanos obesos con *T. cruzi*. Con el 71.3% de su población con sobrepeso u obesidad, México ocupa actualmente el primer lugar de obesidad a nivel mundial. Al mismo tiempo, tres cuartas partes del territorio nacional es área endémica de la Enfermedad de Chagas, por lo que la presencia de ambas afecciones en un mismo individuo es muy común, sin embargo, se desconoce los resultados que podrían tener.

6. Objetivos

Objetivo general

Comparar el desarrollo de la infección de *Trypanosoma cruzi* ratones obesos y ratones no obesos infectados con una cepa mexicana.

Objetivos particulares

Establecer un modelo de Obesidad hipercalórica en modelo murino.

Observar el curso de la parasitemia que presentan los ratones obesos y los ratones controles.

Evaluar el tropismo en órganos blanco (corazón, bazo, intestino delgado, intestino grueso y tejido adiposo) en ambos grupos de ratones infectados con *Trypanosoma cruzi*.

Determinar diferencias en infección, muerte y tropismo entre ratones obesos y no obesos machos y hembras.

7. Hipótesis

Durante la inflamación crónica de bajo grado que se presenta en la obesidad, se incrementa la expresión de citocinas pro-inflamatorias y se activan algunos componentes de la inmunidad innata, es por esto que se espera que los ratones obesos, al ser infectados con *Trypanosoma cruzi*, presenten una mejor respuesta inmunológica que impacte en menor carga parasitaria y menor muerte.

8. Métodos y Materiales

Animales experimentales

Se emplearon ratones Balb/c (hembras y machos), de 6-8 semanas de edad, obtenidos del bioterio de la Escuela de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional.

Los animales se mantuvieron en un ciclo estándar de 12 horas luz/oscuridad y con acceso a alimento y agua *ad libitum* (dieta estándar o dieta de cafetería).

Todos los protocolos con animales de experimentación se apegaron a lo estipulado en el Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud (Ley General de Salud) NOM-062-ZOO-1999, “Especificaciones Técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio”.

Los animales fueron divididos en hembras y machos, y éstos a su vez fueron divididos en otros dos grupos dependiendo la dieta administrada, quedando dos grupos de casos: Machos alimentados con dieta de cafetería (Machos obesos: MO) y Hembras alimentadas con dieta de cafetería (Hembras obesas: HO). Y dos grupos controles: Machos alimentados con dieta estándar (Machos Controles: MC) y Hembras alimentadas con dieta estándar (Hembras Controles: HC).

Dieta por grupo

Los animales fueron alimentados según al grupo que pertenecían con una de las dos dietas siguientes: Dieta estándar o Dieta hipercalórica.

Dieta estándar, consistió en alimento comercial (Rodent Laboratory Chow® número MO63144) para ratones, el cual contiene por cada 100g de alimento: 21% de proteína, 55% de carbohidratos, 11% de lípidos, 5% fibra, 5% de cenizas y 3% vitaminas y minerales; sumando 3.03 kcal/g.

Dieta hipercalórica, fue realizada de acuerdo a los trabajos de Zambon *et al.*, 2009 y Reuter, 2007, para ello se pulverizó el alimento de ratón Rodent Laboratory Chow®, el cual fue suplementado con los siguientes ingredientes: crema de maní, aceite de maíz, chocolate pulverizado y galletas de trigo, en donde 100g del alimento tenía 20% de proteína, 48% de carbohidratos, 20% de lípidos, 4% de fibra, 5% de ceniza y 3% de vitaminas y minerales sumando 5.12kcal/g. La mezcla se peletizó y secó a $55\pm 5^{\circ}\text{C}$ por aproximadamente 3 horas, los pellets se conservaron a -20°C hasta su uso. Los ratones MO y HO fueron alimentados con esta dieta por 12 semanas previas a la infección.

Parásitos

Se utilizó la cepa mexicana Ninoa (MHOM/MX/1994/Ninoa) de *T. cruzi*, la cual pertenece a la DTU TcI que presenta una baja virulencia pero, se sabe que infecta el tejido cardíaco de ratones Balb/c e induce a una respuesta inmune cardíaca y sistémica (Espinoza *et al.*, 2011).

Las formas tripomastigotes del parásito fueron obtenidas de sangre de ratones infectados. Transcurridas 12 semanas de alimentación con las respectivas dietas, los cuatro lotes de ratones fueron infectados vía intraperitoneal (I.P.) con 1×10^4 tripomastigotes de *T. cruzi*.

Parasitemia

Para determinar la parasitemia se realizaron semanalmente cortes menores de 5 mm en la cola de los ratones y, se obtuvo de 5 a 20 μL de sangre, posteriormente se realizó una dilución 1:80 y, se determinó la carga parasitaria empleando cámara de Neubauer.

Obtención de órganos

Los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical a los 22 días post-infección (punto máximo de parasitemia), inmediatamente se extrajeron los órganos blanco de infección: Corazón, Bazo, Intestino Delgado, Intestino Grueso y

Tejido Adiposo. Éstos fueron separados en tubos de 1.5ml que contenían TRIzol® Reagent (ThermoFisher scientific número de catálogo 15596026); posteriormente fueron conservados en congelación a -80°C hasta su posterior uso.

Los cadáveres fueron manejados de acuerdo a los lineamientos de la norma NOM-087-ECOL-SSA1-2002, depositados en bolsas color rojo y, posteriormente, en contenedores para residuos peligrosos biológicos infecciosos hasta su incineración.

Extracción DNA

Previo a la extracción de DNA, particularmente el intestino delgado y el intestino grueso fueron perfectamente lavados con Buffer Fosfato Salino (PBS) 1X, pH=7.4, para retirar materia fecal que estuviera presente.

La extracción de DNA de todos los órganos se realizó utilizando la técnica Fenol-Cloroformo modificada (Martínez *et al.*, 2006) (Anexo I).

El DNA se resuspendió en 20 µL de agua Milli-Q estéril y finalmente el DNA fue cuantificado por espectrofotometría y la integridad del mismo fue determinada mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio (0.5 µg/mL) y utilizando buffer TAE 1X (40mM Tris, 20mM acetato, 1mM EDTA); seguido de visualización con un transiluminador UV (Carestream 212 Pro).

Para la extracción de DNA del tejido adiposo se utilizó una modificación del protocolo de Gullicksen para el uso en tejido adiposo (Gullicksen *et al.*, 2004) (Anexo I).

Presencia del parásito en órganos mediante (PCR)

Para determinar la presencia del parásito *T. cruzi* en los órganos extraídos, un fragmento de 350pb fue amplificado por PCR en un termociclador Axygen Maxygene, usando los siguientes cebadores de oligonucleótidos:

TC1 (5'-GTGTCCGCCACCT-CCTTCGGGCC-3'),
TC2 (5'-CCTGCAGGCACACGTGTGTG TG-3') y
TCC (5'-CCCCCTCCCAGGCCACACTG-3') que amplifican el espaciador
intergénico del gen miniexón (Ávila *et al.*, 1991).

La mezcla de reacción para la PCR de cada muestra fue analizada a las concentraciones de DNA de 500, 1000 y 2000 ng, Buffer de PCR (1X), dNTP's (1X), 2 U de Taq polimerasa, 2 mM de MgCl₂, 2.5% de Tritón X-100, 0.2 mM de los iniciadores mencionados y agua para completar un volumen final de 25 µL.

El protocolo de amplificación fue el siguiente: después de la desnaturalización a 94°C por 5 minutos, se realizaron 40 ciclos a 94°C por 30 segundos, seguido por 30 segundos a 55°C, continuando con 72°C por 30 segundos. Las reacciones fueron terminadas por una extensión final a 72°C por 7 minutos.

En cada PCR se incluyeron controles positivos y negativos.

Los productos de amplificación fueron observados por electroforesis en gel de agarosa al 1% en buffer TAE 1X (40mM Tris, 20mM acetato, 1mM EDTA), teñidos con Bromuro de etidio (0.5 µg/mL) y visualizados con un transiluminador UV (Carestream 212 Pro).

Análisis estadístico

Para los resultados de peso y parasitemia se realizó prueba de U de Mann-Whitney en el programa estadístico Minitab.

También se expresaron los porcentajes de diferencia en peso, parasitemia y número de muestras positivas en la amplificación del gen miniexon por PCR.

9. Resultados

Dieta y Peso

El primer paso fue inducir obesidad en los individuos de los grupos machos y hembras experimentales (MO y HO) al ser alimentados con una dieta hipercalórica. Al cabo de doce semanas con su respectiva alimentación, la diferencia en el aspecto físico de los individuos de los grupos experimentales con respecto a los individuos de los grupos control (MC y HC) fue evidente (Figura 9).

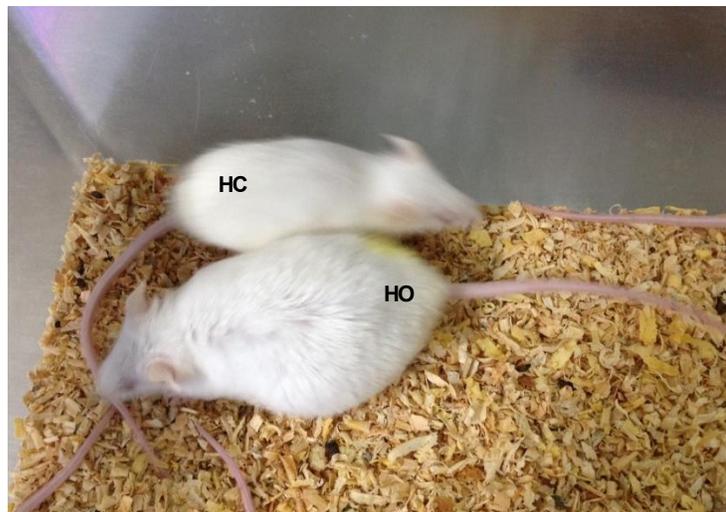


Figura 9: Fotografía de un ratón hembra alimentado con Dieta de cafetería (HO) junto a un ratón hembra alimentado con dieta estándar (HC) en donde se observa la diferencia en el aspecto físico de ambos animales.

Lo anterior fue corroborado al comparar los pesos promedio de cada grupo, en donde se obtuvo una diferencia significativa ($p \leq 0.05$) entre los grupos experimental y control de ambos sexos (Figura 10).

En porcentajes, se observó un 36.7% de mayor peso corporal en los ratones machos alimentados con dieta hipercalórica (MO) respecto a los ratones macho alimentados con dieta estándar (MC); entre los ratones hembra HO y los ratones hembra HC hubo un 60.4% de diferencia en el peso corporal. Al comparar los grupos MO y HO se observó una diferencia del 20.5% de mayor peso en las hembras.

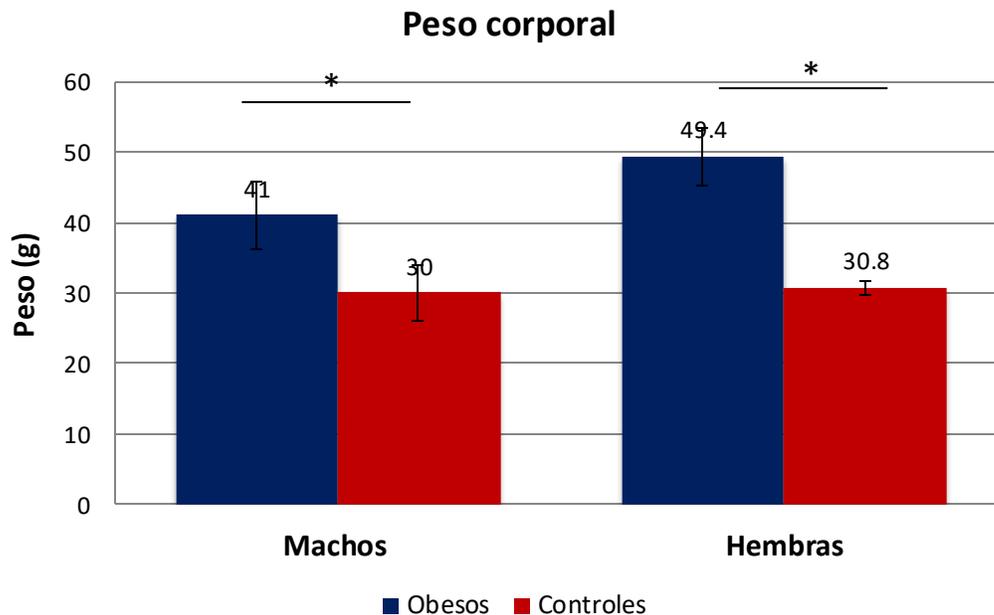


Figura 10: Diferencia en el peso corporal entre los ratones alimentados con dieta hipercalórica en comparación a los ratones alimentados con dieta estándar de ambos sexos. n=5, p≤0.005.

Carga parasitaria en sangre

Al comparar la parasitemia al día 22pi (punto máximo reportado en la literatura) de los cuatro grupos, se observó que los ratones obesos, tanto hembras como machos, presentaban una menor carga parasitaria en comparación a su respectivo grupo control (Figura 11).

Los ratones machos control, alimentados con dieta estándar, presentaron un 47.7% más parásitos en sangre que los ratones machos obesos. Por su cuenta, los ratones hembra control tuvieron un 60.5% más parásitos con respecto al grupo de ratones hembra obesas.

Ambos grupos de ratones hembras presentaron una mayor carga parasitaria en sangre frente a los grupos de ratones macho (Figura 11). Los ratones del grupo HC mostraron un 83.1% más parásitos en sangre en comparación a los individuos

del grupo MC. La diferencia observada entre los grupos HO y MO fue de 132.2% más de parasitemia en el grupo de las hembras.

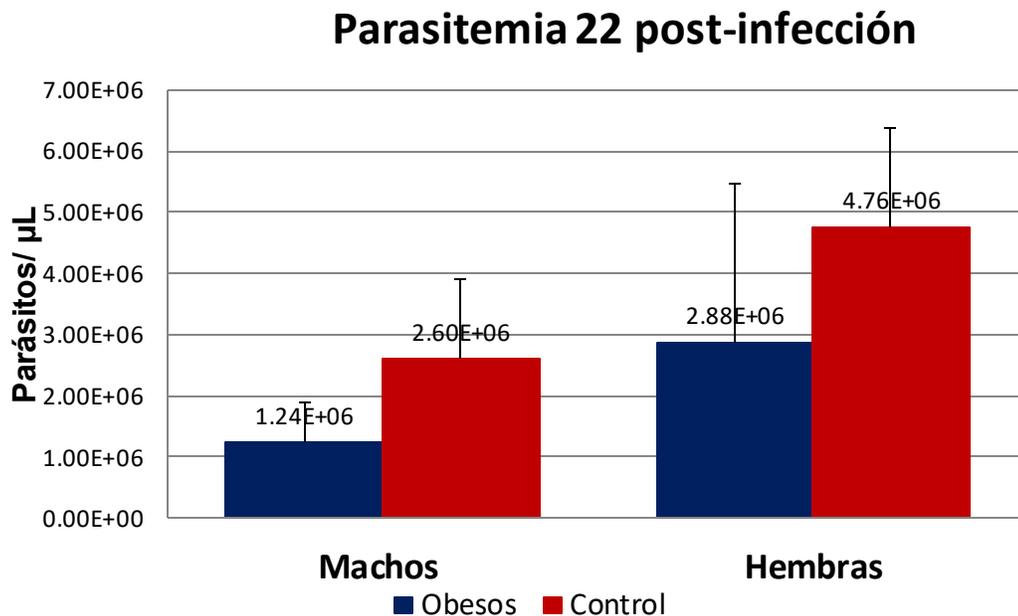


Figura 11: Carga parasitaria en sangre de ratones infectados con la cepa ninoa en el pico máximo de parasitemia de ratones obesos en comparación a ratones control. $p=0.01$, $n=5$.

La diferencia observada en los grupos no fue estadísticamente significativa, se obtuvo una $p=0.23$ al comparar los grupos MO y MC, y un valor de $p=0.20$ entre los grupos HO y HC. Sin embargo, se observó que existe una tendencia a presentar menor parasitemia en los individuos obesos.

Al hacer el seguimiento de la parasitemia a través del tiempo, se confirmó la misma tendencia: los ratones obesos, hembras y machos, presentan en una menor carga parasitaria en sangre (Figura 12 y13).

Para los grupos controles en el día 22pi, el número de parásitos en sangre, presentados en la curva, es mayor en las hembras que en los machos (Figura 12 y 13).

Se presentó un pico de parasitemia en el día 20 pi para los ratones HO, en el caso de los ratones HC se observaron dos picos de parasitemia a los días 20 y 24 pi (Figura 12).

En el caso de los ratones MO, se observó un pico de parasitemia al día 24 pi, para los ratones MC se observaron dos picos de parasitemia a los 20 y 24 días pi (Figura 13).

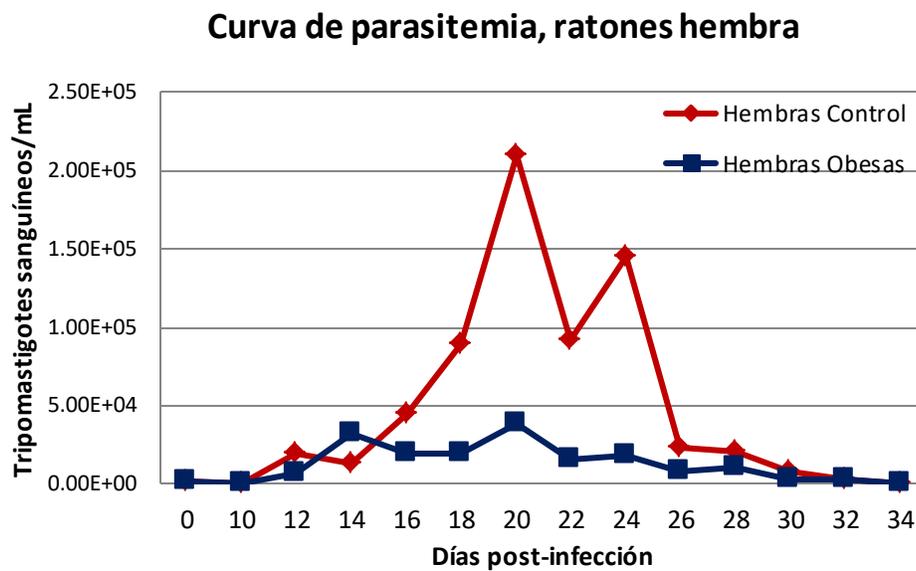


Figura 12: Curva de carga parasitaria en sangre de ratones hembra infectados con la cepa Ninoa. n=5.

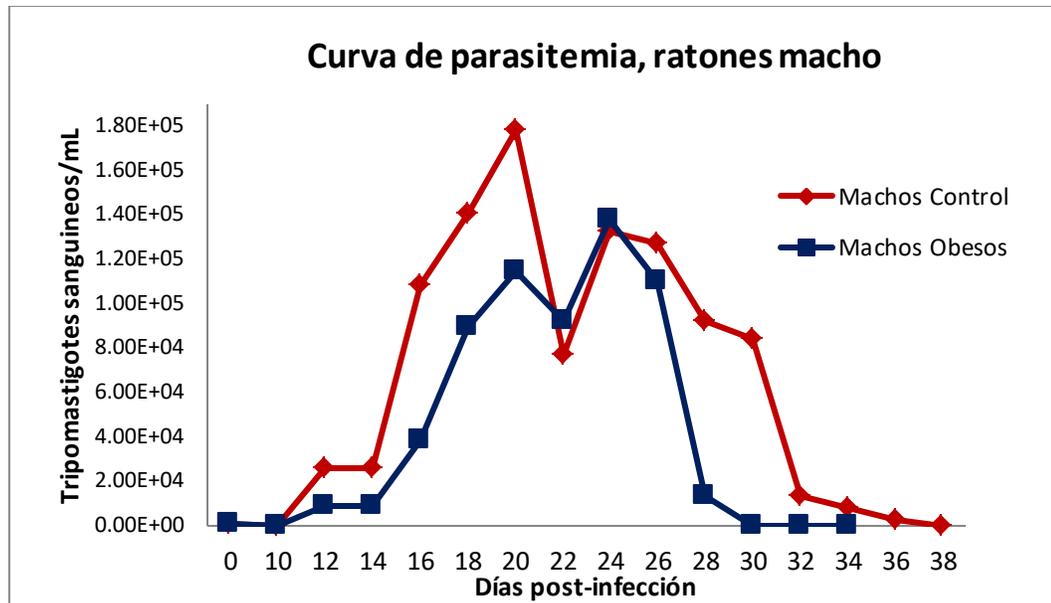


Figura 13: Curvas de carga parasitaria en sangre de ratones macho infectados con la cepa Ninoa. n=5.

Tropismo

Al determinar la presencia del parásito en corazón e intestinos mediante la amplificación por PCR del gen miniexon de *T. cruzi*, se observó que, en general, la intensidad de las bandas correspondientes a los individuos obesos, hembras y machos, era menor en comparación a la intensidad de las bandas pertenecientes a los individuos controles (Figuras 14-19).

En contraste, resultados negativos para las muestras provenientes de bazo para todos los grupos de ratones (hembras y machos, obesos y control) fueron observados (Figuras 20 y 21), para todas concentraciones de DNA (500, 1000 y 2000 ng).

Sorprendentemente, se observó que el comportamiento se invirtió al amplificar el gen miniexon de DNA proveniente de tejido adiposo. Las bandas resultantes de muestras de ratones obesos, machos y hembras, fueron más intensas en comparación a las bandas provenientes de los ratones control (Figura 22).

En general, se obtuvo un 60% de muestras positivas para el DNA proveniente de corazón de ratones MO y MC (Figura 14). Por otro lado, para las muestras de corazón del grupo HO se observó un 80% de positivos frente a un 100% de positivos para las muestras del grupo HC (Figura 15).

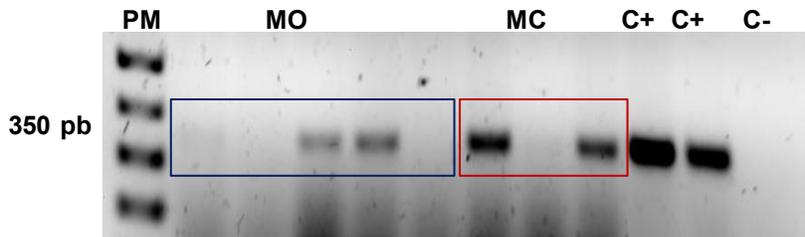


Figura 14: Amplificación por PCR del gen miniexon para **corazón** de ratones macho obesos (■) y ratones macho control (□). Amplicón de 350 pb.

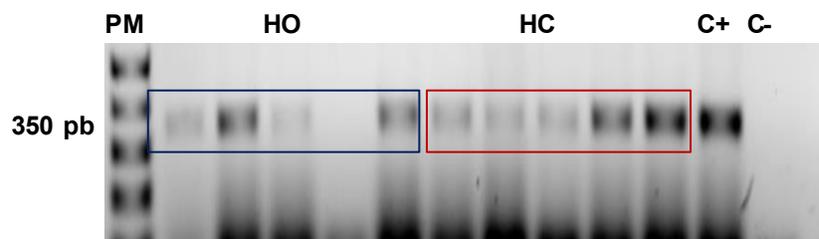


Figura 15: Amplificación por PCR del gen miniexon para **corazón** de ratones hembra obesos (■) y ratones hembra control (□). Amplicón de 350 pb.

En el caso del DNA proveniente de intestino grueso, para el grupo MO se obtuvo un 50% de muestras positivas, mientras que para el grupo MC se obtuvo un 33% (Figura 16).

Para el caso de los ratones hembra, se observó un 25% de muestras positivas para el grupo HO frente a un 40% de muestras positivas para el grupo HC (Figura 17).

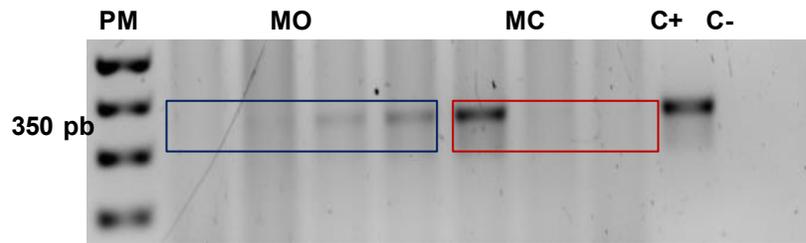


Figura 16: Amplificación por PCR del gen miniexon para **Intestino grueso** de ratones macho obesos (□) y ratones macho control (□). Ampliación de 350 pb.

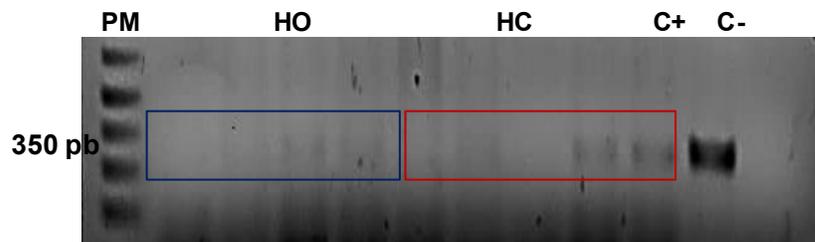


Figura 17: Amplificación por PCR del gen miniexon para **Intestino grueso** de ratones hembra obesos (□) y ratones hembra control (□). Ampliación de 350 pb.

En muestras de intestino delgado se observó 25% y 100% de positividad para los grupos MO y MC, respectivamente (Figura 18). Para los grupos HO y HC se obtuvo 100% y 80% (Figura 19).

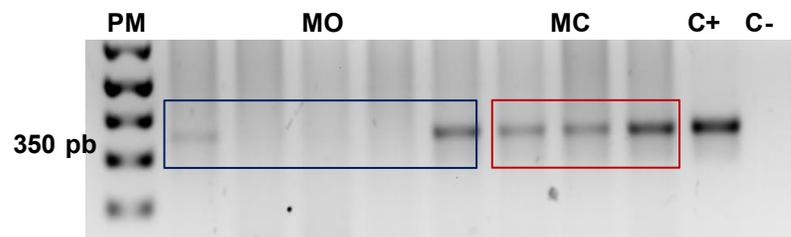


Figura 18: Amplificación por PCR del gen miniexon para **Intestino delgado** de ratones macho obesos (□) y ratones macho control (□). Ampliación de 350 pb.

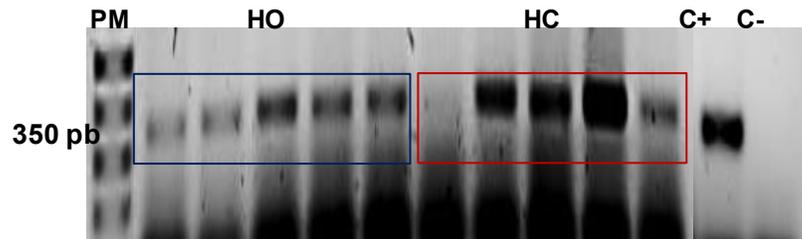


Figura 19: Amplificación por PCR del gen miniexon para **Intestino delgado** de ratones hembra obesas (□) y ratones hembra control (□). Ampliación de 350 pb.

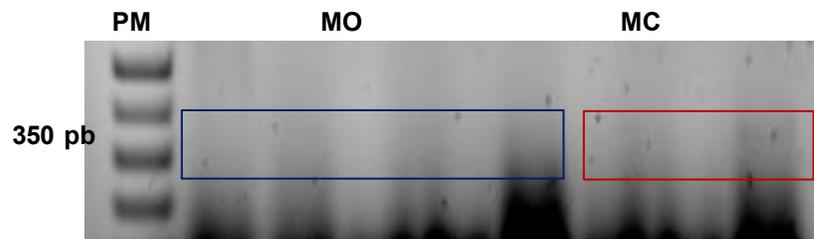


Figura 20: Amplificación por PCR del gen miniexon para **bazo** de ratones macho obesos (□) y ratones macho control (□). Ampliación de 350 pb.

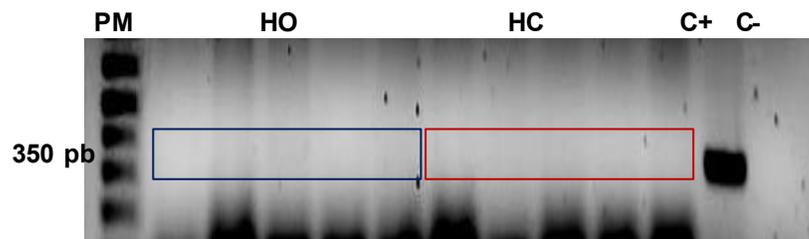


Figura 21: Amplificación por PCR del gen miniexon para **bazo** de ratones hembra obesas (□) y ratones hembra control (□). Ampliación de 350 pb.

En el caso del tejido adiposo, exclusivamente para muestras de ratones hembra, se observó un 80% de positivos para el grupo HO y 50% para el grupo HC (Figura 22).

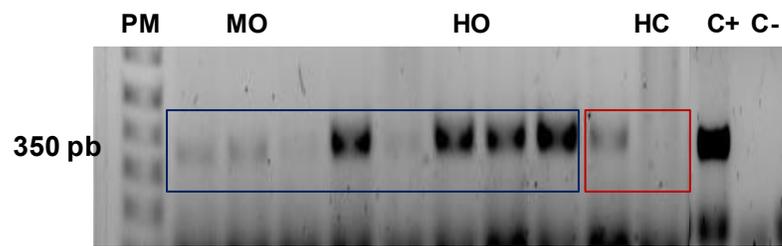


Figura 22: Amplificación por PCR del gen miniexon para **tejido adiposo** de ratones obesos, machos y hembras, (□) y ratones hembra control (□). Amplicón de 350 pb.

10. Discusión

Los actuales hábitos alimenticios y el sedentarismo de la población mexicana han resultado en un drástico aumento en la incidencia de obesidad en nuestro país, lo que a su vez incrementa la susceptibilidad a padecer afecciones agregadas e infecciones por agentes patógenos, entre los que se encuentra el parásito *T. cruzi*, y a pesar que ambas afecciones son problemas de salud prioritarios en nuestro país y en el mundo, se desconoce si la obesidad pudiera ser un factor protector o de susceptibilidad en el humano.

Pocos estudios se han abordado principalmente empleando el modelo murino con cepas sudamericanas del genotipo DTU II, o una combinación de DTU I y II, por lo que se ignora la asociación entre obesidad e infección con parásitos del genotipo DTU I, el cual se encuentra principalmente en México (Bosseno *et al.*, 2002). Esto es particularmente importante, ya que el parásito *per se* exhibe gran variación intraespecífica, aunada a la conferida por la ubicación geográfica, que en conjunto, determinan la constitución antigénica, la virulencia, el histotropismo, los niveles de parasitemia y la expresión de componentes del sistema inmunitario, dirigiendo el objetivo del presente trabajo al estudio de las características de una de las cepas circulantes en nuestro país en individuos obesos.

Por otra parte, se sabe que el desarrollo de la Enfermedad de Chagas en modelo murino es altamente similar en humanos por lo que los resultados obtenidos pudieran ayudar a esclarecer lo que sucede en la infección de humanos obesos con *T. cruzi*.

Dieta y Peso

La gran similitud y homología entre los genomas de los pequeños roedores y los humanos, la tendencia de gustos complejos y un sistema digestivo que les permite consumir diversos alimentos y bebidas, han vuelto a estos animales, ratas y ratones, el estándar de oro para el estudio de la obesidad inducida por dieta hipercalórica (Von Diemen *et al.*, 2006. Thibault, 2013).

En estudios anteriores se han reportado tiempos de alimentación hipercalórica de 3 a 20 semanas para inducir obesidad, los cuales dependen de la cepa, edad, sexo y peso inicial de los animales utilizados así como la composición de la dieta suministrada (Von Diemen *et al.*, 2006. Zambon *et al.*, 2009. Campos Rosini *et al.*, 2012). En el presente estudio el tiempo empleado para cepas de raton Balb/c recién destetados fue de 12 semanas, tiempo en el cual los ratones tuvieron una ganancia mínima de peso del 30% en comparación con los grupos controles, esta proporción de peso fue establecida por Thibault en el 2013 para definir obesidad en ratones, este periodo de tiempo pudo haberse debido a la proporción de grasas y carbohidratos en la dieta y a la edad de los ratones empleados.

Interesantemente en ese mismo tiempo, observamos diferencias significativas en la ganancia de peso entre machos y hembras. En el grupo de ratones macho MO observamos un aumento del 36.7% de peso corporal desarrollando obesidad moderada, en tanto que el grupo de hembras HO se observó un aumento del 60% de peso corporal adquirieron obesidad severa. La diferencia entre ambos grupos de ratones alimentados con dieta hipercalórica es de 20%, es decir, las hembras tienden a desarrollar un mayor grado de obesidad que los machos. Esta misma tendencia se observa en los humanos, en donde las mujeres presentan mayor proporción de tejido adiposo que los hombres (ENSANUT, 2012).

Parasitemia

En 2010 Nagajyothi y colaboradores, reportaron mayor mortalidad y parasitemia en ratones obesos knockeados en el gen del receptor de leptina, infectados con *T. cruzi*, en comparación a los ratones control. Interesantemente, en nuestro estudio observamos resultados opuestos a los del equipo de Nagajyothi (2010), es decir, mayor carga parasitaria en ratones controles que en los obesos. Estas diferencias posiblemente son debidas a factores como: el tipo de inducción de la obesidad, ya que en nuestro modelo, la obesidad fue desarrollada por dieta hipercalórica, y no por la deficiencia de la acción de la leptina, ya que es sabido que esta adipocitocina también participa en otros procesos como los inmunitarios (Hedge y

Dhurandhar, 2013); lo que posiblemente pudo haber sido un factor importante para observar estas diferencias; otro factor importante en estas diferencias es la cepa del parásito utilizada, ya que por primera vez se ha empleado una cepa mexicana del genotipo DTU1 en estudios de esta asociación, la cepa Ninoa es ampliamente usada en México y se sabe que es una cepa de características miotrópicas de baja patogenicidad con bajas cargas parasitarias, en contraste, la cepa Brazil y la cepa Y son cepas que desarrollan mayores lesiones en los órganos y menores cargas parasitarias en sangre. Por último y no menos importante, la cantidad de tejido adiposo también pudo ser importante para observar estas diferencias en la carga parasitaria entre ambos grupos.

Por otra parte, es conocido que en diversas enfermedades causadas por virus, bacterias, hongos y parásitos la existencia de dimorfismo durante la infección de machos y hembras determina la intensidad y el curso de la misma, en donde la susceptibilidad, la mortalidad y la respuesta inmune ante los agentes patógenos son claramente diferentes entre machos y hembras (Zuk y McKean, 1996), sin embargo, para la enfermedad de Chagas pocos estudios se han llevado a cabo. Hauschka (1947) reportó para tres diferentes modelos murinos infectados con la cepa Brazil mayor parasitemia y susceptibilidad en ratones macho en comparación a las hembras. Resultados similares fueron reportados por Chapman y colaboradores (1975) para ratones CF₁ infectados con la cepa Brazil de *T. cruzi*. Por otra parte, Albuquerque y colaboradores (2008) reportaron, mayor parasitemia en ratones *Mus musculus* hembra que en ratones macho al ser inoculados con 2×10^4 tripomastigotes de la cepa RAL de *T. cruzi*, por lo que el tipo de cepa es importante para el desarrollo de la enfermedad.

En nuestro estudio observamos claramente que los ratones Balb/c hembras obesos y/o controles infectados con 1×10^4 tripomastigotes de la cepa Ninoa de *T. cruzi* presentan mayor carga parasitaria en comparación con los machos, la diferencia de parasitemia entre machos y hembras control fue de 83.1%, mientras que para los ratones obesos fue de 132.2% lo que nos lleva a suponer que

además de la participación de las hormonas sexuales en el desarrollo de la enfermedad de Chagas, influyen otros factores como: el modelo murino empleado, el número de parásitos inoculados, el DTU y la cepa de *T. cruzi* utilizada puesto que se han reportado diferencias de parasitemia, mortalidad, histotropismo y activación de la respuesta inmune entre cepas del genotipo DTU1 (Combs *et al.*, 2005; Espinoza *et al.*, 2010; Espinoza *et al.*, 2011; Matos Ferreira *et al.*, 2011).

Tropismo

Al igual que la parasitemia, la infiltración del parásito en tejido cardíaco, reportado por Nagajyothi y colaboradores (2010), era mayor en ratones obesos en comparación a los ratones control. Contrario a lo anterior, en nuestro estudio, observamos una mayor intensidad de las bandas del amplicón y porcentaje de casos positivos en sujetos controles, que en los sujetos obesos, no sólo en corazón sino también en intestino delgado e intestino grueso. Dicha diferencia puede ser atribuida a la mayor cantidad de adipocitos en los sujetos obesos, ya que se ha reportado que estos pueden ser invadidos por *T. cruzi* (Combs *et al.*, 2005) ya que la mayor intensidad de las bandas resultantes del PCR fueron en tejido adiposo de sujetos obesos en comparación a los sujetos controles por lo que podemos suponer que en nuestro modelo el tejido adiposo funciona como una barrera protectora de los órganos blanco disminuyendo el tropismo en corazón y tejido digestivo.

Por otra parte, se sabe que el tejido adiposo desencadena una reacción inflamatoria sistémica y local durante la obesidad en comparación con organismos no obesos (Gómez-Ambrosi *et al.*, 2008; Flóres-Lázaro *et al.*, 2011), por lo cual suponemos que las altas diferencias de citocinas en organismos obesos aumenta la eficacia del control de la infección. Además, recientemente, se ha reportado la presencia de células mesenquimales en el tejido adiposo que regula la respuesta inmune ante la infección con *T. cruzi* y disminuye el daño a tejido cardíaco (Mello *et al.*, 2015). Todo lo anterior, nos lleva a suponer que la obesidad podría ser un factor protector ante la enfermedad de Chagas en nuestro modelo.

En la literatura no existen estudios en donde se analicen las diferencias de tropismo entre machos y hembras y tampoco existen estudios establecidos en organismos obesos machos y hembras por los que nuestros hallazgos son los primeros en describir la infección de *T. cruzi* en diferentes órganos blancos.

Podemos observar que en el análisis de DNA de corazón, el porcentaje de casos positivo para *T. cruzi* ratones obesos y control, es menor que para el caso de las hembras obesas y control. Sin embargo, la intensidad de las bandas es mayor en el caso de los machos, lo cual nos lleva a suponer que son más susceptibles a la infección, puesto que se presentó el deceso de un individuo de este grupo.

El único órgano en el cual no se observó infección, fue el bazo quizá debido a que es un órgano presentador de antígenos por lo cual, los parásitos podrían estar totalmente degradados.

Finalmente, aunque nuestros hallazgos son importantes, es necesario realizar más estudios que esclarezcan la relación de la obesidad con el desarrollo de la enfermedad de Chagas.

11. Conclusiones

- I. Se pudo establecer el modelo de obesidad murina a las 12 semanas con dieta hipercalórica, con mayor grado de obesidad en hembras que en machos.
- II. Los ratones hembra de la cepa Balb/c tanto obesos como controles presentaron mayor carga parasitaria en sangre que los ratones macho controles y obesos, no obstante, se registró muerte en ratones macho por lo que estos son más sensibles a la infección.
- III. Ratones macho presentaron mayor presencia de parásitos en corazón, lo que correlaciona con la muerte de individuos de estos grupos.
- IV. Los altos contenidos de grasa o tejido adiposo y la alta presencia de parásitos en este tejido correlaciona con menor carga de parásitos en otros órganos blancos, lo que sugiere que la obesidad causa alteraciones en la invasión de tejidos.
- V. En general, la parasitemia y la presencia del parásito en órganos vitales es menor en individuos obesos, lo cual sugiere que nuestro modelo de obesidad inducida por dieta hipercalórica es un factor protector a la infección con *T. cruzi*.

12. Perspectivas

- I. Aumentar el número de individuos en los cuatro grupos.
- II. Corroborar el grado de obesidad a nivel metabólico, cuantificando los niveles de glucosa, colesterol, triglicéridos y enzimas asociadas a la obesidad.
- III. Determinar la carga parasitaria en los órganos blancos a la infección mediante PCR cuantitativo.
- IV. Cuantificar la presencia de Quimiocinas y Citocinas proinflamatorias en los cuatro grupos de ratones.
- V. Determinar si las dietas hipercalóricas de diferente composición influye en la infección con *T. cruzi*.
- VI. Evaluar otras cepas de *T. cruzi* con diferentes grados de virulencia.

13. Bibliografía

1. Andrade, Z.A. y Rocha Silva, H.R. 1995. Parasitism of adipocytes by *Trypanosoma cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. **90**(4):521-522.
2. Ávila, H., Borges Pereira, J., Thiemann, O., de Pavia, E., Degrave, W., Morel, C. y Simpson, L. 1991. Detection of *Trypanosoma cruzi* in blood specimens of chronic chagasic patients by Polymerase Chain Reaction amplification of Kinetoplast minicircle DNA: comparison with serology and Xenodiagnosis. *J. Clin. Microbiol.* **31**(1991): 2421-2426.
3. Barquera, S., Campos-Nonato, I., Hernández-Barrera, L., Pedroza-Tobías, A. y Rivera-Dommarco, J.A. 2013. Prevalencia de obesidad en adultos mexicanos, ENSANUT 2012. *Salud Pub. Mex.* **55**(supl2): S151-S160.
4. Barreto, S.M., Passos, V.M.A. y Lima-Costa, M.F.F. 2003. Obesity and underweight among Brazilian elderly. The Bambuí Health and Aging Study. *Cad. Saúde Pub.* **19**(2): 605-612.
5. Basso, B. 2013. Modulation of immune response in experimental Chagas disease. *World J Exp Med.* **3**(1): 1-10.
6. Berg, A. y Scherer, E. 2005. Adipose tissue, inflammation, and cardiovascular disease. *Circulation Research.* **96** (9): 939-949.
7. Bern, C., Kjos, S., Yabsley, M.J. y Montgomery, S.P. 2011. *Trypanosoma cruzi* and Chagas' Disease in the United States. *Clin. Microbiol. R.* **24**(4): 655-681.
8. Bosseno, M.F., Bernabé, C., Magallón, E., Lozano, F., Ramsey, J., Espinoza, B. y Frédérique, S. 2002. Predominance of *Trypanosoma cruzi* Linage I in Mexico. *J. Clin. Microbiol.* **40**(2):627-632.

9. Campos Rosini, T., Sanchez, A.R. y De Moraes, C. 2012. Diet-induced obesity rodent model for the study of obesity-related disorders. *Rev. Assoc. Med. Bras.* **58**(3):383-387.
10. Cardonna, K. y Burleigh, B. 2011. Mechanisms of host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *Adv. Parasitol.* **76**:33-61.
11. Carod-Artal, F.J. 2013. American Trypanosomiasis. Handbook of Clinical Neurology. Vol. 114. 3ra edición. Edi. Elsevier. 103-123 pp.
12. Cardoso, M., Reis-Cunha, J. y Bartholomeu, D. 2016. Evasion of the immune response by *Trypanosoma cruzi* during acute infection. *Front. Immunol.* **18**(6): 659.
13. Cawthorn, W. y Sethi, J. 2008. TNF- α and adipocyte biology. *PMC.* **582**(1): 117-131.
14. Champman, W.L., Hanson, W.L. y Waits, V.B. 1975. The influence of gonadectomy of host on parasitemia and mortality of mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *J. Parasitol.* **61**(2):213-216.
15. Charriere, G., Cousin, B., Arnaud, E., Andre, M., Bacou, F., Penicaud, L. y Casteilla, L. 2003. Preadipocyte conversion to Macrophage. *J. Biol Chem.* **278**(1): 9850-9855.
16. Combs, T.P., Nagajyothi, F., Mukherjee, S., de Almeida, C.J.G., Jelicks, L.A., Schubert, W., Lin, Y., Jayabalan, S., Zhao, D., Braunstein, V.L., Landskroner-Eiger, S., Cordero, A., Factor, S.M., Weiss, L.M., Lisanti, M.P., Tanowitz, H.B. y Scherer, P.E. 2005. The Adipocyte as an Important Target

- Cell for *Trypanosoma cruzi* Infection. *J. Biol. Chemistry*. **280**(25): 24085-24094.
17. Cruz-Reyes, A. y Pickering-López, J.M. 2006. Chagas disease in Mexico: analysis of geographical distribution during the past 76 years- A review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. **101**(4): 345-354.
18. De Albuquerque, S., Lopoés, R.A., Sala, M.A., Carraro, A.A. y Domingues, R.R. 2008. Histometría de la glándula sublingual de ratones (*Mus musculus*) machos y hembras infectados con la cepa RAL del parásito de Chagas, *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Biol. Trop.* **56**(2):459-471.
19. De Pablos Torró, Luis Miguel. 2010. Análisis global de la familia multigénica MASP (Mucin Associated Surface Proteins) de *Trypanosoma cruzi*. Tesis doctoral. Instituto de Biotecnología. Universidad de Granada.
20. De Souza, W. 2002. From the cell biology to the development of new chemotherapeutic approaches against trypanosomatids: dreams and reality. *Kinetoplastid Biology and Disease*. **1**:3. kinetoplastids.com/content/1/1/3
21. De Souza, W., Ulisses de Carvalho, T.M. y Santos Barrias, E. 2010. Review on *Trypanosoma cruzi*: Host Cell Interaction. *Int. J. Cell Biol.* **2010**. <http://dx.doi.org/10.1155/2010/295394>
22. Desruisseaux, M., Nagajyothi, Trujillo, M.E., Tanowitz, H.B. y Scherer, P.E. 2007. Adipocyte, adipose tissue, and infectious disease. *Infect. Immun.* **75**(3): 1066-1078.
23. Dhurandhar, N.V. 2001. Infectobesity: Obesity of Infectious Origin. *J. Nutr.* **131**(10):2794S-2797S.

24. ENSANUT: Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012. Resultados Nacionales. Cuernavaca. México: Ins Salud Púb., 2012.
25. Espinoza, B., Rico, T., Sosa, S., Oaxaca, E., Vizcaino-Castillo, A., Caballero, M.L. y Martínez, I. 2010. Mexican *Trypanosoma cruzi* (TCl) strains with different degree of virulence induce diverse humoral and celular immune responses in a murine experimental infection model. *J Biomed Biotech.* **2010**: 1-10.
26. Espinoza, B., Solorzano-Dominguez, N., Vizcaino-Castillo, A., Martínez, I., Elias-Espinoza, A.L., y Rodríguez-Martínez, J.A. 2011. Gastrointestinal Infection with Mexican TCl *Trypanosoma cruzi* strains: Different Degrees of Colonization and Diverse Immune Responses. *Int. J. Biol. Sci.* **7(9)**: 1357-1370.
27. Flores-Lázaro, J.R., Rodríguez-Martínez, E. y Rivas-Aranciba, S. 2011. Consecuencias metabólicas de la alteración funcional del tejido adiposo en el paciente con obesidad. *Rev Med Hosp Gen Mex.* **74(3)**: 157-165.
28. Fuentes, R., Maturana, A. y de la Cruz, R. 2012. Eficacia de nifurtimox para el tratamiento de pacientes con enfermedad de Chagas crónica. *Rev. Chil. Infect.* **29(1)**: 82-86.
29. Gómez, R., Conde, J., Gómez-Reino, J., Lago, F. y Gualillo O. 2009. Las adipocinas: mediadores emergentes de la respuesta inmune y de la inflamación. *Reumatol. Clin.* **5(S1)**: 6-12.
30. Gómez-Ambrosi, J., Rodríguez, A., Catalán, V. y Frühbeck, G. 2008. Papel del tejido adiposo en la inflamación asociada a la obesidad. *Rev. Española Obesidad.* **6(5)**: 264-279.

31. Gómez-García, A., Nieto-Alcantar, E., Gómez-Alonso, C., Figueroa-Nuñez, B. y Álvarez-Aguilar, C. 2010. Parámetros antropométricos como predictores de resistencia a la insulina en adultos con sobrepeso y obesidad. *Aten Primaria*. **42**(7): 364-371.
32. González Hita, M., Bastida Ramírez, B.E., Ruíz Madrigal, B., Godínez, S. y Panduro, A. 2002. Funciones endócrinas de la célula adiposa. *Rev. Endocrinol. Nutr.* **10**(3): 140-146.
33. Grayson, M. 2010. Chagas Disease. *Nature*. **465**(7301): S3-S22.
34. Gullicksen, P.S., Dean, R.G. y Baile, C.A. 2004. Detection of DNA fragmentation and apoptotic proteins, and quantification of uncoupling protein expression by real-time in adipose tissue. *J. Biochem, Biophys Methods*. **58**(2004): 1-13.
35. Guzman-Marín, E.S., Zavala-Castro, J.E., Acosta-Viana, K.Y. y Rosado-Barrera, M.E. 1999. Importancia de la caracterización de cepas de *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Biomed.* **10**(3): 177-184.
36. Hauschka, T. S. 1947. Sex of host as a factor in Chagas' disease. *J. Parasit.* **33**(5):399-404.
37. Hedge, V. y Dhurandhar, N.V. 2013. Microbes and obesity-interrelationship between infection, adipose tissue and the immune system. *Clin Microbiol Infect.* **19**(4): 314-320.
38. Hernández-Urzúa, M.A. y Alvarado-Navarro, A. 2001. Interleucinas e inmunidad innata. *Rev Biomed.* **12**(4): 272-280.

39. Ikejima, S., Sasaki, S., Sashinami, H., Mori, F., Ogawa, Y., Nakamura, T., Abe, Y., Wakabayashi, K., Soda, T. y Nakane, A. 2006. Impairment of Host Resistance to *Listeria monocytogenes* infection in Liver of db/db and ob/ob Mice. *Diabetes*. **54**(1): 182-189.
40. Lago, F., Dieguez, C., Gómez-Reino, J. y Gualillo, O. 2007. Adipokines as emerging mediators of immune response and inflammation. *Nat. Clin. Prac. Rheumatol.* **3**(12):716-724.
41. Lumeng, C.N. 2013. Innate immune activation in obesity. *Mol. Aspects Med.* **2013**(34): 12-29.
42. Machado, F.S., Dutral, W.O., Esper, L., Gollob, K., Teixeira, M.M., Factor, S.M., Weiss, L.M., Nagajyothi, F., Tanowitz, H.B. y Garg, N.J. 2012. Current Understanding of Immunity to *Trypanosoma cruzi* Infection and Pathogenesis of Chagas Disease. *Semin Immunopathol.* **34**(6): 753-770.
43. Machado, F.S., Tyler, K.M., Brant, F., Esper, L., Teixeira, M.M. y Tanowitz, H.B. 2012b. Pathogenesis of Chagas Disease: time to move on. *Front Biosci* (Elite Ed). 4: 1743-1758.
44. Mantilla, J.C., Suárez, E.U. y Barraza, M.F. 2011. Enfermedad de Chagas: correlación clínico-patológica. Serie de casos del Hospital Universitario de Santander- Departamento de Patología, Universidad Industrial de Santander. *Rev. Colombiana Cardiol.* **18**(5): 249-261.
45. Martínez F., 2003. Tesis de licenciatura. caracterización de la diversidad genética de insectos transmisores de la enfermedad de chagas en México. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México.

46. Martínez-Velasco, María Luisa. 2004. Estudio del Proteoma de *Trypanosoma cruzi*. Análisis de moléculas con importancia Biológica. Tesis profesional. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. UNAM.
47. Martínez, F., Villalobos, G., Cevallos, A.M., de la Torre, P., Laclette, J.P., Alexandre-Aguilar, R. y Espinoza, B. 2006. Taxonomic study of the *Phyllosoma* complex and other triatomine (Insecta: Hemiptera: Reduviidae) species of epidemiológica importance in the transmission of Chagas disease: using ITS-2 and mtCytB sequences. *Mol Phylogenet Evol.* **41**(2): 279-287.
48. Matos Ferreira, A.V., Segatto, M., Menezes, Z., Macedo, A. M., Gelape, C., De Oliveira, L.A., Nagajyothi, F., Scherer, P.E., Teixeira, M. M. y Tanowitz, H.B. 2011. Evidence for *Trypanosoma cruzi* in adipose tissue in human chronic Chagas disease. *Microbes and Infection.* **13**(2011): 1002-1005.
49. Mello, D. B., Ramos, I.P., Mesquita, F. C. P., Brasil, G. V., Rocha, N., Takiya, C.M., Lima A.P., Campos de Carvalho, A., Goldenberg, R. S. y Carvalho. A. B. 2015. Adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells protect mice infected with *Trypanosoma cruzi* from cardiac damage through modulation of anti-parasite immunity. *PLoS Neglected Tropic Diseases.* **9**(8):1-17.
50. Milner, J. J. y Beck, M.A. 2012. Micronutrients, immunology and inflammation. The impact of obesity on the immune response to infection. *Proc. Nutrition Soc.* **71**(2):298-306.
51. Muñoz, M., Mazure, R.A. y Culebras, J.M. 2004. Obesidad y sistema inmune. *Nutr. Hosp.* **19**(6): 319-324.

52. Nagajyothi, F., Desruisseaux, M.S., Thiruvur, N., Weiss, L.M., Braunstein, V.L., Albanese, C., Teixeira, M.M., de Almeida, C.J., Lisanti, M.P., Scherer, P.E. y Tanowitz, H.B. 2008. *Trypanosoma cruzi* Infection of Cultured, Adipocytes Results in an Inflammatory Phenotype. *Obesity*. **16**(9): 1992-1997.
53. Nagajyothi, F., Machado, F.S., Burleigh, B.A., Jelicks, L.A., Scherer, P.E., Mukherjee, S., Lisanti, M.P., Weiss, L.M., Garg, N.J. y Tanowitz, H.B. 2012. Mechanisms of *Trypanosoma cruzi* persistence in Chagas disease. *Cellular Microbiol.* **14**(5): 634-643.
54. Nagajyothi, F., Weiss, L.M., Silver, D.L., Desruisseaux, M.S., Scherer, P.E., Herz, J. y Tanowitz, H.B. 2011. *Trypanosoma cruzi* Utilizes the Host Low Density Lipoprotein Receptor in Invasion. *PLoS Negl Trop Dis.* **5**(2): e953.
55. Nagajyothi, F., Weiss, L.M., Zhao, D., Koba, W., Jelicks, L.A., Cui, M.H., Factor, S.M., Scherer, P.E. y Tanowitz, H.B. 2014. High Fat Diet Modulates *Trypanosoma cruzi* Infection Associated Myocarditis. *PLoS Negl Trop Dis.* **8**(10): e3118.
56. Nagajyothi, F., Zhao, D., Machado, F.S., Weiss, L.M., Schwartz, G.J., Desruisseaux, M.S., Zhao, Y., Factor, S.M., Huang, H., Albanese, C., Teixeira, M.M., Scherer, P.E., Chua, S.C. y Tanowitz, H.B. 2010. Crucial Role of the Central Leptin Receptor in Murine *Trypanosoma cruzi* (Brazil Strain) Infection. *J. Infec. Dis.* **202**(7): 1104-1113.
57. Nardy, A., Freire-de-Lima, C. y Morrot, A. 2015. Immune evasion strategies of *Trypanosoma cruzi*. *J. Immunol. Res.* **2015**(10):178-184.
58. OMS. La enfermedad de Chagas (tripanosomiasis americana). <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/es/>. 2015.

- 59.OMS. Obesidad y sobrepeso. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/es/> 2014.
- 60.Organización Panamericana de la Salud (OPS). Obesidad en México. 2014. http://www.paho.org/mex/index.php?option=com_content&view=category&id=824
- 61.Palomer, X., Pérez, A. y Blanco-Vaca, F. 2005. Adiponectina: un nuevo nexo entre obesidad, resistencia a la insulina y enfermedad cardiovascular. *Med Clin (Barc)*. **124**(10): 388-395.
- 62.Pérez de Heredia, F., Gómez-Martínez, S. y Marcos, A. 2012. Chronic and degenerative diseases Obesity, inflammation and the immune system. *Proc. Nutrition Soc.* **71**(2): 332-338.
- 63.Ponce y Ponce de León, G., Haro Acosta, M.E., Arce Torres M.A., Núñez Soria, A.A., Ruíz Esparza Cisneros, J. y Mayagoitia Witrón J. J. 2010. Obesidad y Tejido Adiposo. *Rev. Salud Públ. Nutr.* **11**(2).
- 64.Ramsey, J.M., Ordoñez, R., Tello López, A., Pohls, J.L., Sánchez, V. y Peterson, A.T. 2003. Actualidades sobre la epidemiología de la Enfermedad de Chagas en México. Iniciativa para la vigilancia y el control de la enfermedad de Chagas en la República Mexicana, Instituto Nacional de Salud Pública, Cuernavaca, p. 85-103.
- 65.Rassi, A.Jr., Rassi, A. y Marcondes, J.R. 2012. American Trypanosomiasis (Chagas Disease). *Infec. Dis. Clin. North America*, **26**(2): 275-291.
- 66.Reuter, T.Y. 2007. Diet-induced models for obesity and type 2 diabetes. *Drug Discovery Today: Disease Models.* **4**(1): 3-8.

67. Rezende-Oliveira, K., Rodrigues Sarmiento, R. y Rodrigues Junior V. 2012. Production of cytokine and chemokines by human mononuclear cells and whole blood cells after infection with *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **45**(1): 45-50.
68. Roca Saumell, C., Soriano-Arandes, A., Solsona, L.D., Gascón, J.B. y Grupo de consenso Chagas-APS. 2015. Documento de consenso sobre el abordaje de la enfermedad de Chagas en atención primaria de salud en áreas no endémicas. *Aten Primaria.* **47**(5): 1-10.
69. Rodrigues, M.M., Oliveira, A.C. y Bellio, M. 2012. The Immune Response to *Trypanosoma cruzi*: Role of Toll-Like Receptors and Perspectives for Vaccine Development. *J. Parasit. Res.* 2012.doi:10.1155/2012/507874
70. Sánchez-Castillo, C.P., Pichardo-Ontiveros, E. y López-R., P. 2004. Epidemiología de la Obesidad. *Gac Méd Mex.* **140**(supl.2): S3-S20.
71. Tanowitz, H.B., Machado, F.S., Jelicks, L.A., Shirani, J., Campos de Carvalho, A.C., Spray, D.C., Factor, S.M., Kirchhoff, L.V. y Weiss, L.M. 2009. Perspectives on *Trypanosoma cruzi*-induced heart disease (Chagas disease). *Prog Cardiovasc Dis.* **51**(6):524-539.
72. Thibault, L. 2013. Animal models for the study of human disease. *Academic press*. Capítulo 13. Páginas: 277-303.
73. Umekita, L.F. y Mota, I. 2000. How are antibodies involved in the protective mechanism of susceptible mice infected with *T. cruzi*?. *Braz J Med Biol Res.* **33**(3): 253-258.

74. Virreira, M., Torrico, F., Truyens, C., Alonso-Vega, C., Solano, M., Carlier, Y. y Svoboda, M. 2003. Comparison of polymerase chain reaction methods for reliable and easy detection of congenital *Trypanosoma cruzi* infection. *Am J. Trop. Med Hyg.* **68**(5): 574-582.
75. Von Diemen, V., Trindade, E.N. y Trindade, M.R. 2006. Experimental model to induce obesity in rats. *Acta Cir. Bras.* **21**(6):425-429.
76. Zambon, L., Duarte, F.O., Freitas, L.F., Scarmagnani, R.R., Damaso, A., Duarte, A.C.G. y Sene-Fiorese, M. 2009. Efeitos de dois tipos de treinamento de natação sobre a adiposidade e o perfil lipídico de ratos obesos exógenos. *Rev. Nutr.* **22**(5):707-715.
77. Zingales, B. 2011. Molecular epidemiology of Chagas disease: gaps of Knowledge and research priorities. *Biomédica.* **31**(sup. 3): 146-148.
78. Zingales, B., Andrade, S.G., Briones, M.R.S., Campbell, D.A., Chiari, E., Fernandes, O., Guhl, F., Lages-Silva, E., Macedo, A.M., Machado, C.R., Miles, M.A., Romanha A.J., Sturm, N.R., Tibayrenc, M. y Schijman, A.G. 2009. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revisión meeting recommends TcI to TcVI. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* **104**(7): 1051-1054.
79. Zingales, B., Miles, M.A., Campbell, D.A., Tibayrenc, M., Macedo, A.M., Teixeira, M.G., Schijman, A.G., Llewellyn, M.S., Lages-Silva, E., Machado, C.R., Andrade, S.G., Sturm, N.R. 2012. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: Rationale, epidemiological relevance and research applications. *Inf. Genet. Evol.* **12**(2): 240-253.
80. Zuck, M. y Mckean, K.A. Sex Diferences in parasite infections: Patterns and Processes. *Int. J. Parasit.* **26**(10): 1009-1024.

Anexo I

Técnica Fenol-cloroformo modificada

1. En un tubo eppendorf de 2.5 mL se homogeniza en frío aproximadamente 100 mg de tejido en 300 μ L de PBS 1X.
2. Se agregan 600 μ L de Buffer de extracción [Tris 50 mM, EDTA 50mM, NaCl 50 mM, SDS 1% y 30 μ L de Proteinasa K (20 mg/mL)] al tubo anterior y se deja en incubación por 12 horas a 56°C.
3. Al tubo anterior se le adiciona 500 μ L de Fenol saturado (equilibrado con 0.5 M de Tris pH=8). Posteriormente se homogeniza con ayuda de un Vortex; y se separan las dos fases (orgánica y acuosa) por centrifugación a 18 800 g por 5 minutos a 4°C.
4. Se extrae la fase acuosa (fase superior) con la ayuda de una pipeta y se coloca en un nuevo tubo de 2.5mL; posteriormente se le adiciona 500 μ L de solución Fenol-Cloroformo-Alcohol Isoamílico en proporción 25/24/1. Se homogeniza con Vortex y se separan las dos fases por centrifugación a 18 800 g por 5 minutos a 4°C.
5. Nuevamente se extrae la fase acuosa (fase superior) con la ayuda de una pipeta y se coloca en un nuevo tubo de 2.5 mL; posteriormente se le adiciona 500 μ L de Cloroformo; se homogeniza con Vortex y se separan las dos fases por centrifugación a 18 800 g por 5 minutos a 4°C.
6. Se transfiere la fase acuosa (parte viscosa) con la ayuda de una pipeta a un nuevo tubo y se le adiciona 1 mL de Etanol Absoluto frío, y 100 μ L de acetato de sodio 3M (10% del volumen de extracción); se mezcla perfectamente y se mantiene a -70°C durante una hora para precipitar el DNA. Posteriormente se centrifuga a 18 800 g por 30 minutos a 4°C.

7. Se decanta el sobrenadante y se deja evaporar la pastilla de DNA.
8. Se resuspende el DNA en 20 μ L de agua milliq estéril.

Protocolo de Gullicksen modificado

1. En un tubo eppendorf de 2.5 mL se homogeniza en frío aproximadamente 180-200 mg de tejido en 1 mL de Buffer de lisis (Tris-HCl 10mM, EDTA 10mM, y 0.5% de Tritón X-100, pH 8.0) a una velocidad baja durante 15-30 segundos.
2. Se mantiene el homogenizado anterior en un baño de hielo durante 20 minutos y, posteriormente se centrifuga a 18 800 g por 15 minutos a 4°C.
3. Consecutivamente se remueve la capa de grasa por aspiración con una pipeta.
4. El sobrenadante se transfiere a un nuevo tubo.
5. El DNA tanto del sobrenadante como de la pastilla, obtenidas de los pasos anteriores, se extraen con la técnica Fenol-Cloroformo modificada antes descrita.