

Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas

INSTITUTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Estudios sobre un aislado chiapaneco de *Trypanosoma cruzi*:
Epimastigogénesis *in vitro*, parasitemia en sangre y respuesta
inmune humoral en un modelo murino

TESIS

QUÉ PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADO EN BIOLOGÍA

PRESENTA

NASHELLY RIOS HERNÁNDEZ



TUXTLA GUTIÉRREZ, CHIAPAS

Febrero 2023

Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas

INSTITUTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Estudios sobre un aislado chiapaneco de *Trypanosoma cruzi*:
Epimastigogénesis *in vitro*, parasitemia en sangre y respuesta
inmune humoral en un modelo murino

TESIS

QUÉ PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADO EN BIOLOGÍA

PRESENTA

NASHELLY RIOS HERNÁNDEZ

Director

Dra. María Adelina Schlie Guzmán

Asesor(a)

Dra. Dolores Guadalupe Vidal López



TUXTLA GUTIÉRREZ, CHIAPAS

Febrero 2023



UNIVERSIDAD DE CIENCIAS Y ARTES DE CHIAPAS
SECRETARÍA GENERAL
DIRECCIÓN DE SERVICIOS ESCOLARES
DEPARTAMENTO DE CERTIFICACIÓN ESCOLAR
AUTORIZACIÓN DE IMPRESIÓN

Lugar: Tuxtla Gutiérrez, Chiapas;
Fecha: 16 de febrero de 2023

C. Nashelly Rios Hernández

Pasante del Programa Educativo de: Licenciatura en Biología

Realizado el análisis y revisión correspondiente a su trabajo recepcional denominado:
Estudios sobre un aislado chiapaneco de *Trypanosoma cruzi*: Epimastigogénesis in vitro,
parasitemia en sangre y respuesta inmune humoral en un modelo murino.

En la modalidad de: Tesis Profesional

Nos permitimos hacer de su conocimiento que esta Comisión Revisora considera que dicho documento reúne los requisitos y méritos necesarios para que proceda a la impresión correspondiente, y de esta manera se encuentre en condiciones de proceder con el trámite que le permita sustentar su Examen Profesional.

ATENTAMENTE

Revisores

Dr. Javier Gutiérrez Jiménez

Dra. Dolores Guadalupe Vidal López

Dra. María Adelina Schlie Guzmán

Firmas:

Cop. Expediente

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	iii
RESUMEN	v
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	3
2.1 Agente etiológico	3
2.2 Estadios morfológicos	5
2.4 Los Insectos vectores	9
2.5 Principales especies de mamíferos reservorios de <i>T. cruzi</i>	11
2.6 Mecanismos de infección de <i>Trypanosoma cruzi</i>	12
2.7 Fisiopatología de la enfermedad de Chagas	13
2.9 El sistema inmunitario.....	20
2.10 Respuesta inmune ante Protozoarios	21
III. ANTECEDENTES	24
VI. OBJETIVOS	32
4.1. Objetivo General:	32
4.2. Objetivos Particulares	32
V. MÉTODO(S)	33
5.1. Modelo animal	33
5.2. Medio de cultivo de <i>Trypanosoma cruzi</i> en medio LIT (liver infusión tryptose).....	33
5.3 Transformación a epimastigotes	34
5.4. Determinación de la parasitemia en sangre de los ratones infectados	34

5.5 Determinación de niveles de inmunoglobulinas en los ratones Balb/c infectados	36
5.6 Determinación de las proteínas del extracto soluble de <i>T. cruzi</i> en geles de acrilamida (SDS- PAGE)	38
VI. RESULTADOS	41
6.1. Transformación y curva de crecimiento de epimastigotes <i>in vitro</i> de <i>Trypanosoma cruzi</i>	41
6.2. Desarrollo de la infección por tripomastigotes sanguíneos y la respuesta inmune humoral en ratones infectados	44
6.3 Sobrevivencia de los animales a la infección de número diferente de tripanosomas de <i>T. cruzi</i>	51
6.4 Análisis de las proteínas del extracto soluble de epimastigotes de <i>T. cruzi</i>	52
VII. DISCUSIÓN	53
7.1 Transformación y curva de crecimiento de epimastigotes <i>in vitro</i> de <i>Trypanosoma cruzi</i>	53
7.2 Desarrollo de la infección por tripomastigotes sanguíneos y la respuesta inmune humoral en ratones infectados	55
7.3 Análisis de las proteínas del extracto soluble de epimastigotes de <i>T. cruzi</i>	58
VIII. CONCLUSIONES	61
IX. PERSPECTIVAS	62
X. REFERENCIAS DOCUMENTALES	63
XI. ANEXOS	74

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estadios morfológicos durante el ciclo de vida de <i>Trypanosoma cruzi</i> . (Teixeira <i>et al.</i> , 2012; cruz-saavedra, 2021).....	7
Figura 2. Ciclo Biológico de <i>Trypanosoma cruzi</i> . (Becerril-Flores, 2014).....	9
Figura 3. Distribución de triatomínos en México (Salazar-Schettino <i>et al.</i> , 2010).....	10
Figura 4. Métodos de diagnósticos. (Elaboración propia).....	20
Figura 5. Cámara de Neubauer. (Díaz-Gómez, 2014).....	35
Figura 6. Cepa IDIM/Mx/16/Mezcales de <i>Trypanosoma cruzi</i> en estadio epimastigote cultivado <i>in vitro</i>	41
Figura 7. Curva de crecimiento del cultivo A de epimastigotes, en medio de cultivo LIT completo.....	42
Figura 8. Curva de crecimiento del cultivo B de epimastigotes, en medio de cultivo LIT completo.....	43
Figura 9. Curva de crecimiento del cultivo C de epimastigotes, en medio de cultivo LIT completo.....	44
Figura 10. Densidad óptica (D.O.) de los sueros del grupo control.....	45
Figura 11. Parasitemia en sangre y niveles de inmunoglobulinas en los animales infectados 25 000 tripomastigotes.....	46
Figura 12. <i>Parasitemia en sangre y niveles de inmunoglobulinas en los animales infectados 50 000 tripomastigotes</i>	47
Figura 13. <i>Parasitemia en sangre y niveles de inmunoglobulinas en los animales infectados 100 000 tripomastigotes</i>	48
Figura 14. Curva de parasitemia de <i>Trypanosoma cruzi</i> cepa IDIM/Mx/16/Mezcales en ratones inoculados con diferentes concentraciones de parásitos tripomastigotes.....	49
Figura 15. Respuesta inmune de <i>Trypanosoma cruzi</i> cepa IDIM/Mx/16/Mezcales en ratones inoculados con diferentes concentraciones	

de parásitos tripomastigotes.....	50
Figura 16. Supervivencia de los grupos de animales infectados con diferente número de tripanosomas sanguíneos de <i>T. cruzi</i>	51
Figura 17. SDS-PAGE de homogeneizados de epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i> . (A y B) pesos moleculares, (C) perfil de proteínas de la cepa IDIM/Mx/16/Mezcales; (D) perfil de proteínas de la cepa “Y”.....	52
Figura 18. SDS-Page: A) cepas oaxaqueñas de <i>T. cruzi</i> . (Martínez cuevas 2018).....	58

RESUMEN

La tripanosomiasis americana o enfermedad de Chagas es una zoonosis causada por el protozoo *Trypanosoma cruzi*, considerada la parasitosis más grave en América y afecta principalmente a las poblaciones más pobres con limitado acceso a los servicios de salud, además representa una carga presupuestal importante para los sistemas de salud con más de seis millones de casos, la mayoría de ellos en América Latina.

En las enfermedades infecciosas los hospederos deben desarrollar mecanismos que les permitan controlar tanto los niveles de parasitemia como inducir una respuesta inmune adecuada contra el agente etiológico de la enfermedad. En el caso de las cepas de *T. cruzi* se presenta una gran heterogeneidad bioquímica y molecular que se muestra en variaciones de virulencia, patogenicidad y constitución antigénica. Esto es de gran relevancia dado que el inmunodiagnóstico frecuentemente se basa en la detección de proteínas de cepas ajenas a la región de estudio, lo que pudiera en un momento dado subestimar el número de individuos infectados.

En el presente trabajo se analizó el aislado IDIM/Mx/16/mezcales de *Trypanosoma cruzi*, la epimastigogénesis y su curva de crecimiento en un medio de cultivo axénico, así como la capacidad de los tripomastigotes sanguíneos de producir parasitemia en sangre e inducir una respuesta inmune humoral en el modelo murino de ratones Balb/c.

Los resultados indicaron que las formas de epimastigotes en medio LIT se desarrollaron partir del día 15-17. En el modelo murino, las tripomastigotes sanguíneos se evidenciaron a los 11 días post-inoculación y se puede asociar la magnitud de parasitemia en sangre con el tamaño del inóculo; sin embargo, los niveles de la respuesta inmune humoral parecen ser independientemente de la cantidad de parásitos inoculados aunque siempre se inició a los 18 días post-inoculación. Dado que la mayoría de los animales inoculados murieron, esta cepa de *T. cruzi* puede ser considerada agresiva y capaz de producir muerte en los ratones Balb/c.

I. INTRODUCCIÓN

La tripanosomiasis americana o enfermedad de Chagas es una zoonosis causada por el protozoo *Trypanosoma cruzi* (Flores-Chávez *et al.*, 2007); es considerada la parasitosis transmitida por vector más grave en América, se encuentra en la lista de la Organización Mundial de la Salud como una enfermedad tropical desatendida y representa una carga presupuestal importante para los sistemas de salud con más de seis millones de casos, la mayoría de ellos, en América Latina (Murcia *et al.*, 2013; Rojo-Medina *et al.*, 2018; OMS 2021). Los constantes flujos migratorios han favorecido la presencia de personas con la enfermedad de Chagas en regiones clásicamente consideradas como no endémicas (Saldaña *et al.*, 2009; Murcia *et al.*, 2013), por lo que su impacto fuera de América Latina se ha dejado sentir en Estados Unidos de América y el Canadá, en muchos países de Europa y en algunos de África, el Mediterráneo Oriental y el Pacífico Occidental debido a su transmisión por vías no vectoriales como la connatal, transfusional o por donación de órganos (Padilla *et al.*, 2017).

En las enfermedades infecciosas los hospederos deben desarrollar mecanismos que les permitan controlar tanto de los niveles de parasitemia como inducir una respuesta inmune adecuada contra el agente etiológico de la enfermedad. En el caso de las cepas *T. cruzi* se presenta una gran heterogeneidad bioquímica y molecular que se muestra en variaciones de virulencia, patogenicidad y constitución antigénica (Martínez-Cuevas, 2018). Esto es de gran relevancia dado que los métodos inmunológicos para diagnosticar la enfermedad de Chagas, frecuentemente se basan en la detección de proteínas de cepas ajenas a la región de estudio, lo que pudiera en un momento dado subestimar el número de individuos infectados.

La gravedad y los síntomas de la enfermedad varían en las distintas regiones donde se presenta y se ha sugerido que dicha variabilidad puede ser el resultado de factores genéticos tanto del hospedero como del parásito (Cura y Schijman, 2013). En Chiapas se presume un subregistro de enfermos con la

enfermedad de Chagas que entre otras causas pudiera deberse a la falta de reactividad que tienen los sueros humanos en las pruebas inmunológicas establecidas por la Secretaría de Salud, por tal motivo la cepa que se trabajará fue aislada de las heces de un triatomino infectado en la zona de transmisión de nuestro estado y se pretende evaluar su capacidad antigénica en un modelo murino como condición necesaria para determinar si pudiera ser un candidato en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas en poblaciones humanas de nuestro estado.

II. MARCO TEÓRICO

La enfermedad de Chagas es una enfermedad tropical endémica y desatendida que afecta entre seis a siete millones de personas en todo el mundo, principalmente en zonas tropicales de América Latina. El agente causal es un protozoo de la familia Trypanosomatida conocido como *Trypanosoma cruzi* y es transmitido por más de 100 especies de insectos triatomínicos y sostenida por más de 70 géneros de hospederos mamíferos (Zingales, 2018).

Esta infección es un problema de salud pública debido a la gran variedad de factores que afectan su historia natural, tales como las malas condiciones de alojamiento en las zonas rurales endémicas que facilitan la reproducción del vector y la transmisión del parásito, la abrumadora cantidad de reservorios animales, que, de acuerdo con Duran-Rehbein *et al.*, (2014) hace prácticamente imposible que el parásito se erradique, las diversas vías en las que se puede transmitir el parásito así como la fisiopatología y su temporalidad. Al ser una enfermedad desatendida, la gran mayoría de los pacientes chagásticos tienen acceso limitado al diagnóstico y tratamiento, además que el tropismo tisular (dependiente de la cepa), diversidad genética y las desafiantes formas morfológicas (amastigotes inactivos) ahora se reconocen como una potencial explicación del fracaso del fármaco y la recaída del tratamiento (Martín-Escolano *et al.*, 2022).

2.1 Agente etiológico

Trypanosoma cruzi es un protista de la clase Kinetoplastea, familia Trypanosomatidae, caracterizado por la presencia de un solo flagelo y una sola mitocondria, cuyo genoma se encuentra ordenado en una compleja y compacta región dentro de la propia mitocondria, y cerca de la base del flagelo denominada cinetoplasto. La mitocondria muestra los compartimentos clásicos (membrana (externa e interna), espacio intermembranal, matriz mitocondrial, etc.) y presenta variaciones morfológicas y composicionales a la que está sometida durante el ciclo

de vida. El ADN mitocondrial representa aproximadamente un 25% del ADN celular y contiene dos tipos de ADN circular. Los maxi y mini círculos, que se encuentran conectados entre sí y físicamente ligados al cuerpo basal, el cual se encuentra en la base del flagelo. Concurren miles de mini círculos y unas pocas decenas de maxi círculos, que varían en el primer caso de un largo aproximado de 1kb hasta en el caso de los segundos unos 25 kb, mientras que los maxi círculos codifican los ARNr y proteínas mitocondriales, al igual que en eucariotas superiores (Hoffmann *et al.*, 2016).

El núcleo, a diferencia de la mitocondria, presenta una organización estructural semejante al de las células eucariotas típicas, midiendo cerca de 2.5 μm de diámetro. En los estadios replicativos, *T. cruzi* se reproduce mediante fisión binaria. Si bien la forma es similar en estos estadios, presentan gran diferencia en tamaño. Aún no se conoce con exactitud a que se debe esta diferencia, pero se sugiere que es por un cambio de ploidía. La envoltura nuclear es conservada durante la división celular, determinando que la segregación cromosómica ocurra dentro del núcleo. Los estudios de secuenciación predicen aproximadamente 22 570 proteínas codificadas por genes, de los cuales 12 570 representan pares alélicos; además, al menos un 50% del genoma del parásito está compuesto por secuencias repetitivas, que codifican para retrotransposones y moléculas de superficie (El-Sayed *et al.*, 2005; Cruz-Saavedra, 2021).

Las familias multigénicas más expandidas, son proteínas tipo TS, mucinas, metaloproteasas, DGF-1, proteínas RHS y las proteínas de superficie asociadas a mucinas (MASP). Cada una de estas familias incluye varios cientos de genes los cuales pueden ser expresados simultáneamente. Las familias multigénicas que codifican para antígenos de superficie son parte de una estrategia clave de evasión al sistema inmune y otros procesos relacionados con la infección (Cruz-Saavedra, 2021).

Una característica llamativa de *T. cruzi* es su heterogeneidad en relación con las propiedades biológicas, diferencias en tasas de crecimiento, infectividad,

tropismo tisular, antigénico, composición, virulencia y morbilidad en animales (Martínez-Díaz *et al.*, 2001). A partir de los estudios de biología molecular que mostraron una estructura poblacional compleja y mayoritariamente clonal del parásito, se decidió que las diferentes cepas se clasificaran en unidades de tipificación discretas o DTUs (discrete typing units). Las DTU se definen como conjuntos de poblaciones que son genéticamente más similares entre sí que a cualquier otra población y son identificables por marcadores moleculares comunes; actualmente son seis designadas como TcI, TcII, TcIII, TcIV, TcV y TcVI además de TcBat, un genotipo asociado a la infección en murciélagos (TcI-TcVI y TcBat). Estas versiones de *T. cruzi* difieren en distribución geográfica, nicho, tipos de vectores y de huéspedes (Zingales, 2018).

Esta gran variación intraespecífica, se ha relacionado con la severidad de la enfermedad en el hospedero humano y en otros mamíferos, la susceptibilidad para agentes quimioterapéuticos, su capacidad de infectar las células hospederas y finalmente impactan en su serodiagnóstico, por lo que se recomienda analizar las cepas que circulan en las regiones y evitar los subregistros.

Actualmente, es conocido que algunas DTU son híbridos provenientes de eventos de intercambio genético que ocurrieron en el pasado y se cuestiona el paradigma tradicional de la evolución clonal: la recombinación y el intercambio genético pudieran haber contribuido a las estructuras poblacionales presentes y a la evolución de distintos subgrupos de *T. cruzi* (Martín-Escolano *et al.*, 2022; Nakamura *et al.*, 2022).

2.2 Estadios morfológicos

Trypanosoma cruzi presenta tres estadios morfológicos a lo largo de su ciclo de vida, los cuales se encuentran comprendidos en dos: el vector invertebrado y el hospedero mamífero.

Los estadios básicos se definen por su forma, la posición del cinetoplasto respecto del núcleo y la región por donde emerge el flagelo y son nombrados:

epimastigote, amastigote y tripomastigote: este último puede ser metacíclico (en el vector) o sanguíneo (en el mamífero) (Salazar- Schettino y Marín, 2006) (Figura 1).

Epimastigote. Es la forma replicativa, no infectiva para el humano o mamífero y se encuentra en el vector invertebrado. Es de aspecto fusiforme, con 20 a 25 μm de longitud. El cinetoplasto se localiza en la posición anterior, cerca del núcleo, y el flagelo forma una pequeña membrana ondulante. Este estadio morfológico se multiplica de manera profusa en el intestino de los triatomíneos para dar lugar a los tripomastigotes metacíclicos; también es la forma de los paracitos que se replican en medio de cultivo (*ibidem*).

Amastigote. Es la forma replicativa intracelular que se reproduce en el hospedero mamífero y la que lo distingue de otros miembros del género. Posee una forma redonda que mide de dos a 2.5 μm , su flagelo está secuestrado dentro de una bolsa visible, presenta un gran núcleo y cinetoplasto (Salazar- Schettino y Marín, 2006).

Tripomastigote metacíclico. Es una forma no replicante pero infectiva para el humano u otros mamíferos. Tiene forma alargada y mide entre 20 y 25 μm de longitud. Se distingue por presentar un núcleo vesiculoso y hacia la parte posterior de éste se halla el cinetoplasto, de forma casi siempre esférica. El flagelo, con su membrana ondulante, se observa a lo largo del cuerpo del parásito y surge libremente en el extremo posterior (*ibidem*).

Tripomastigote sanguíneo. Es el resultado de la diferenciación del amastigote, también es una forma no replicativa pero infectiva para el insecto vector y el mamífero; (Salazar- Schettino y Marín, 2006).

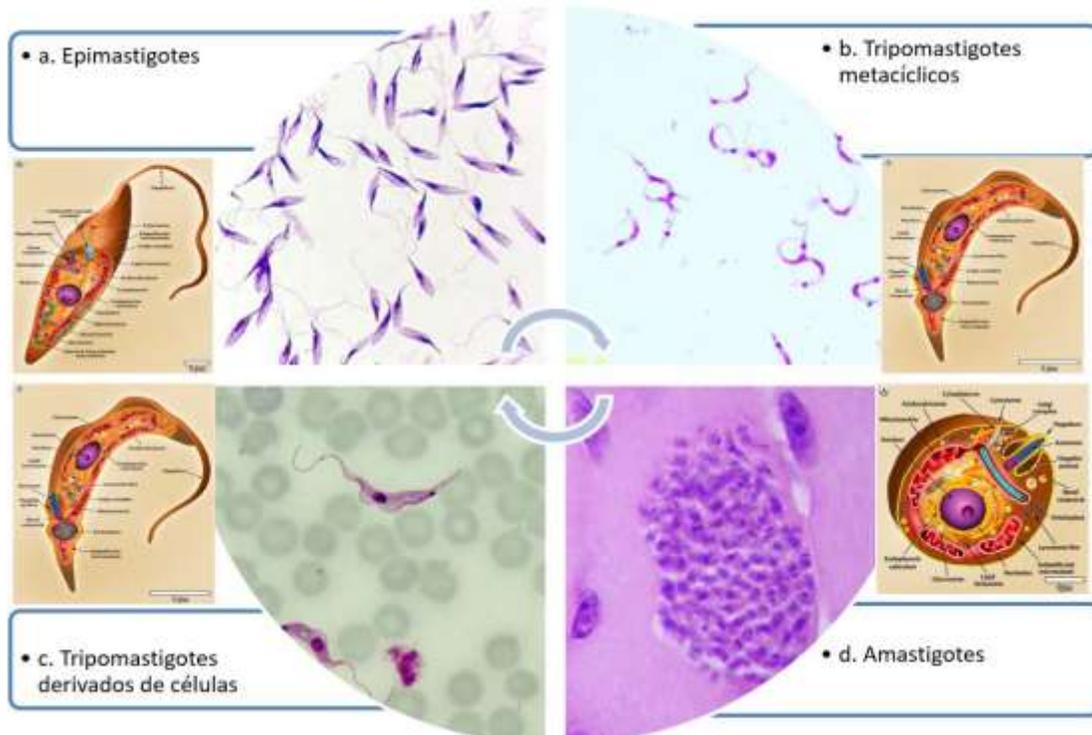


Figura 1. Estadios morfológicos durante el ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*. (a) Epimastigotes: estadio replicativo móvil, presente en el ciclo de *T. cruzi* en el vector. (b) Tripomastigotes metacíclicos: estadio infeccioso de parásito, móvil no replicativo, presente en el ciclo de *T. cruzi* en el vector. (c) Tripomastigotes derivados de células: estadio no replicativo móvil, presente en el ciclo de vida del mamífero. (d) Amastigotes: estadio replicativo no móvil, presente en el ciclo de vida del mamífero (tomado de Teixeira *et al.*, 2012; Cruz-Saavedra, 2021).

2.3 Ciclo de vida

Se considera que *Trypanosoma cruzi* tiene un ciclo de vida biológico complejo, debido a que se caracteriza por la presencia de varias etapas de desarrollo que pueden ser observadas en los huéspedes vertebrados e invertebrados (Kaufer *et al.*, 2017).

El ciclo de *T. cruzi* comienza cuando el insecto vector ingiere tripomastigotes del torrente sanguíneo de un mamífero infectado, escasas horas después de esto ocurre la primera transformación, los tripomastigotes ingeridos se convierten en epimastigotes, los cuales establecen una infección en el intestino medio posterior adhiriéndose en la membrana perimicrovilar y comienzan a multiplicarse por fisión binaria. Después los epimastigotes migran al recto y se diferencian en tripomastigotes metacíclicos, que son excretados por el insecto (De Fuentes-Vicente *et al.*, 2019).

Cuando el vector infectado se alimenta, puede ingerir varias veces su peso corporal en sangre y defecar sobre la piel o mucosas del mamífero; depositando junto con su excremento tripomastigotes infectantes. Cuando el triatomino arrastra con sus patas la materia fecal, se introducen estos tripomastigotes en la laceración inducida por la probóscide del insecto al alimentarse; también es posible que el huésped se infecte a sí mismo al llevar las deyecciones en la piel, hacia alguna mucosa o a la conjuntiva ocular (De Fuentes-Vicente *et al.*, 2019; Peña-Callejas *et al.*, 2022).

Los tripomastigotes metacíclicos, una vez dentro del mamífero, se introducen a las células del tejido cercano al sitio de penetración en donde se transforman en amastigotes. Ahí se multiplican por fisión binaria en numerosas ocasiones y alcanzan la circulación sanguínea cuando su elevado número causa la muerte y destrucción de la célula infectada; también se ha demostrado que los amastigotes pueden infectar nuevas células o transformarse con rapidez en tripomastigotes sanguíneos y diseminarse por vía hematogena por todo el organismo, en donde pueden invadir cualquier célula nucleada. El ciclo biológico se completa cuando un triatomino se alimenta de un mamífero infectado y adquiere al parásito que se encuentra en el torrente sanguíneo (Figura 2) (*ibidem*).

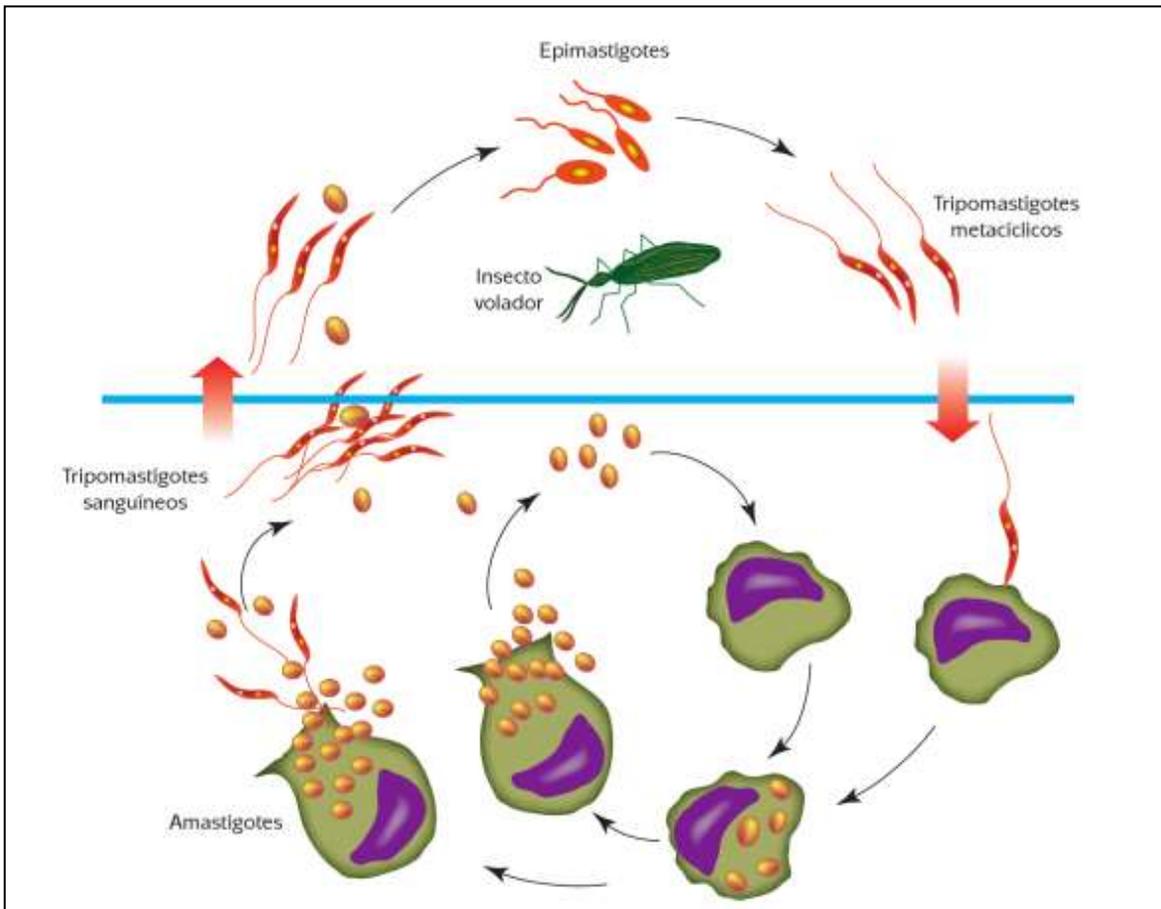


Figura 2. Ciclo biológico de *Trypanosoma cruzi* (Becerril-Flores, 2014).

2.4 Los Insectos vectores

La enfermedad de Chagas es transmitida por unas 120 especies de Triatóminos (comúnmente llamadas chinches) que son hemípteros, estrictamente hematófagos de la familia Reduviidae, subfamilia Triatominae y géneros *Rhodnius*, *Triatoma* y *Panstrongylus*, conocidos con nombres diferentes según el país: pitos, chinches besadores o besucones; chiribicos en Colombia; barbeiros, en Brasil; vinchucas, en Chile y Argentina; chipos, en Venezuela entre otros (Burguete-Gutiérrez, 2014).

En México se han reportado 32 transmisores de *Trypanosoma cruzi*, 19 pertenecen al género *Triatoma* y seis al género *Meccus*, dos especies al género *Panstrongylus* y una especie de cada uno de los siguientes

géneros: *Belminus*, *Dipetalogaster*, *Eratyrus*, *Paratriatoma* y *Rhodniud*. Los géneros *Dipetalogaster* y *Meccus* y ocho especies del género *Triatoma* son exclusivos de México; *Triatoma gerstaeckeri*, *T. neotomae*, *T. lecticularia*, *T. protracta*, *T. dimidiata*, *T. infestans*, *Dipetalogaster maximus* (Molina-Garza et al., 2007, Salazar-Schettino et al., 2010).

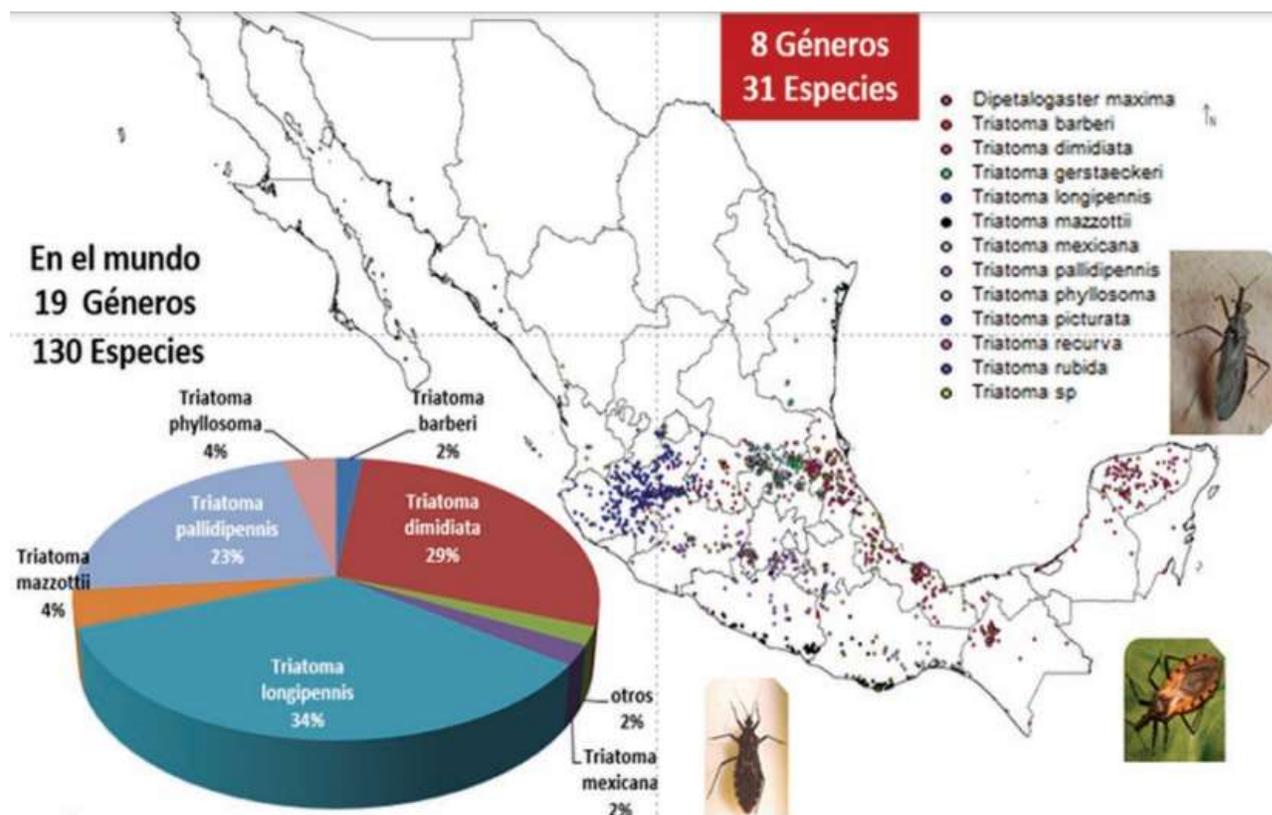


Figura 3. Distribución de triatóminos en México (Salazar-Schettino et al., 2010).

Los triatómidos necesitan encontrar alimento y escondrijo. Estos insectos se asocian a diferentes fuentes de alimentación, preferentemente de sangre caliente, como aves y mamíferos, pero también, dependiendo del ecotopo, pueden alimentarse de animales poiquilotermos, como anfibios y reptiles (Diotaiuti, S/A en Burguete-Gutiérrez, 2014).

2.5 Principales especies de mamíferos reservorios de *T. cruzi*

Un total de 180 especies de mamíferos pertenecientes a los siguientes ordenes: Didelphidomorphia, Lagomorpha, Chiroptera, Rodentia, Pilosa, Cingulata, Carnivora, Primata, Perisodactyla, se han encontrado naturalmente infectados por *T. cruzi*, incluyendo al hombre, el cual además de padecer de la enfermedad actúa como reservorio. Otros grupos de vertebrados como aves, anfibios, reptiles y peces parecen ser refractarios a este hemoflagelado por incompatibilidad antigénica, ausencia de reconocimiento y señalización celular, así como niveles inadecuados de temperatura sistémica (SSA, 2019).

Como el *Trypanosoma cruzi* parasita sólo mamíferos, es necesario diferenciar las fuentes de alimentación de las fuentes de infección. Las fuentes de infección silvestre de los triatómidos son pequeños mamíferos pertenecientes a siete órdenes diferentes: *Marsupialia*, *Edentata*, *Chiroptera*, *Carnívora*, *Lagomorpha*, *Rodentia* y *Primates*. Desde el punto de vista epidemiológico, los marsupiales tienen una gran importancia, ya que presentan altas tasas de infección y alta sinantropía, estableciendo un puente entre los ciclos silvestre y domiciliar de la infección. Lo mismo se puede decir con relación a los roedores, ya que algunas especies también son sinantrópicas. En el ambiente artificial, perros y gatos son los principales reservorios del *T. cruzi*, siendo los perros considerados los “centinelas” en áreas bajo control, pudiendo indicar la ocurrencia de ciclo de transmisión y la necesidad de medidas para impedir la expansión del foco. En el peridomicilio, las gallinas son las principales fuentes de alimentación, pero los triatómidos también aprovechan la sangre de diferentes animales en este ambiente. Pequeños mamíferos, como roedores, zarigüeyas o perros tienen un importante papel en el mantenimiento del ciclo de transmisión del *T. cruzi* en el ambiente artificial (Herrera, 2010).

2.6 Mecanismos de infección de *Trypanosoma cruzi*

Trypanosoma cruzi puede ser transmitido por diferentes rutas: Por transmisión vectorial, la vía congénita, trasplante de órganos, accidentes de laboratorio y en casos excepcionales infección a través de la leche materna o por transmisión sexual (Noireau, 1999; Valente *et al.*, 1999; Abad-Franch y Aguilar, 2000).

Transmisión vectorial. La infección por transmisión vectorial ocupa el mayor porcentaje en el contagio (80%) producida por hematófagos obligatorios de la subfamilia Triatominae. En la república mexicana han sido reportados siete géneros: *Beliminius*, *Dipetalogaster*, *Eratyrus*, *Panstrongylus*, *Paratriatoma*, *Rhodnius* y *Triatoma* y están distribuidos en todos los estados; las especie de mayor importancia médica pertenecen al género *Triatoma* con 24 especies en el país (Salazar-Schettino y Marín, 2006; SSA, 2019).

El vector más importante de la enfermedad de Chagas es *Triatoma dimidiata* y se encuentra distribuido desde el norte de América pasando por todos los países de América Central hasta llegar a México. (Botero y Restrepo, 2003; Ramsey *et al.*, 2015).

Transmisión por transfusión sanguínea o hemoderivados. Las migraciones en América latina han estimulado la emigración a las zonas urbanas en las seis últimas décadas. Como consecuencia, más del 60% de la población vive actualmente en las ciudades, lo que aumenta la probabilidad de infección por *T. cruzi* en donantes de sangre. Mientras no se descarte la sangre de los donantes infectados, existirá la posibilidad de transmitir la infección por medio de la transfusión. Asimismo, la infección transfusional por *T. cruzi* es un problema potencial en los países desarrollados, ya que decenas de miles de latinoamericanos han emigrado a los Estados Unidos, Canadá, los países de Europa Occidental, Australia o Japón (Schmuñis, 1999).

Trasplante de órganos. La transmisión por trasplante de órganos de donadores infectados se ha reportado, sobre todo, en casos de trasplante de

riñón. Los trasplantes de corazón, médula ósea y páncreas de donantes vivos y muertos son también posibles causas de transmisión de la enfermedad de Chagas como se ha notificado en países como Argentina, Brasil, Chile y Venezuela (Guhl, 2009). En la última década, infecciones derivadas del donante de órganos sólidos con *T. cruzi* han sido identificados especialmente en los Estados Unidos y han asociado con una morbilidad y mortalidad significativas a pesar del uso de agentes antiparasitarios, administrados desde la primeras manifestaciones clínicas de la enfermedad (Schwartz *et al.*, 2011).

Enfermedad de Chagas congénita. En muchos casos también es denominada Transmisión vertical o Trans-placentaria) y es consecuencia de una transmisión del parásito durante el embarazo, ya sea en etapa aguda o crónica de la enfermedad y constituye el 10% de los casos seropositivos en la infancia y adolescencia (Werner *et al.*, 2010), y aunque se consideraba limitada a las zonas rurales, se ha notificado cada vez con mayor frecuencia en ciudades donde no hay transmisión vectorial, debido a la migración de mujeres infectadas en edad de procrear (Balouz *et al.*, 2017; Carlier *et al.*, 2019).

Se considera que en América Latina existe un 2-10% de riesgo de contraer la infección por transmisión transplacentaria, es decir aproximadamente entre el 10-20% de las mujeres embarazadas con la enfermedad corren el riesgo de transmitir la enfermedad a sus hijos (Carlier y Truyens 2015; Balouz *et al.*, 2017).

2.7 Fisiopatología de la enfermedad de Chagas

La Fisiopatología de la enfermedad se divide en tres fases o etapas: aguda, crónica asintomática y crónica, las cuales poseen características únicas para su de detección. Los síntomas pueden variar en gravedad según la zona geográfica, lo que hace pensar que existen diferencias en la virulencia de las cepas circulantes e incluso en la resistencia natural a la enfermedad en algunas poblaciones (Salazar- Schettino y Marín, 2006).

Fase aguda. Posterior a la contaminación de la picadura o de la piel lacerada por heces de triatominos, el signo de puerta de entrada se puede observar en piel, mucosas o conjuntivas. El cuadro agudo, cuya duración es de dos a ocho semanas, se caracteriza por parasitemia; también se identifica fiebre sin características especiales. Otros signos y síntomas clínicos frecuentes son linfadenopatías, edema subcutáneo, hepatomegalia, esplenomegalia y trastornos del ritmo cardiaco. En 5 % de los pacientes se evidencian signos que permiten identificar el sitio de inoculación: el signo de Romaña, edema bpalpebral, unilateral, no doloroso; el chagoma de inoculación, lesión indurada, indolora, con cambios de coloración aparentes como eritema o un tono violáceo, y que puede aparecer en cualquier parte del cuerpo (SSA, 2019).

Los tripomastigotes metacíclicos infectantes al entrar al organismo son fagocitados por los macrófagos regionales y englobados en un fagosoma de donde escapan y se dirigen al citoplasma, allí se transforman en amastigotes donde se reproducen por división binaria, estas se diferencian en tripomastigotes que rompen las células infectadas (Pérez *et al.*, 2007). Los parásitos libres invaden otras células que también se lisan causando una reacción inflamatoria con infiltrado de diferentes tipos de leucocitos y alcanzando el pico máximo de parasitemia después del décimo día de la infección. En este momento aparece la fiebre que es proporcional a la parasitemia, la cual puede estar acompañada de escalofríos o no y ser continua o intermitente.

A partir de los ganglios linfáticos hay diseminación hacia el hígado, bazo, médula ósea y corazón, pudiendo aparecer hepatoesplenomegalia y anemia leve. El compromiso cardiaco agudo tiene el curso de una miocarditis que no es diagnosticada usualmente. Estos síntomas son moderados y atípicos, razón por la cual la enfermedad es reconocida solo entre 1% y el 2% de los pacientes (Botero y Restrepo, 2003). En la forma generalizada grave se observa meningoencefalitis y miocarditis franca que pueden ser fatales, pero a pesar de esto el índice de mortalidad en la fase aguda es bajo, cercano al 10 % (Pérez *et al.*, 2007).

Por lo general, el periodo de incubación dura de tres a 10 días y se pueden encontrar parásitos en la circulación sanguínea en un lapso de cuatro a seis meses luego de la infección; la parasitemia es más intensa durante el primer mes (Salazar- Schettino y Marín, 2006). La fase aguda desaparece pasando a una fase asintomática o de aparente normalidad

Fase crónica asintomática. Después de la fase aguda ocurre una respuesta inmune que provoca la disminución de la parasitemia y mantiene la infección en algunos focos selectivos. Este período va desde el final de la fase aguda hasta la aparición de los primeros síntomas de la fase crónica. Es llamado latente o indeterminado con una duración media de 10 años. En esta fase el paciente es asintomático a pesar de las alteraciones que se presentan en los plexos parasimpáticos del corazón y el tubo digestivo. Hay poca parasitemos y parásitos en tejidos (Pérez *et al.*, 2007).

La serología es positiva y puede demostrarse parasitemia entre el 20% y el 60% de los casos. Las personas en esta fase constituyen un reservorio de la enfermedad (Rojo-Medina *et al.*, 2018).

Fase crónica. Se caracteriza por una reducida parasitemia y lesiones típicas en el corazón y tubo digestivo, aunque depende del tropismo de la cepa de *T. cruzi*. Durante ésta la patología más importante es la cardiopatía chagástica. Inicialmente hay compromiso de las cavidades derechas con miocarditis y desintegración de las fibras miocárdicas. Los nidos de parásitos generan un infiltrado mononuclear que favorece la liberación de antígenos y sustancias tóxicas que causan edema intersticial. También se producen autoanticuerpos contra el endocardio, los vasos sanguíneos y el intersticio del músculo estriado (Pérez *et al.*, 2007).

La inflamación alcanza el subendocardio, el tejido adiposo del epicardio y los ganglios nerviosos. A nivel del tejido de conducción también se pueden encontrar nidos de parásitos, edema e infiltrado. Los parásitos se encuentran en

los cortes histológicos aproximadamente en el 30% de los casos. Existe además fibrosis e infiltrado, con predominio de células mononucleadas. El sistema de conducción del corazón, principalmente la rama derecha del haz de His, también se encuentra alterado con fibrosis e infiltrado linfocitario, del mismo (Botero y Restrepo, 2003).

En algunos países, llegan a manifestarse signos y síntomas de la enfermedad en fase crónica después de 15 a 20 años e incluso más tiempo. Se ha estimado que 30% de las personas infectadas desarrolla la fase crónica, de entre ellos, la mayoría desarrolla cardiopatía crónica (27%) y alteraciones crónicas digestivas y neurológicas (6 y 3%, respectivamente, es frecuente la muerte súbita sin haber desarrollado insuficiencia cardíaca congestiva (Rojo-Medina *et al.*, 2018).

2.8 Métodos de diagnóstico

La Organización Mundial de la Salud recomienda utilizar al menos tres pruebas diagnósticas para confirmar los resultados positivos.

Existen en la actualidad múltiples métodos de laboratorio para la detección de la infección por *T. cruzi* que incluyen desde técnicas de tinción y frotis de sangre periférica, determinación de anticuerpos, xenodiagnóstico y cultivo, hasta anticuerpos monoclonales y reacción en cadena la polimerasa (Vacca-Carvajal y Mercado-Reyes, 2005). En general las pruebas pueden dividirse en aquellas donde se detecta el parásito de manera directa o indirecta.

Pruebas parasitológicas directas. Son aquellas que establecen directamente la presencia del parásito, por lo que son más útiles en la fase aguda de la enfermedad, cuando la parasitemia es alta. (García *et al.*, 2013); entre estas pruebas están:

Examen en fresco. Tiene por objetivo visualizar los tripomastigotes en una gota de sangre entre lámina y laminilla. La búsqueda se facilita con el microscopio de contraste de fase.

Extendido coloreado. Los extendidos delgados o frotis de sangre o plasma, se pueden colorear con Giemsa y son importantes para la identificación morfológica del parásito.

Método de Strout. Se colectan 5 mL de sangre del individuo sospechoso, se dejan en reposo a temperatura ambiente, para que la coagulación y retracción espontánea del coágulo ocurra. Se centrifuga el suero obtenido a 160g/5 min., para la separación de los eritrocitos aún en suspensión, y enseguida se hace nueva centrifugación a 350g/10 min., para obtención del sedimento que es observado en el microscopio. Este método tiene alta sensibilidad, pudiendo alcanzar 95% de éxito en la fase aguda (Siqueira *et al.*, 1994).

Biopsia. Con este método se busca comprobar las formas tisulares de *T. cruzi*, observando pseudoquistes con los amastigotes en su interior. Es especialmente útil la biopsia de ganglios.

Xenodiagnóstico. En donde se utiliza al insecto vector como medio biológico de cultivo para la detección de la infección en el hombre y otros mamíferos. En el procedimiento se usan ninfas de triatomíneos, libres de infección, criadas en el laboratorio, las que posteriormente son alimentadas sobre el individuo con sospecha de la infección. Después de 30 días de la alimentación, se realiza una compresión abdominal suave para lograr una gota de deyecciones del insecto o mediante una extracción, trituración y homogenización del intestino de la ninfa; finalmente las muestras son observadas en el microscopio busca las formas móviles del *Tripanosoma*. Esta prueba tiene un sensibilidad de 85% en la forma aguda, 80% en las congénitas y 49% en las crónicas.

Pruebas indirectas. Estos métodos tienen por objeto multiplicar los parásitos en el laboratorio a partir de diferentes muestras del paciente y son más sensibles que los métodos directos, sin embargo su inconveniente es que los resultados pueden demorarse varias semanas. Se utilizan más frecuentemente en la fase crónica cuando la parasitemia es baja o en investigación (Werner *et al.*, 2010), ellas podemos mencionar.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Es una técnica de biología molecular que utiliza cebadores específicos para amplificar un segmento del ADN de *T. cruzi* en muestras clínicas de pacientes. Es útil para ser empleadas en diferentes tipos de muestras y tejidos en fase aguda, crónica indeterminada y crónica determinada. La PCR es el examen confirmatorio en inmunodeprimidos y en menores de nueve meses y requiere de dos resultados positivos consecutivos para descartar falsos positivos. Se pueden presentar falsos positivos con *T. rangeli*, dependiendo del tipo de cebador que se emplee.

Inoculaciones en animales sensibles. Se emplean ratones procedentes de colonias protegidas de infecciones naturales por tripanosomas. Se realiza un inoculación intraperitoneal, subcutánea o en la conjuntiva con la sangre venosa citratada o el material procedente del xenodiagnóstico (deyecciones o macerado de insecto).

Pruebas serológicas. El Inmunodiagnóstico de la Enfermedad de Chagas, se basa en la detección de anticuerpos generados por la evolución de la infección. Teniendo en cuenta los mecanismos inmunológicos de esta enfermedad, las técnicas inmunológicas son de destacada relevancia para el diagnóstico de la etapa crónica, llevando gran ventaja sobre los métodos parasitológicos ya descritos, sin embargo se han encontrado diferencias es la seropositividad dependiendo de la procedencia de las cepas utilizadas (Truyens *et al.*, 2021). Entre las más utilizadas se encuentran:

Inmunofluorescencia indirecta (IFI). Es un procedimiento inmunológico que detecta tanto IgG como IgM. Se preparan placas de vidrio con pocillos a las que se le adhieren epimastigotes de *T. cruzi* (parásito completo) obtenidas de cultivo. Si el suero del paciente tiene anticuerpos, se produce una reacción antígeno-anticuerpo, la que se detecta con la adición de un segundo anticuerpo marcado con sustancias fluorescentes. Esta reacción se observa posteriormente en un microscopio de fluorescencia.

ELISA. Se utilizan placas de poliestireno sensibilizadas con antígeno soluble de *T. cruzi*, los que se unirán a anticuerpos específicos contra el parásito si están presentes en la muestra sérica del paciente. Posteriormente se agrega un conjugado formado por un anti anticuerpo humano unido a una enzima y se podrá evidenciar una reacción positiva si al adicionar sustrato específico de la enzima, se desarrolla una reacción de color, que indicaría la presencia de anticuerpos en la muestra del paciente.

La unión covalente de enzimas a las moléculas de anticuerpos produce una herramienta diagnóstica que aunque compleja es muy útil en el diagnóstico de infección por *T. cruzi* ya que puede detectar anticuerpos tipo IgM o IgG.

Pruebas de hemaglutinación. Este método se basa en la reacción de glóbulos rojos recubiertos con antígenos de *T. cruzi* que entran en contacto con anticuerpos específicos produciéndose una aglutinación de los hematíes (reacción positiva). Tiene alta especificidad pero su sensibilidad es baja, por lo cual no es apropiada para diagnóstico como única prueba (García *et al.*, 2013).

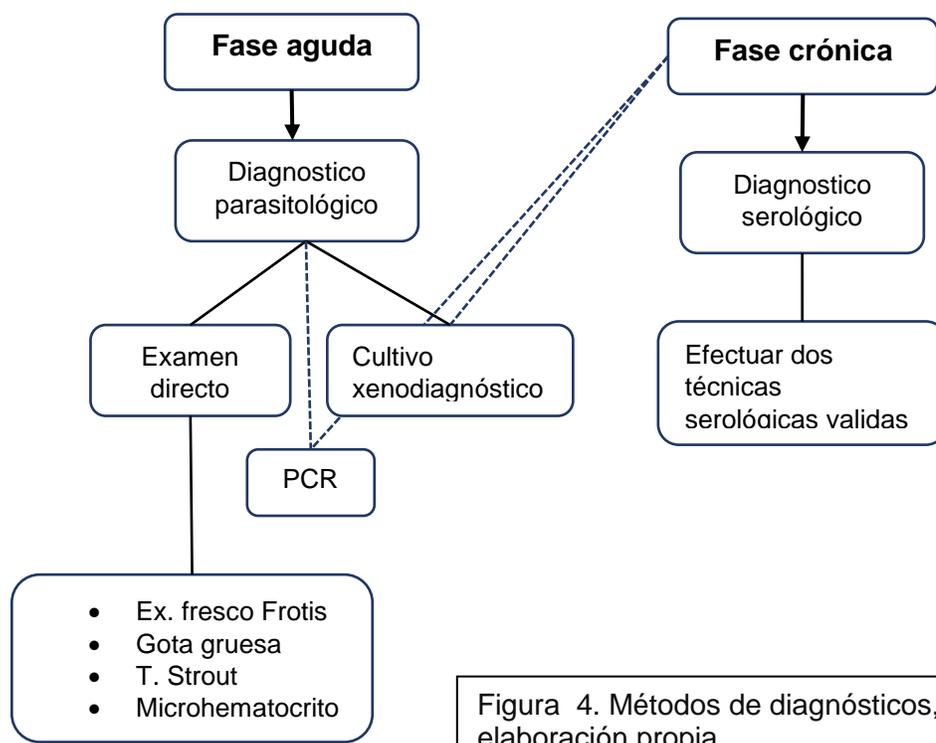


Figura 4. Métodos de diagnósticos, elaboración propia.

2.9 El sistema inmunitario.

Generalidades

El sistema inmunitario o sistema inmunológico es el conjunto de elementos y procesos biológicos en el interior de un organismo que le permite mantener la homeostasis o equilibrio interno frente a agresiones externas. Hay diferentes niveles en la respuesta inmunitaria. Algunos elementos de respuesta son invariantes en el tiempo y se agrupan en la denominada respuesta inmunitaria innata (natural o inespecífico) y alternativamente los elementos capaces de memorizar a los microorganismos se organizan en la respuesta inmunitaria adquirida (adaptativo o específico) (Chaplin, 2010).

Para combatir infecciones, lo primero que debe hacer el sistema inmunitario es identificar los agentes patógenos que lo atacan. Estos tienen en la superficie moléculas llamadas antígenos (principalmente proteínas) que proporcionan una marca única, lo que permite que las células del sistema inmune reconozcan diferentes agentes y distingan a los agentes patógenos de las células y los tejidos propios del cuerpo (Abbas *et al.*, 2015).

Cuando un agente patógeno ingresa al cuerpo, el sistema inmunitario reacciona de dos maneras:

La respuesta inmune innata fue la primera en desarrollarse a lo largo de la evolución, se encuentra en todos los organismos y es la principal defensa en hongos, plantas, invertebrados y otros organismos multicelulares primitivos. En vertebrados se reconoce la presencia de la respuesta inmune innata y la adaptativa (Chaplin, 2010).

La respuesta innata es la primera línea de defensa contra patógenos; participan factores solubles, como las citocinas, y proteínas, además de células conocidas como efectoras, entre las que destacan los granulocitos, mastocitos, macrófagos, células dendríticas, células asesinas naturales (células NK por las siglas en inglés, natural killer) y las células T asesinas naturales (células NKT). Sin embargo, la respuesta innata es inespecífica generando sobre reacciones en el

cuerpo, como el síndrome de respuesta inflamatoria sistémica, así como las alergias (Abbas *et al.*, 2015).

Respuesta inmunitaria adaptativa: es de reacción más lenta pero tiene mayor capacidad para dirigirse contra agentes patógenos específicos. Hay dos tipos principales de células involucradas en esta respuesta: las células T y las células B. Algunas células T matan a los agentes patógenos y células infectadas. Otras células T ayudan a controlar la respuesta inmunitaria adaptativa. La función principal de las células B es producir anticuerpos contra antígenos específicos.

Los anticuerpos también conocidos como inmunoglobulinas, son proteínas que se adhieren a los agentes patógenos. Esto envía una señal a las células inmunitarias para que destruyan los organismos causantes de la infección.

Como parte de la respuesta inmunitaria adaptativa, algunas células T y B se transforman en células de memoria. Estas últimas permanecen, en la mayoría de los casos, en los ganglios linfáticos y en el bazo, y “recuerdan” antígenos particulares. Si una persona contrae nuevamente una infección por el mismo agente patógeno, estas células pueden comenzar a combatir la infección rápidamente (Abbas *et al.*, 2015).

2.10 Respuesta inmune ante Protozoarios

Cuando los protozoos entran en el torrente sanguíneo o en los tejidos, a menudo pueden sobrevivir y replicarse porque se adaptan a las defensas naturales del huésped que se resisten. La interacción del sistema inmunitario con los organismos infecciosos es una interacción dinámica de los mecanismos del hospedero destinados a eliminar las infecciones y las estrategias microbianas diseñadas para permitir la supervivencia frente a los poderosos mecanismos efectores. Los protozoos pueden causar infecciones crónicas y persistentes porque la inmunidad natural contra ellos es débil y porque los protozoos han desarrollado múltiples mecanismos para evadir y resistir la inmunidad específica (Sacks y Sher, 2002).

Mecanismos de evasión inmune de los protozoos:

Gracias a un proceso de adaptación que durante millones de años se ha desarrollado, los protozoarios logran afectar la red inmunológica induciendo respuestas insuficientes o inespecíficas, lo que permite su propagación como agentes infecciosos; aunque hay claridad en cuanto a las diferencias entre las bacterias y los protozoarios pues las primeras logran con éxito superar el sistema inmune por su rápida multiplicación, mientras que los protozoarios parásitos deben cumplir ciclos de vida complejos y lentos que logran finalmente culminar gracias a su capacidad para evadir el sistema inmune de los hospederos, pero fundamentados en procesos evolutivos (Zambrano-Villa *et al.*, 2002).

Los mecanismos o técnicas de evasión más comunes son la inmunosupresión, la hipoantigenicidad o la carencia de antigenicidad (mimetismo), la reclusión antigénica en el interior celular o en lugares del organismo donde los ataques del sistema inmune son menos efectivos, y evasión de los sistemas microbicidas (*ibidem*).

Un ejemplo interesante es *Toxoplasma gondii* que puede evadir los efectos de la generación de productos tóxicos de oxígeno en los fagocitos e ingresar al interior celular mediante un receptor cuya unión no este asociada con la explosión respiratoria. No obstante si este mecanismo se activa, el parásito podría resistir cierto nivel de peróxido de hidrógeno y otros derivados del oxígeno mediante las enzimas catalasa y la superóxido dismutasa.

La variación genética no se constituye propiamente en una estrategia de evasión específica ya que aunque las polimerasas introducen errores que pueden ser seleccionados en la evolución, en los parásitos solo se producen errores ocasionales. Los cambios antigénicos si lo son estrictamente y requieren múltiples genes no alélicos para proteínas de superficie y algún reordenamiento de genes (Gurungm y Kanneganti, 2016).

Específicamente los tripomastigotes de *Trypanosoma cruzi* poseen ácido siálico en su superficie que facilita su permanencia en el espacio intracelular o en el torrente sanguíneo sin ser afectado por los factores humorales. Las formas infecciosas no activan el complemento o por el ácido siálico son resistentes a la lisis mediada por el complemento. También estos tripomastigotes presentan en la superficie la glicoproteína TC85, que facilita la infección al ser el receptor de la fibronectina, que es una glicoproteína presente en el espacio extracelular y en la superficie de distintos tipos de células. *T. cruzi* puede liberar una hemolisina con propiedades similares a las de los componentes del complemento, que podría unirse a la membrana de la vacuola parasitófora desestabilizándola para pasar como amastigote a multiplicarse. En los tripanosomas africanos, como el *T. brucei*, se produce una evidente evasión inmunológica por variación antigénica pues tiene la capacidad de elegir la expresión de un gen para la glicoproteína superficial VSG entre más de 200 genes distintos para la misma molécula, apareciendo una nueva variante de tripanosoma (de Castro *et al.*, 2021).

III. ANTECEDENTES

La infección por *Trypanosoma cruzi* o enfermedad de Chagas fue descubierta por el médico brasileño Carlos Ribeiro Justiniano das Chagas hace más de 100 años, por lo que la enfermedad debe su nombre a él. Es el único caso en que una misma persona descubre una enfermedad, el microorganismo que la produce y al agente biológico que la transmite (Murcia *et al.*, 2013).

Los cultivos de *T. cruzi* en diversos medios han proporcionado información invaluable sobre su ciclo de vida y de la caracterización de los factores involucrados durante su paso a los diferentes estadios. Así en un estudio comparativo entre cultivos axénicos de epimastigotes y amastigotes derivados de tripomastigotes, Engel y Dvorak (1988) muestran que en los cultivos de epimastigotes es posible encontrar mezcla de epimastigotes y amastigotes. En los cultivos, el tiempo de duplicación de la población de amastigotes y epimastigotes es de aproximadamente 33 h; sin embargo, en el caso de los amastigotes la fase de crecimiento exponencial dura solo dos generaciones. Una vez que los amastigotes comienzan a diferenciarse en epimastigotes, el proceso es irreversible.

Cuando se realizan cambios de medio, aparece un número creciente de epimastigotes en tanto que la población restante de amastigotes también crece como consecuencia del cambio del medio de cultivo y posiblemente para no afectar negativamente a las formas amastigotes. La densidad de epimastigotes en un cultivo axénico es independiente de la densidad celular inicial y, en consecuencia, independiente del número de generaciones; sin embargo, a medida que aumenta la densidad celular inicial, el tiempo necesario para que el cultivo alcance una densidad límite disminuye. Las poblaciones de epimastigotes exhiben un crecimiento asincrónico reflejado por la síntesis de ADN. Incluso cuando los epimastigotes en fase estacionaria temprana o tardía (quiescentes o células hambrientas) se subcultivan, el período aumenta en proporción a la cantidad de

tiempo que los organismos están sujetos a condiciones de inanición (Engel y Dvorak, 1988).

En este mismo estudio también se confirma que los epimastigotes son lisados por las proteínas del complemento humano; El 100% de lisis ocurre cuando las células están expuestas al 25% de suero humano normal. Sin embargo, en condiciones idénticas, los amastigotes son resistentes al mismo tratamiento; además, cuando se reincuban en medio LIT, los amastigotes tratados con complemento exhiben el mismo patrón de crecimiento que amastigotes no tratados. El tratamiento complementario de poblaciones mixtas (amastigotes y epimastigotes) da como resultado una completa lisis selectiva de sólo los epimastigotes. En consecuencia, existen diferencias fundamentales entre componentes de la membrana celular presentes en esta formas de desarrollo y amplía el concepto de que la diversidad funcional también existe entre las formas de *T. cruzi* (*ibidem*).

Por sus características nutritivas de alto valor, se evaluó la incorporación de *Lepidium peruvianum* conocida en Perú como “maca”, como un medio para cultivar *Trypanosoma cruzi*. La incubación de epimastigotes de *T. cruzi* en cuatro medios de cultivo bifásicos diferentes, a base de *Lepidium peruvianum*, fueron comparados con el medio de cultivo infusión de cerebro y corazón (BHI) como control. Los resultados mostraron que el medio que contenía maca enriquecida con sangre entre los componentes sólidos y la infusión de maca en la fase líquida, presentó un mayor crecimiento (Saldaña *et al.*, 2006).

Con el fin de analizar el grado de metaciclologénesis *in vitro* en medio LIT e *in vivo* en *Triatoma dimidiata*, Monteón *et al.*, (2009) analizaron cinco aislados de *T. cruzi*, provenientes de distintas regiones del país (Nayarit, Guerrero, Oaxaca, Veracruz y Campeche). Utilizando tripomastigotes sanguíneos se determinó, la curva de parasitemia en ratones Balb/c y la resistencia natural al benzonidazol. Sus resultados indican que la metaciclologénesis *in vitro* fue diferente entre los aislados; resultó más alta para los provenientes de Oaxaca y Nayarit; las más

bajas para los aislados de Campeche y Guerrero; mientras que *in vivo* los aislados de Campeche, Veracruz y Oaxaca tuvieron la metaciclologénesis más alta y la más baja para los de Guerrero y Nayarit. La parasitemia en ratón fue muy similar entre ellos, con excepción del aislado proveniente de Nayarit que fue baja. Se observó resistencia contra benzonidazol superior al 50% para todos ellos (Monteón *et al.*, 2019).

La epimastigogénesis de *T. cruzi* (transformación de tripomastigote sanguícola en epimastigote) ocurre naturalmente a nivel del tracto intestinal del insecto vector y se han implicado múltiples factores en el establecimiento de la infección, como la especie de parásito involucrada así como otros dependientes del vector como el factor lítico del estómago, lectinas, fragmentos de hemoglobina e inanición del insecto. En el trabajo de Graterol *et al.*, (2013) se estudió *in vitro* los cambios morfológicos y los eventos moleculares (peptídicos, glicopeptídicos y proteolíticos) implicados en el cambio a un medio axénico, partiendo de tripomastigotes metacíclicos cultivados en células de riñón de mono (Vero). Los cambios moleculares coincidieron con los cambios morfológicos, con aparición de péptidos y glicopéptidos característicos de epimastigotes. La actividad proteolítica es significativamente mayor en epimastigotes que en tripomastigotes con aumento significativo de la actividad de cisteína proteasas y metaloproteasas, las cuales pudieran indicar una activación diferencial de estas enzimas durante la epimastigogénesis.

El crecimiento de los epimastigotes en medios de cultivo varía en relación al tiempo, medio de cultivo y número de parásitos iniciales, por ejemplo, algunas cepas de Bolivia y de Brasil presentaron picos de crecimiento de epimastigotes en medio de cultivo 3N entre los nueve y once días, cepas de Colombia de 30 días en medio Agar-LIT-BHI y poblaciones aisladas de *Panstrongylus chinai* de Chaman (La Libertad) a los 13 a 18 días en medio 3N y en sólo cinco días cuando se utilizó BHI mezclada con un extracto de maca (Aurazo *et al.*, 2014).

En cuanto a los estudios para determinar la dinámica de la respuesta inmune o su relación con las etapas de la enfermedad, se puede mencionar algunos de ellos.

En el estudio de la composición antigénica de cepas de *T. cruzi* cabe mencionar a García-Escalante *et al.*, (1996) quienes analizaron el perfil inmunogénico de cinco cepas de *T. cruzi*, encontradas en Yucatán. En este estudio mediante la hiperinmunización en conejos, los autores encontraron 25 antígenos inmunodominantes con peso molecular dentro del rango de 199 a 10 kDa, encontrando tres antígenos compartidos de 47, 57 y 52 kDa entre las cinco cepas.

González-Cappa *et al.*, (1999) realizaron un estudio donde observaron el comportamiento de dos cepas distintas denominadas RA y CA-I/K98 en un modelo murino. Sus resultados reportan diferencias importantes en la letalidad, el estadio circulante, anticuerpos y el patrón de patología, Así la cepa RA fue altamente letal para el ratón, con una circulación predominante de formas delgadas la cual estimula la producción de anticuerpos (Ac), con capacidad para interferir con la viabilidad del estadio circulante, además de presentar la capacidad para interiorizarse y multiplicarse tanto en células fagocíticas como no fagocíticas.

Por el contrario, la cepa CA-I/K-98 no fue letal para el hospedero murino, predominaron las formas gruesas en circulación, fue ineficiente para producir anticuerpos efectivos contra el parásito y su capacidad para interiorizarse y multiplicarse intracelularmente fue baja comparada con la cepa RA5-8. En cuanto al tropismo tisular; CA-I/K98 fue altamente neotrópica mientras que RA fue pantrópica, con infecciones en nervio y médula espinal.

Espinoza *et al.*, (2009) detectaron anticuerpos específicos anti *T. cruzi* en un modelo murino utilizando un aislado proveniente de Querétaro y la prueba de inmunoadsorción unido a enzimas- substratos (ELISA) indirecta. El nivel de anticuerpos específicos se determinaron en los días cero, cuatro, ocho, 12, 16, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 y 150 después de la infección. Los ratones

presentaron anticuerpos específicos IgG durante la fase aguda de la infección alcanzando valores similares a partir del día 29 post infección.

En diversos trabajos se ha observado que el uso de antígenos provenientes de cepas de distinto origen geográfico al de los sueros analizados, tienen una variación en los resultados obtenidos, lo que pudiera impactar en el diagnóstico y subregistro de casos (Rubio-Ortiz *et al.*, 2020).

Estas observaciones se han obtenido en sueros provenientes de Puebla, México, en donde Pérez-Fuentes *et al.*, (1998), detectaron niveles mayores de anticuerpos cuando se usó como antígeno las proteínas de extractos totales de cepas de *T. cruzi* autóctonas, en contraste con los bajos niveles de anticuerpos obtenidos cuando se utiliza un antígeno comercial de cepas de parásito de otros países endémicos (Chagastest-Wiener Laboratories Group, Rosario, Argentina).

En Bolivia Chippaux *et al.*, (2009) utilizando dos pruebas, una inmunocromatográfica comercial (Chagas Stat-Pak) y otra por ELISA con antígenos recombinantes, evaluaron 2,484 muestras serológicas (995 de sujetos de una población rural de todas las edades en el sur de Bolivia, 459 de mujeres embarazadas de la misma población y 1 030 de mujeres de población urbana que dieron a luz), encontrando diferencias significativas en la discordancia entre ambas pruebas según la edad y el origen geográfico, que en el caso particular de las mujeres embarazadas estas diferencias fueron alarmantes.

También en el estado de Veracruz, México se observaron grandes discordancias en los resultados de seropositividad a *T. cruzi*, utilizando cinco diferentes ensayos de ELISA (dos caseros y tres comerciales). Aun cuando el lisado de los parásitos obtenidos de la misma región mostró una mejor sensibilidad que las pruebas comerciales, ésta no fue lo suficientemente alta sugiriendo la falta de un repertorio de proteínas antigénicas en el lisado, que cubriera toda la diversidad de los parásitos del lugar de estudio (Guzmán-Gómez *et al.*, 2015).

Cardillo *et al.*, (2015) mencionan que en humanos y ratones, la infección aguda por *T. cruzi* se caracteriza por una alta parasitemia que aumenta después de uno a ocho semanas después de la infección, dependiendo de la cepa de *T. cruzi*, sin embargo, la respuesta inmune inducida no es suficiente para erradicar completamente el patógeno, lo que resulta en una infección crónica. La forma crónica de la enfermedad afecta principalmente al sistema nervioso autónomo periférico en el tracto gastrointestinal y al corazón y al músculo cardíaco en aproximadamente el 30% de los pacientes infectados y puede estar acompañada de mecanismos autoinmunes adicionales desencadenados por el parásito y su persistencia.

Así, los estudios apuntan a la presencia de anticuerpos y de linfocitos T que responden a antígenos del parásito, sin embargo dado que éste persiste en el hospedero por toda su vida se plantea que *T. cruzi* ha desarrollado mecanismos para evadir la respuesta inmune que pueden ser parte del proceso regulatorio asociado con cambios metabólicos y morfológicos del parásito (Ceballos-Pomares *et al.*, 2017).

Palma-González *et al.*, (2021) en la comunidad de Los mezcales, Chiapas, aislaron a partir de heces de *T. dimidiata* formas de tripomastigotes de *T. cruzi*. Los estudios mostraron que el *Trypanosoma* pertenece al linaje TcI, el cual es la variante genética más extendida en México. La infección de éste aislado en el modelo murino de ratones Balb/c mostró que los machos presentan una parasitemia y leucopenia más alta y por el contrario niveles más bajos de anticuerpos anti *T. cruzi* en comparación con ratones hembra. El aislado de acuerdo a la nomenclatura estandarizada es denominado IDIM/MX/16/Mezcales

La membrana de la superficie celular de *Trypanosoma cruzi* debe poseer una serie de propiedades además de las que normalmente se asocian con las membranas de la superficie celular, como el transporte de nutrientes y el mantenimiento del equilibrio iónico. Estas propiedades adicionales incluirán la presencia de receptores para la unión y penetración de las células huésped, la

capacidad de sobrevivir en el ambiente hostil del tracto intestinal del insecto vector y la resistencia al sistema inmunitario del huésped. *T. cruzi* tiene un ciclo de vida complejo y los requisitos e influencias sobre cada etapa morfológica son diferentes; es probable que estas diferencias ambientales y de estilo de vida se reflejen en las propiedades de la membrana superficial de las células. De hecho, varios procedimientos experimentales han demostrado que hay cambios en las propiedades de la membrana superficial entre las etapas; por ejemplo, se han detectado diferencias de carga por unión de ferritina catiónica, unión diferencial de una serie de lectinas para cada etapa, diferencias antigénicas y de proteína de superficie celular y se sabe que la sensibilidad al complemento es diferente (Snary, 1985).

Así, Nogueira *et al.*, (1982) señala la presencia de una glicoproteína de 90 KDa como uno de los dos principales antígenos de la membrana de *T. cruzi* y presente en los tres estadios morfológicos del parásito: sanguíneos, formas de cultivo y staphylomastigotes y cuya función es la de adhesión a las células hospederas y por lo tanto la invasión celular. La glicoproteína se ha evaluado en pruebas serológicas para observar su especificidad con otros parásitos, llegando a tener 100% de sensibilidad, especificidad y valor predictivo en comparación con *T. rangeli* y un 96% con *Leishmania donovani*, *L. major*, *L. mexicana amazonensis* y *Trypanosoma africano* (Guhl, 1990), siendo hasta el momento de gran interés en su uso en el inmunodiagnóstico.

Araujo (1986), reconoció antígenos del grupo de las glicoproteínas de 31 a 21 kDa específicos de *T. cruzi* al no presentar reacciones cruzadas con *Leishmania braziliensis* y *L. donovani*. Y posiblemente ubicada en la superficie de la membrana celular de todas las etapas de desarrollo de *T. cruzi*, así como en varias cepas y reconocidas por personas chagásicas.

Burguete-Gutiérrez (2014) identifica por inmunotransferencia las proteínas de: 89.13, 35.48, 32.36 y 27.54 kDa. 32.36 y 27.54 KDa que fueron reconocidos tanto por el suero de humanos de una comunidad endémica de Chagas como en

grupos de ratas inmunizadas o infectadas con *T. cruzi* de la cepa “Y” brasileña y que pudieran ser inmunodominantes.

El análisis de los antígenos inmunodominantes compartidos por los sueros de la comunidad endémica, las ratas infectadas con heces de triatómidos y las ratas inmunizadas con el extracto antigénico de la cepa Y fueron los de 89.13, 35.48, 32.36 ,27.54

Yoshida (2005), describe el potencial de algunas glicoproteínas de membrana de *Trypanosoma cruzi*, principalmente en los estadios metacíclicos y en estadios infectantes de tejidos de mamíferos; dentro de estas moléculas menciona a una glicoproteína perteneciente al grupo de las mucinas cuyo peso molecular es de 35/50 KDa en los geles de poliacrilamida. Según el autor esta molécula no es tan eficaz en la invasión de las células del hospedero debido a una pobre capacidad de ser inducida por Ca_2^+ y es más abundante en las cepas menos infectantes. De Lima *et al.*, (2007), documentaron el reconocimiento de un antígeno de 35 KDa en pacientes chagásticos crónicos, teniendo una dominancia de 59.4 %.

VI. OBJETIVOS

4.1. Objetivo General:

Analizar la capacidad de un aislado de *Trypanosoma cruzi* proveniente de la zona endémica del Estado de Chiapas de realizar la epimastigogénesis *in vitro* así como producir parasitemia en sangre e inducir una respuesta inmune humoral en un modelo murino.

4.2. Objetivos Particulares

- Inducir la transformación de tripomastigotes sanguíneos a epimastigotes en un medio axénico y obtener la curva de crecimiento en el medio de cultivo.
- Analizar la curva de parasitemia de los tripomastigotes sanguíneos en ratones Balb/c de la cepa chiapaneca.
- Evaluar el desarrollo de la respuesta inmune de los ratones infectados mediante la técnica de ELISA.
- Determinar la relación entre la parasitemia de *T. cruzi* en sangre y los niveles de anticuerpos producidos en los ratones infectados.

V. MÉTODO(S)

5.1. Modelo animal

Se manipularon un total de 21 ratones hembras de la cepa Balb/c, con un peso aproximado entre 27 a 30 gr, de camadas libres de infección por *T. cruzi*, procedentes del Laboratorio Multidisciplinario y Bioterio del Instituto de Ciencias Biológicas, UNICACH.

Los animales fueron mantenidos bajo las mismas condiciones de comida, agua, con un fotoperiodo luz y oscuridad 12/12 su manejo estuvo bajo los principios éticos para el uso de animales en la investigación (Nom 062- ZOO-1999).

5.2. Medio de cultivo de *Trypanosoma cruzi* en medio LIT (liver infusión tryptose).

Obtención de forma tripomastigotes de *T. cruzi*.

Las cepa IDIM/Mx/16/Mezcales fue aislada de las heces de *Triatoma dimidiata* colectado de la comunidad los Mezcales Municipio de Amatenango de la Frontera, Chiapas (Palma-González *et al.*, 2021).

Con el fin de obtener tripomastigotes sanguíneos se procedió a limpiar el área torácica de un animal infectado con alcohol al 70% y benzal al 15%; se limpió el área de trabajo y se encendió dos mecheros de alcohol, cinco minutos antes del sangrado. Se anestesió el ratón y se procedió mediante un corte a retirar un poco de la piel y músculo del pecho para dejar al descubierto el corazón. Mediante una jeringa estéril se realizó la extracción sanguínea directa del corazón, hasta que se obtuvo un mínimo de 500 µl de sangre. La sangre fue colocada en un tubo eppendorf estéril con 10 µl de citrato de sodio como anticoagulante. Todos los procedimientos se realizaron apegados a las normas de bioseguridad y asepsia.

Medio LIT para cultivo de *Trypanosoma cruzi*.

Para los cultivos axénicos de *T. cruzi*, el medio utilizado fue LIT (Liver Infusión Tryptose) adicionado con 10% de suero fetal bovino descomplementado y

antibióticos, denominado “medio completo”. Las especificaciones de su preparación se muestran en el anexo 1.

5.3 Transformación a epimastigotes

Tres tubos con medio de cultivo completo fueron inoculados con diferente número de tripomastigotes sanguíneos bajo las siguientes condiciones:

No. de tripomastigotes totales	Volumen de medio (mL)	No. de tripomastigotes/ mL
A) 3 225 000	4	806 250
B) 4 175 000	7	596 428
C) 14 612 500	5	2 922 500

Todos los tubos se conservaron en condiciones iguales, a temperatura de 28° C.

A los 10 días posteriores a la inoculación, se tomaron alícuotas de 10 μ l del cultivo para hacer el conteo de parásitos de *T. cruzi* en su estadio de epimastigotes en una cámara de Neubauer. En el momento de identificar las formas flageladas de epimastigotes, los conteos se realizaron cada tercer y cuarto día. Durante el conteo no se consideraron las formas intermedias. Los criterios fueron morfológicos y tipo de movimiento de los parásitos.

5.4. Determinación de la parasitemia en sangre de los ratones infectados

Preparación del inóculo

Los tripomastigotes metacíclicos obtenidos de la sangre de un ratón con infección aguda de *Trypanosoma cruzi*; fueron contabilizaron mediante una cámara de Neubauer (hemocitómetro) para determinar su número por mililitro (figura 5). Para esto se extrajeron 10 μ l de sangre diluyéndolos en 90 μ l de citrato de sodio al 3.8 % en una solución amortiguada de fosfatos (PBS) pH 7.2,

(dilución 1:10); Se añadió 10 µl en cada reglilla de la cámara de Neubauer, examinándose microscópicamente (ocular 40X y objetivo 40X).

Se contabilizaron los tripomastigotes en un cuadro (divisiones); repitiendo el conteo en el cuadro opuesto de la cámara y se utilizó la siguiente fórmula para determinar el número de parásitos por mililitro.

$$\frac{N^{\circ} \text{ de parásitos contados}}{N^{\circ} \text{ de cuadros contados}} \times 10,000 \text{ (Factor de conversión)} \times \text{(Dilución)}$$

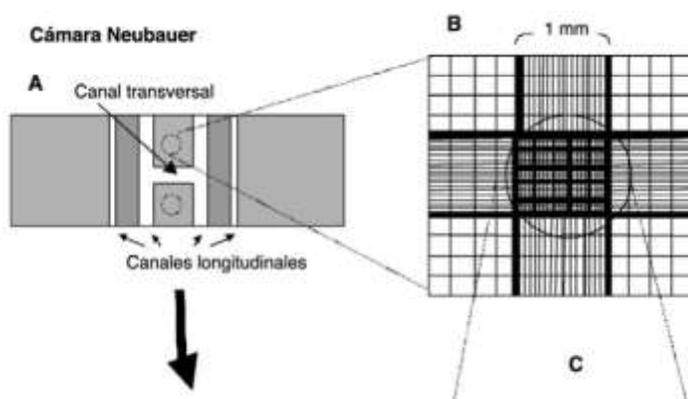


Figura 5. Cámara de Neubauer, tomado de Díaz-Gómez, 2014.

Infección experimental de ratones Balb/c con un diferente número de tripomastigotes sanguíneos de *T. cruzi*

Se formaron cuatro grupos al azar de cinco o seis animales que fueron infectados por vía intraperitoneal con diferente número de tripomastigotes metacíclicos de *T. cruzi* de acuerdo al siguiente esquema.

Grupo 0. Sin infección (grupo control)

Grupo 1. Infección con 25 000 tripomastigotes sanguíneos

Grupo 2. Infección con 50 000 tripomastigotes sanguíneos

Grupo 3. Infección con 100 000 tripomastigotes sanguíneos

Cada tercer día a partir de la inoculación y por un periodo de 90 días, o hasta su muerte, los animales infectados y control fueron sangrados con alrededor de 100 µl por la vena caudal. La muestra sanguínea fue depositada en

un microtubo conteniendo 10 µl de citrato de sodio al 3.8 % en PBS pH 7.2.

Curva de parasitemia en sangre.

Se realizó mediante el examen en fresco de 20 µl de sangre para la búsqueda de tripomastigotes sanguíneos utilizando un hemocitómetro para su contabilización de acuerdo a lo descrito previamente. Lo anterior permitió relacionar la carga parasitaria de los animales con el número de parásitos inoculados.

Todos los conteos se realizaron por duplicado y se obtuvo la media y desviación estándar de cada grupo.

5.5 Determinación de niveles de inmunoglobulinas en los ratones Balb/c infectados

Obtención de plasma de los animales infectados

A partir de los 100 µl de la sangre obtenida de los animales infectados como se anotó anteriormente, se utilizó 20 µl para el conteo de tripomastigotes sanguíneos y los 80 µl restantes fueron centrifugados a 3 000 rpm por 10 min. y el plasma almacenado a -80 °C hasta su uso.

Obtención de antígenos solubles de *T. cruzi*.

Cultivos saludables de epimastigotes de *T. cruzi* fueron centrifugados a 10,000 rpm/ 20 minutos, retirando el sobrenadante. Las “pastillas” unidas de parásitos, fueron lavadas por dos ocasiones con 3 mL de solución amortiguadora de fosfatos pH 7.2 (PBS) y centrifugadas a 10 000 rpm/ 10 minutos a fin de retirar cualquier componente del medio de cultivo. La pastilla final de parásitos se resuspendió en 3 mL de buffer de carbonato-bicarbonato y finalmente se sometió a diez ciclos de congelamiento- descongelamiento rápido, utilizando nitrógeno líquido y agua en ebullición (de -196 °C a 90°C) a fin de lisar los microorganismos y solubilizar las proteínas.

Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA).

La prueba serológica denominada ELISA es una técnica en la cual un antígeno inmovilizado se detecta mediante un anticuerpo enlazado a una enzima capaz de

generar un producto detectable como cambio de color. Se utiliza ampliamente tanto en la clínica como en la investigación debido a su rapidez, sensibilidad, especificidad y puede leerse en un espectro, lo que permite ser cuantificable (Voller, 1978).

En este trabajo se utilizó el ensayo indirecto y un sistema de detección de dos anticuerpos: uno primario contra el antígeno (anticuerpos presentes en el plasma de los animales infectados) y uno secundario contra el primario (Inmunoglobulinas de conejo con actividad anti ratón unidos a peroxidasa de rábano). La detección tiene mayor sensibilidad por presentar una amplificación de la señal debida a la unión de dos o más anticuerpos secundarios por cada primario; se utilizó la o-fenilendiamida y peróxido de hidrógeno como sistema indicador. La preparación de las soluciones se describen en el anexo 2 y el procedimiento se realizó de la siguiente manera.

Los pozos de una placa para ELISA de 96 pocillos se cubrieron con 100 μ l del antígeno a concentración de 10 μ g/mL en buffer de carbonatos pH 9.6 y se incubó toda la noche a 4 °C. Se descartó la solución y se lavó los pocillos por tres ocasiones con 200 μ l de una solución amortiguadora de fosfatos (PBS pH 7.2) conteniendo 0.05 % Tween 20 (PBS/T).

Se bloquearon los sitios libres de los pocillos agregando 100 μ l de una solución de leche en polvo descremada al 1% en PBS/T y se incubó por una hora a 37 °C. Se retiró la solución bloqueadora y a cada pocillo se le agregó 100 μ l de los sueros de ratón diluidos en 1/25 en PBS/T (primer anticuerpo) incubándose durante toda la noche a 4°C. Se descartó la dilución de los sueros y se lavaron los pocillos por tres ocasiones con 200 μ l de la solución de PBS/T en las condiciones descritas anteriormente.

Se agregó a cada pocillo 100 μ l del segundo anticuerpo (conejo con actividad anti ratón IgG + A + M) acoplado a la enzima peroxidasa de rábano; (Zymed - 61-6420), diluido 1/500 con PBS/T y se incubó toda la noche a 4°C. Se descartó el segundo anticuerpo, lavando por tres ocasiones los pocillos con la solución de PBS/T en las condiciones descritas anteriormente.

Se disolvió inmediatamente antes de su uso 40 mg de o-fenilendiamina (Sigma P-9029) en 100 mL de la solución de revelado pH 5.0 (Solución amortiguadora de citrato-fosfato) y se agregó 100 µl de peróxido de hidrógeno al 30 %. De la solución anterior, se agregó 100 µl a cada pocillo y se incubó a temperatura ambiente y en oscuridad durante 20 minutos. La reacción se detuvo agregando 50 µl a cada pocillo de HCl 2.5 M. Las placas se leyeron en un lector de micro placas (Bio Rad model 680) a 490 nm.

Todos los ensayos se realizaron por duplicado y se obtuvieron medias y desviación estándar de las muestras. Los valores medios de los grupos control y experimentales se compararon mediante el análisis estadístico ANOVA y la prueba a posteriori de bonferroni.

5.6 Determinación de las proteínas del extracto soluble de *T. cruzi* en geles de poliacrilamida (SDS- PAGE)

La electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) se lleva a cabo cuando las proteínas de la muestra se solubilizan en presencia del detergente aniónico SDS. Como media, se une una molécula de SDS por cada dos residuos de aminoácidos por lo que la carga nativa original de la molécula está completamente enmascarada por la carga negativa del SDS. Debido a que la cantidad de SDS que se une a las proteínas es prácticamente proporcional a su tamaño, los complejos SDS-proteínas presentan un valor carga/masa constante y por lo tanto se separan de acuerdo a su tamaño cuando migran desde el cátodo al ánodo a una velocidad relacionada con su peso molecular. Además del SDS, se emplean otros agentes desnaturalizantes como son un agente reductor, generalmente el 2-mercaptoetanol que reduce los puentes disulfuro (Cys-S-S-Cys) a grupos tioles (Cys-SH). Para asegurar la disociación de las proteínas en sus subunidades y la pérdida de la estructura secundaria de las proteínas se suele calentar la muestra antes de ser cargada en el gel.

En este trabajo la electroforesis se llevó a cabo de acuerdo al sistema discontinuo de Laemmli (1970). El gel separador se preparó al 10% de acrilamida/

biacrilamida y el gel concentrados al 5%; La solución de corrimiento electroforético fue Tris-HCl 0.025 M, Glicina 0.192 M, SDS 0.1%, pH 8.3 en los compartimentos del ánodo y cátodo. El corrimiento electroforético se realizó con el sistema de Mini-Protean II (Bio Rad) y de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La preparación de las soluciones y ensamblado de los geles se describe en el anexo 3.

Se colocó 50 μ l de las proteínas solubilizadas de epimastigotes (obtenidas de acuerdo al procedimiento que se describe abajo) en uno de los pocillos del gel concentrador de acrilamida, y en otro 6 μ l de marcador de peso molecular con un rango de 120 a 20 kDa (Thermo scientific); la corriente eléctrica se ajustó a 80 volts hasta que la muestra llegó gel separador y posteriormente se aumentó a 100 volts por una hora o hasta que el frente electroforético llegó al borde del gel.

Una vez terminada la electroforesis, el gel se colocó en un recipiente para la tinción de las proteínas con Coomasie Azul Brillante (Coomassie® R-250 0,1 %, metanol 20 %, ácido acético 10 %), durante una hora a 60°C. Posteriormente se retiró la solución teñidora y se agregó solución decolorante (metanol 20 %, ácido acético 10 %) en agitación constante hasta la visualización de las bandas de proteínas sobre un fondo transparente.

Preparación de las proteínas solubles de epimastigotes para los geles de acrilamida

En un tubo falcón estéril se depositó 6 mL de un subcultivo de epimastigotes de *T. cruzi* y se centrifugó a 12, 000 r.p.m. / 20 min. La pastilla de parásitos se lavó en dos ocasiones con cinco mL de PBS pH 7.2 centrifugando a 10 000 r.p.m. /10 min. La pastilla final se resuspendió en un mL de PBS y se transfirió a un tubo eppendorf estéril. Los parásitos se sometieron a cinco ciclos de congelamiento–descongelamiento (cinco minutos a -80° C. y un minuto a 95° C) a fin de lisar los parásitos. La muestra se almacenó a -80° C. en alícuotas de 100 μ l en tubos estériles hasta su uso. A una muestra de 100 μ l de parásitos lisados, se agregó 100 μ l de buffer de carga para electroforesis conteniendo β -Mercaptoetanol a fin

utilizar condiciones reductoras en las proteínas. El tubo se colocó en baño maría en ebullición durante cinco minutos, se agitó en vortex y se centrifugó a 3000 rpm/ 5 min.

VI. RESULTADOS

6.1. Transformación y curva de crecimiento de epimastigotes *in vitro* de *Trypanosoma cruzi*

Con el fin de analizar si el número de tripomastigotes sanguíneos favorece la epimastigogénesis en el medio de cultivo LIT, se realizaron diferentes cultivos que fueron inoculados con un número variable de parásitos sanguíneos y seguidos durante 70 días. La transformación y proliferación de los epimastigotes (figura 6) *in vitro* mostró un comportamiento variable que a continuación se describe.



Figura 6. Cepa IDIM/Mx/16/Mezcales de *Trypanosoma cruzi* en estadio epimastigote cultivado *in vitro*.

A. Inóculo con 806 250 tripomastigotes sanguíneos/ mL en el medio LIT

Bajo estas condiciones la transformación de tripomastigotes a epimastigotes inició entre los días 15 al 17 post inoculación. El conteo inicial de epimastigotes fue de aproximadamente 3 500 parásitos/mL y posteriormente se observó un crecimiento exponencial hasta el día 38, con el máximo de crecimiento en el día 45 post-inoculación. El descenso de epimastigotes móviles en el cultivo se observó a partir del día 45 hasta el 69: sin embargo un aumento parece iniciarse a partir del día 73 (figura 7).

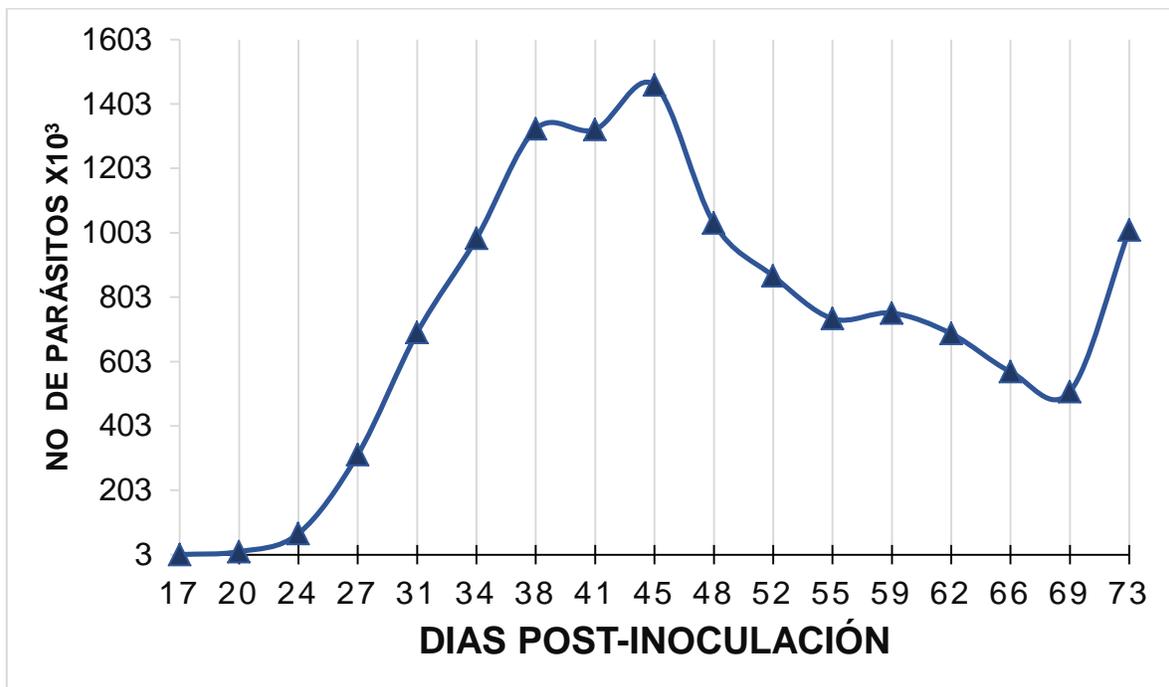


Figura 7. Curva de crecimiento del cultivo A de epimastigotes, en medio de cultivo LIT completo.

B. Inóculo con 596 428 tripomastigotes sanguíneos/ mL

El cultivo con el menor número de parásitos en el inóculo (o mayor volumen de medio LIT por número de parásitos), también inició la epimastigogénesis a partir del día 17 con 15 000 parásitos /mL y a pesar de que en el día 52 se encontró un descenso de epimastigotes, la población se recuperó rápidamente hasta alcanzar la cifra de crecimiento máximo en los días 55 y 66 con una cantidad aproximada de 29×10^6 de epimastigotes/mL.

Al final de las observaciones se registró un descenso importante de epimastigotes en el cultivo entre los días 66 al 70.

El número de tripomastigotes sanguíneos inoculados sobre la mayor cantidad de epimastigotes detectados (día 66) fue 46 veces superior al cultivo A (Inóculo con 806 250 tripomastigotes sanguíneos/ mL) (figura 8).

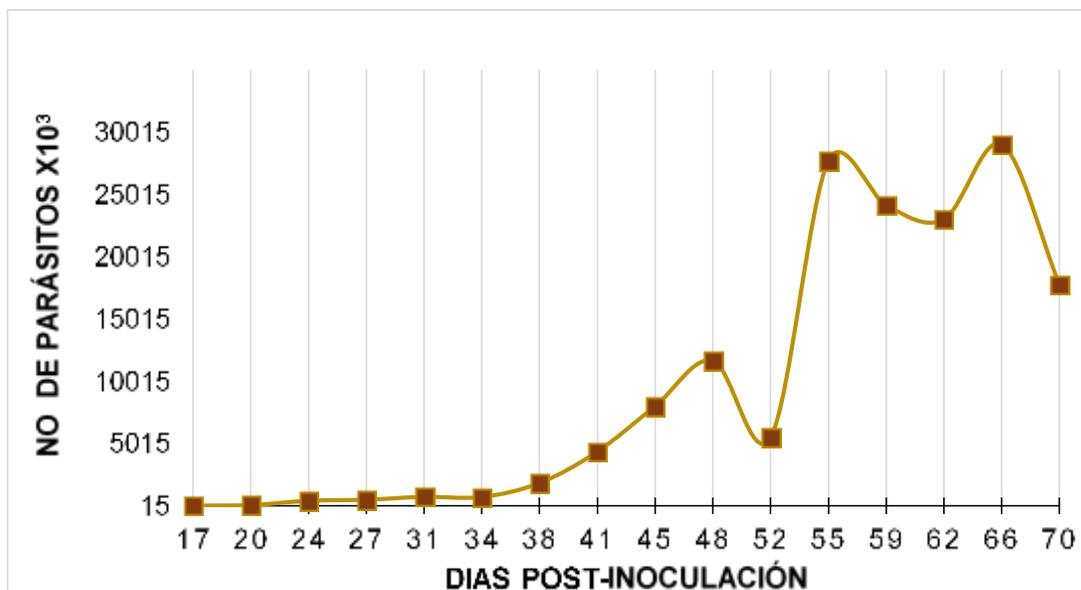


Figura 8. Curva de crecimiento del cultivo B de epimastigotes, en medio de cultivo LIT completo.

C. Inóculo de 2 922 500 tripomastigotes sanguíneos/ mL

Este cultivo se inoculó con el mayor número de tripomastigotes sanguíneos (o menor volumen de medio LIT por número de parásitos) y bajo estas condiciones la epimastigogénesis inició en el día 17, y el número más elevado fue de 46×10^6 / mL que se observó en el día 62. A pesar de algunas fluctuaciones, se registró una tendencia al aumento de parásitos hasta el día 66, para posterior tener una caída importante al final de las observaciones.

El número de tripomastigotes inoculados sobre la mayor cantidad de epimastigotes detectados (día 66), fue de 15.7 veces mayor (figura 9).

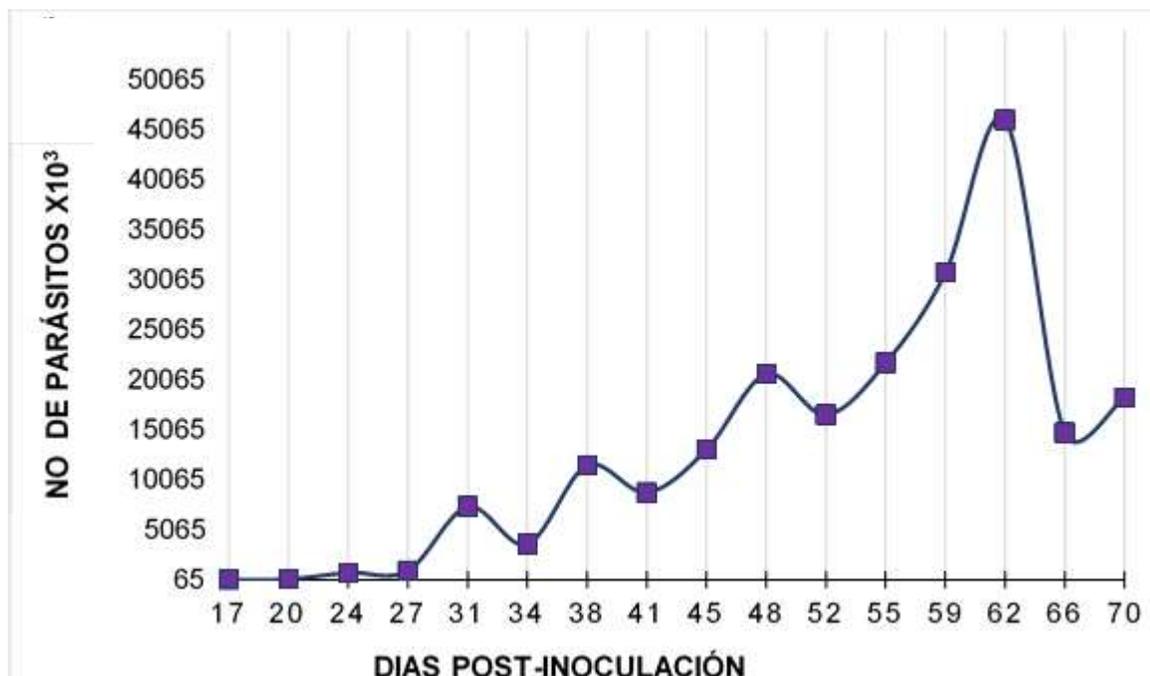


Figura 9. Curva de crecimiento del cultivo C de epimastigotes, en medio de cultivo LIT completo.

6.2. Desarrollo de la infección por tripomastigotes sanguíneos y la respuesta inmune humoral en ratones infectados

El análisis de la curva de parasitemia de los tripomastigotes sanguíneos en ratones Balb/c de la cepa IDIM/Mx/16/Mezcales así como los niveles de inmunoglobulinas detectadas por el Inmunoensayo de ELISA fue observado durante un periodo de 63 días a partir de la infección de los animales. Las muestras se obtuvieron cada tercer y cuarto día desde el inicio de la infección.

Grupo control

Los sueros del grupo control (sin infección) ante el antígeno de *T. cruzi* permitió conocer la especificidad de la prueba de ELISA y servir como referencia de un

valor negativo para los sueros de los animales experimentales. Los sueros del grupo control fueron obtenidos simultáneamente a los animales experimentales.

El valor más alto (en D.O. del suero de los ratones control fue de 0.3418 (figura 10) en el día 18. Con base en estos resultados se determinó que las densidades ópticas (D.O.) menores o iguales a 0.35 pueden ser considerados como negativos ante la presencia de proteínas de *T. cruzi*.

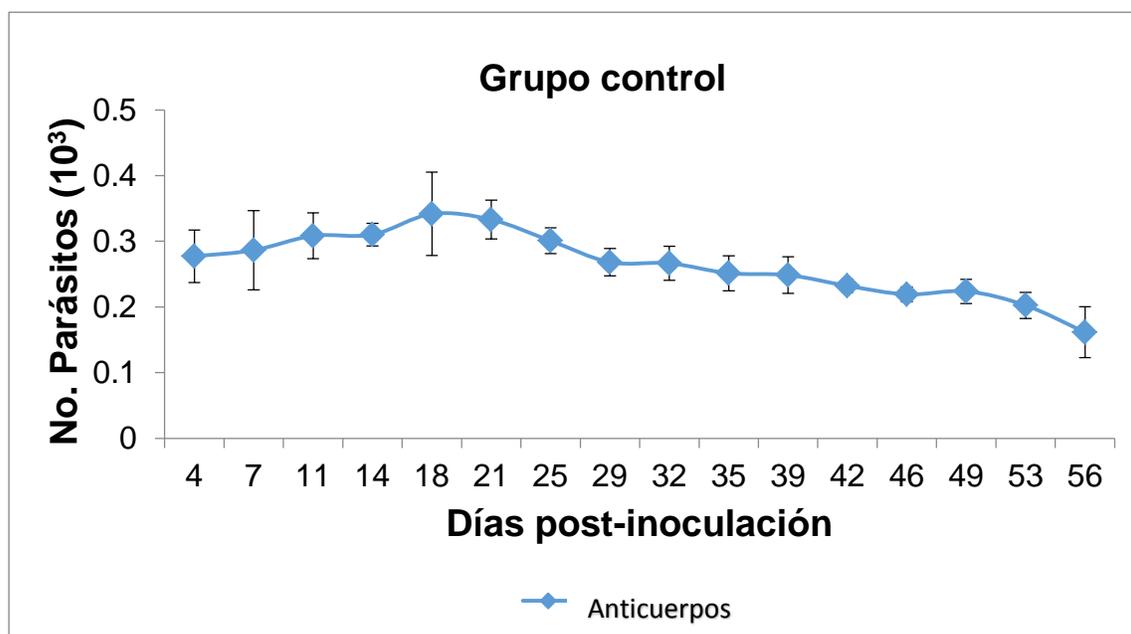


Figura 10. Densidad óptica (D.O.) de los sueros del grupo control.

Grupo uno. Animales inoculados con 25 000 tripomastigotes sanguíneos de *T. cruzi*.

En este grupo, los tripomastigotes sanguíneos fueron detectados a partir del día 14 post inoculación (750 parásitos/mL), y se multiplicaron rápidamente en los animales; El punto de mayor parasitemia se registró en el día 29 post-inoculación con una cantidad aproximada de 9.1×10^6 de parásitos/mL.

A partir de esa fecha se encontró un descenso rápido, llegando a su desaparición. Cabe mencionar que la muerte paulatina de los animales inició a partir del día 32 y solo uno de ellos sobrevivió al día 53. Sin embargo todos los

animales a partir del pico de parasitemia hasta su deceso no registraron la presencia de parásitos sanguíneos.

Los niveles de inmunoglobulina específicas (D.O. mayores a 0.35) pudieron detectarse a partir de día 18 coincidiendo con el alza del números de parásitos. El aumento de las inmunoglobulinas presentó dos elevaciones definidas; el primero y menor entre los días 18 al 29 con su punto más alto en el día 25. Interesantemente éste primer aumento de inmunoglobulinas corresponde al pico de parasitemia de tripomastigotes sanguíneos. A la caída de los parásitos en sangre, los niveles de inmunoglobulinas se elevan considerablemente con su pico siete días posteriores a la negativización en sangre de los parásitos y constituyendo la segunda y mayor elevación con una densidad óptica de 1.29 y al inicio de la muerte de los animales (figura 11).

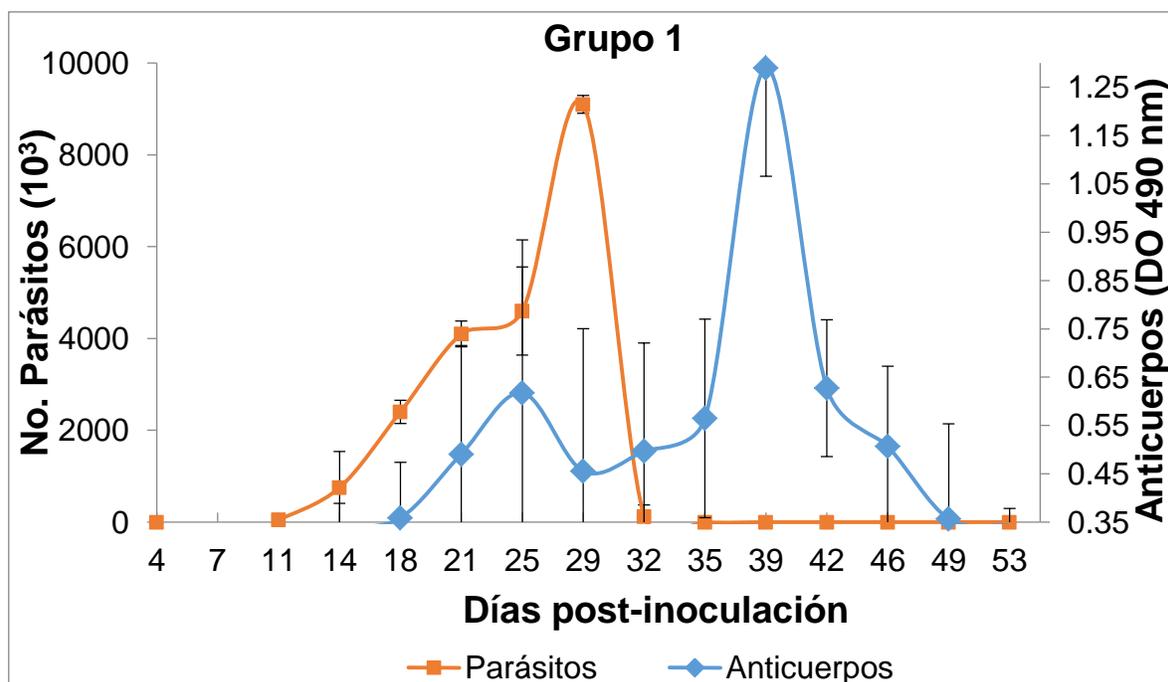


Figura 11. Parasitemia en sangre y niveles de inmunoglobulinas en los animales infectados 25 000 tripomastigotes.

Grupo dos. Animales inoculados con 50 000 tripomastigotes sanguíneos de *T. cruzi*.

En este grupo los tripomastigotes sanguíneos se detectaron a partir del día 11 (41 667 parásitos /mL) hasta el día 35 (41 667 parásitos /mL) post-inoculación. El desarrollo de la infección muestra que el punto de mayor parasitemia se localizó en el día 21 con 1.3×10^6 parásitos /mL para posteriormente iniciar su reducción en el día 25 (583 333 parásitos /mL). Finalmente la negativización de parásitos sanguíneos en los animales inoculados fue a partir del día 39. El deceso de los animales inició en el día 49 y el último ratón vivió hasta el día 63 post-inoculación, siendo el grupo con mayor sobrevivencia.

Los niveles de anticuerpos específicos anti *T. cruzi* (mayor a 0.35 D.O) se detectaron a partir del día 25 elevándose gradualmente y aunque se detectó una pequeña reducción entre los días 42 a 49 (0,68 a 0.57 D.O. respectivamente), el alza se reemprendió hasta su punto máximo en el día 63 (1.163 D.O.) que fue alcanzado 20 días después del pico de parasitemia y 14 días del inicio del deceso de los animales infectados (figura 12).

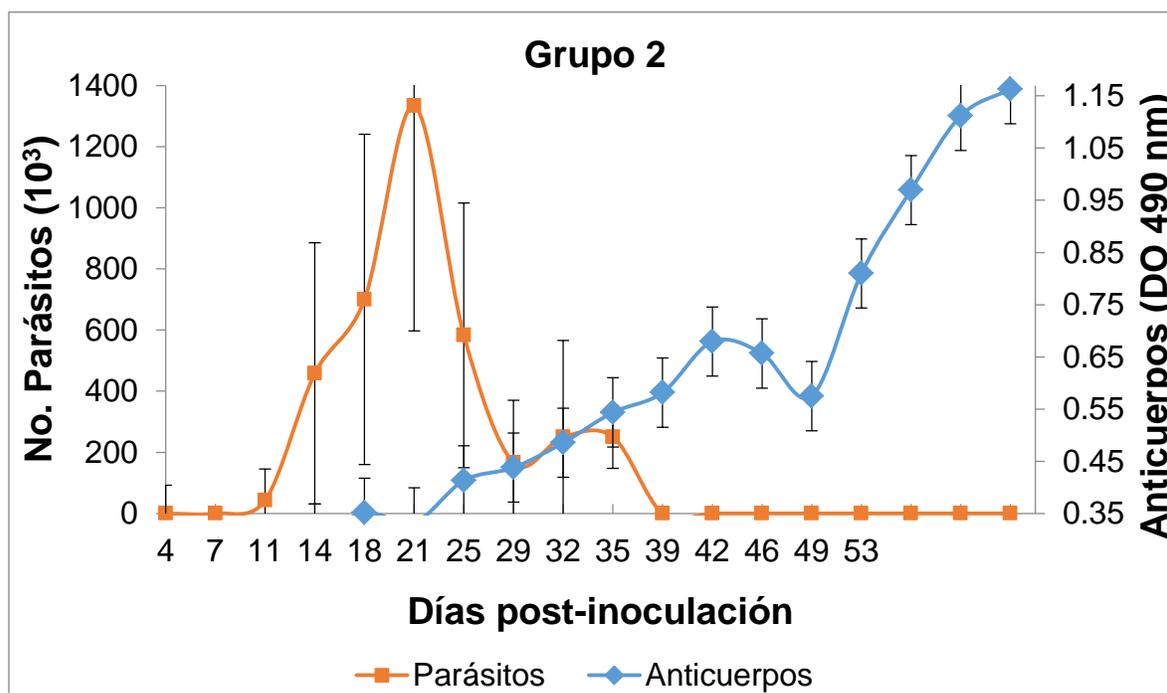


Figura 12. Parasitemia en sangre y niveles de inmunoglobulinas en los animales infectados 50 000 tripomastigotes.

Grupo tres. Animales inoculado con 100 000 tripomastigotes sanguíneos de *T. cruzi*

En este grupo los tripomastigotes sanguíneos se observaron a partir del día 11 (200 000 parásitos /mL) y se prolongó hasta el día 32 (finalizando con 250 000 parásitos /mL) post-inoculación. El desarrollo de la infección muestra que a partir de la detección de los tripanosomas, su número se incrementó rápidamente hasta el día 18 con un pico de parasitemia con 2.6×10^6 parásitos /mL para posteriormente iniciar su reducción. Este grupo fue el de menor sobrevivencia, iniciando el primer deceso en el día 21 y el último ratón hasta el día 46 post-inoculación: es decir siete días menos que los ratones del grupo uno y 14 días menos que los ratones del grupo dos.

Los niveles de anticuerpos específicos anti *T. cruzi* (mayor a 0.35 D.O) se detectaron a partir del día 14 y con fluctuaciones importantes hasta el día 29 posiblemente dadas por las desviaciones estándar altas que se encontraron en la prueba de ELISA. Su punto máximo se alcanzó en el día 39 (0.713 D.O), considerado el de menor nivel de anticuerpos detectado en relación a los grupos dos y tres y alcanzado 21 días después del pico de parasitemia.

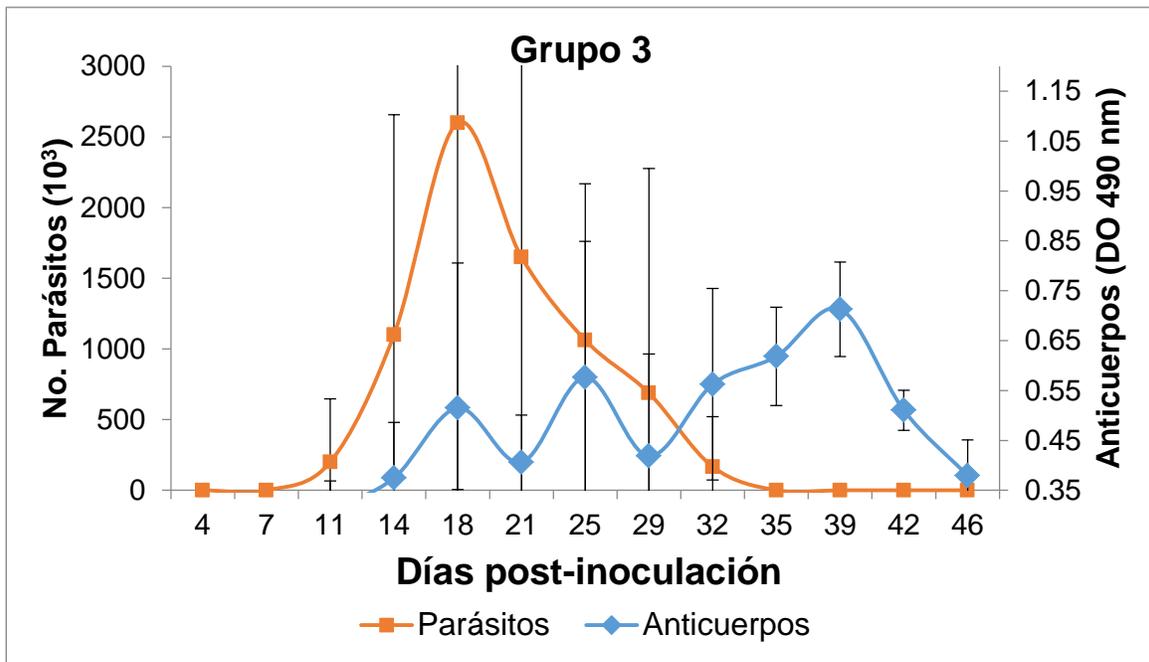


Figura 14. Parasitemia en sangre y niveles de inmunoglobulinas en los animales infectados 100 000 tripomastigotes.

Comparando el tiempo en que se detectó el número máximo de parásitos en sangre y la magnitud de la parasitemia en los animales infectados, se puede observar que aunque en todos los casos la parasitemia inicia a los 11 días post-inoculación, posteriormente no existe una relación clara durante el desarrollo de la parasitemia (figura 14).

Así, el grupo tres inoculado con un mayor número de parásitos, presentó más temprano su punto de parasitemia (día 18) e inversamente, la más tardía, correspondió al grupo uno con el menor número de parásitos inoculados (día 28). Cabe resaltar que a pesar de que los animales del grupo uno, presentaron aproximadamente 2.5 veces más la cantidad de tripomastigotes sanguíneos que los otros dos grupos, también fue el primero en donde se observó la negatividad en sangre (el día 32).

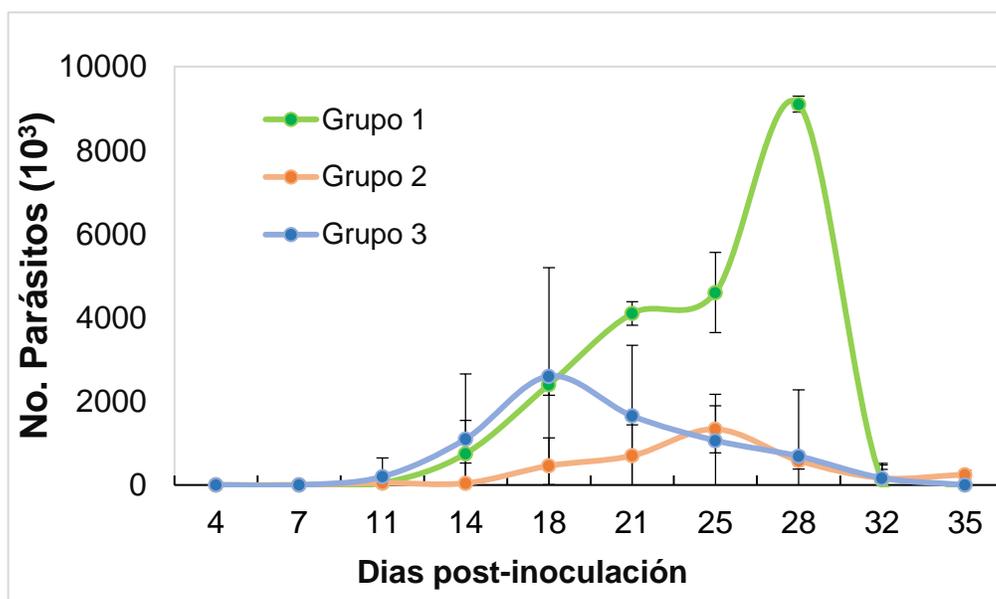


Figura 14. Curva de parasitemia de *Trypanosoma cruzi* cepa IDIM/Mx/16/Mezcales en ratones inoculados con diferentes concentraciones de parásitos tripomastigotes.

Al comparar la respuesta humoral que *Trypanosoma cruzi* provoco en los ratones de los diferentes grupos se puede notar que a pesar de las difencias en los valores de la densidad óptica (D.O.) entre los grupos uno y tres su comportamiento fue similar con los mayores niveles detectados en el día 39 y declinando drásticamente a partir de ese punto. El grupo dos, presento los niveles de anticuerpos mas altos en los ultimos días, que correspondieron a los animales sobrevivientes de ese grupo y que se describe abajo (figura 15).

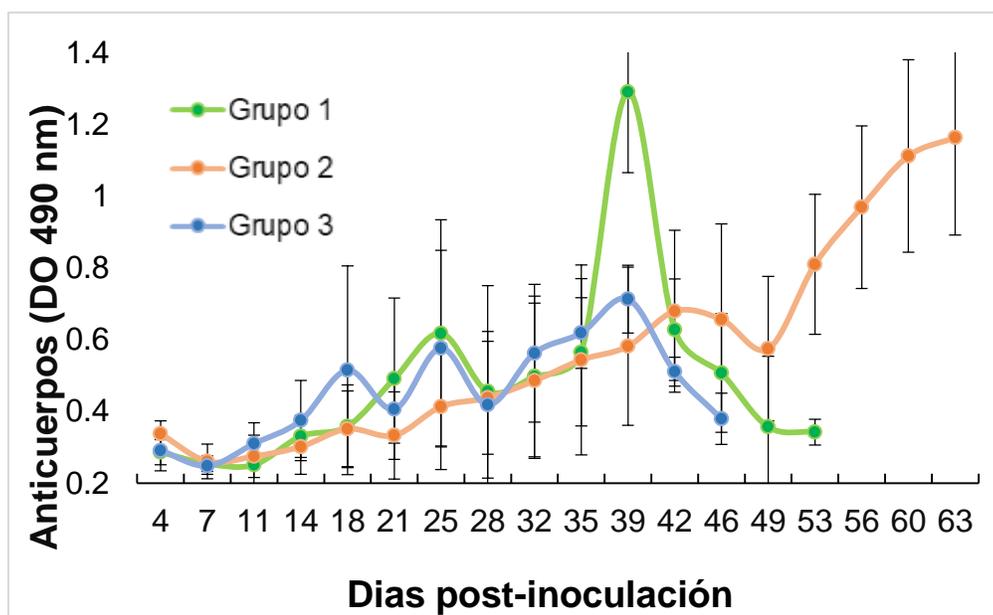


Figura 15. Respuesta inmune de *Trypanosoma cruzi* cepa IDIM/Mx/16/Mezcales en ratones inoculados con diferentes concentraciones de parásitos tripomastigotes.

6.3 Sobrevivencia de los animales a la infección de número diferente de tripanosomas de *T. cruzi*

Como se ha mencionado anteriormente, la mayoría de los animales infectados con tripomastigotes sanguíneos de *T. cruzi*, murieron a diferentes días post inoculación gráfica (figura 16). En el grupo uno inoculado con 25 000 tripomastigotes sanguíneos de *T. cruzi*, todos animales murieron, aunque el deceso de ellos inició en el día 32 y correspondió al día en que todos los animales fueron negativos a las formas de tripomastigotes sanguíneos y elevación de los anticuerpos anti *T. cruzi*.

El grupo dos (seis ratones) infectado con 50 000 tripomastigotes sanguíneos presentó la mayor sobrevivencia; uno de ellos continuo vivo hasta el final del periodo de observación. El deceso de los animales inició hasta el día 49 cuando ya no existen parásitos en sangre y los niveles de inmunoglobulinas están en franco aumento. El grupo más afectado fue el grupo tres, inoculado con el mayor número de parásitos (100 000), además presentó más temprano el pico de parasitemia y el menor título de anticuerpos. Los decesos iniciaron en el día 21 cuando el número de parásitos estaba bajando y los niveles de anticuerpos se comenzaban a desarrollar. Todos los animales murieron.

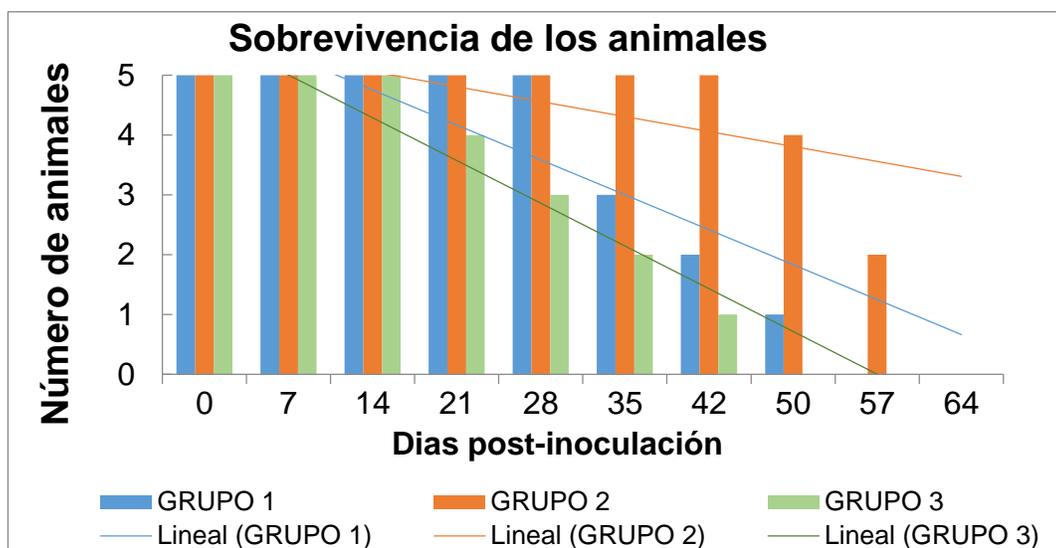


Figura 16. Sobrevivencia de los grupos de animales infectados con diferente número de tripanosomas sanguíneos de *T. cruzi*.

6.4 Análisis de las proteínas del extracto soluble de epimastigotes de *T. cruzi*

La electroforesis en geles de 10% de acrilamida (SDS-PAGE) del homogeneizado de epimastigotes del aislado IDIM/Mx/16/Mezcales de *T. cruzi*, utilizado como antígeno soluble en la prueba de ELISA, reveló en SDS-PAGE aproximadamente ocho bandas de proteínas, con diferentes intensidades ubicadas entre los P.M. de 160 a 20 kDa (figura 17). Cuando se comparó este perfil proteico con el obtenido de la cepa “Y” proveniente de Brasil, se encontró que solo tres de ellas con pesos moleculares de 80, una entre 60 y 50 y una entre 20 y 30 kDa parecen ser coincidentes. Si bien ambos geles fueron corridos bajo las mismas condiciones, frecuentemente existen pequeñas diferencias debido a que el frente electroforético en los mismos geles puede variar.

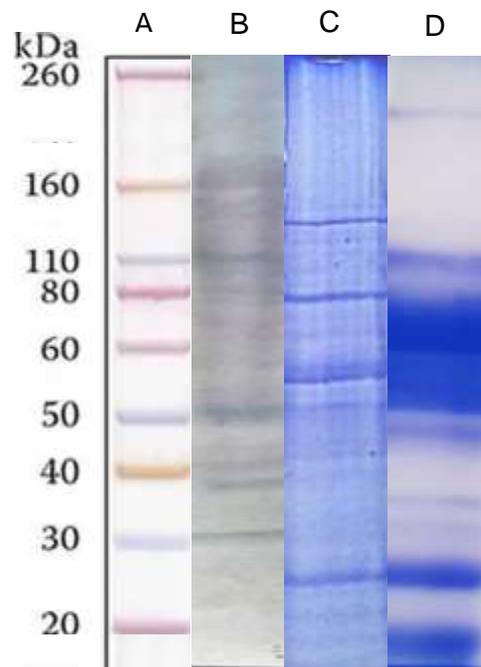


Figura 17. SDS-PAGE de homogeneizados de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*. (A y B) pesos moleculares, (C) perfil de proteínas de la cepa IDIM/Mx/16/Mezcales; (D) perfil de proteínas de la cepa “Y”.

VII. DISCUSIÓN

7.1 Transformación y curva de crecimiento de epimastigotes *in vitro* de *Trypanosoma cruzi*

El protozooario parásito *Trypanosoma cruzi* presenta una gran variedad de cepas y clonas, distribuidas en regiones de casi todo el mundo, dando como resultado que cada una pueda presentar características biológicas, bioquímicas y una heterogeneidad genética; inclusive las cepas que se encuentran distribuidas en un mismo país pueden ser distintas respecto a esas características. En México, se ha observado variaciones importantes como virulencia, metaciclologénesis, zimodemos, esquizodemos y perfiles antigénicos (González-Cappa *et al.*, 1999; Espinoza *et al.*, 2009; Monteón *et al.*, 2009).

Durante la metaciclologénesis, *T. cruzi* pasa por varias fases de transformación de acuerdo al ambiente en el que se encuentre; una de estas fases es la epimastigogénesis que consiste en la transformación del estadio tripomastigote sanguícola a epimastigote, de acuerdo con De Lima *et al.*, (2007) es un proceso fundamental e importante en el mantenimiento de *Trypanosoma cruzi* en la naturaleza. De manera *in vitro* se presenta a través de un hemocultivo y la velocidad de transformación va a depender del medio de cultivo que se utilice, la densidad parasitaria del inóculo, el alto o bajo tenor de oxígeno, temperatura y las condiciones metabólicas del medio (Torres *et al.*, 1988; Contreras *et al.*, 2006; De Lima *et al.*, 2007; Monteón *et al.*, 2009). De acuerdo con Lima *et al.*, (2007) y Graterol *et al.*, (2013) durante la metaciclologénesis la temperatura es un factor muy importante ya que este determinará la progresión del estadio amastigote hacia tripomastigote o hacia epimastigote.

En este trabajo la epimastigogénesis *in vitro* del aislado IDIM/Mx/16/Mezcales de *T. cruzi* se realizó en medio de cultivo LIT con 10% de suero fetal bovino descomplementado y se llevó a cabo bajo condiciones de una oxigenación baja (cultivo vertical) y con temperatura de 28⁰ centígrados. Bajo

estas condiciones, las formas de epimastigotes se observaron a partir del día 15-17 post-inoculación en todos los cultivos, sin embargo su rendimiento (cociente entre el número de parásitos por mL en el día de mayor densidad de epimastigotes / No de parásitos inoculados por mL) varió considerablemente entre cada cultivo, desde 1.8 (inóculo de 806 250 tripomastigotes sanguíneos/ mL en el cultivo B) a 48 (inóculo con 596 428 tripomastigotes sanguíneos/ mL).

En el estudio de la cepa venezolana MHOM/Ve/1967/EPm6, Graterol *et al.*, (2013) reporta que, los tripomastigotes sanguíneos transferidos a medios de cultivos se transforman inicialmente en formas redondeadas equivalentes al estadio amastigote y la velocidad de transformación hacia epimastigotes depende de la caída de temperatura además de otros factores como la tensión de oxígeno disuelto el cual es influenciado por la altura en los medios en el cultivo; los autores señalan que a partir del día dos encontraron un incremento de amastigotes en tanto que el incremento de epimastigotes fue irregular (4,8 y 3,6 veces).

En comparación con cultivos de otras cepas mexicanas provenientes de Nayarit, Oaxaca, Veracruz, Campeche y Guerrero analizados por Monteón *et al.*, (2009), las cuales se iniciaron con un inóculo de 1 millón de epimastigotes /mL, en medio de cultivo LIT, la epimastigogénesis se presentó en todas ellas de 10-12 días post-inoculación. De todas las cepas analizadas, solo una cepa (Veracruz) alcanzó un máximo de 38 millones de estos parásitos/mL y la más baja fue de 12×10^6 parásitos/mL que correspondió al aislado proveniente de Campeche.

En nuestro estudio, el cultivo de la cepa IDIM/Mx/16/Mezcales inoculado con 596 428 tripomastigotes /mL (figura 8) (un poco más de la mitad del utilizado para la cepa veracruzana) (un millón/ mL), alcanzó la cantidad de 29×10^6 de parásitos/mL, pero superando 48 veces su cantidad inicial de parásitos, sin embargo en el tercer cultivo (C, figura 9) se inició con casi tres millones de parásitos/mL el máximo alcanzado fue de 46 millones, superando por ocho millones de parásitos a la cepa proveniente de Veracruz.

De esta manera, nuestros datos coinciden en el periodo de inicio de la epimastigogénesis *in vitro* y la variación en el rendimiento pudo influir tanto la concentración de parásitos como de algunos otros factores del medio (como el oxígeno disuelto), dado que no todos los cultivos tuvieron el mismo volumen y esto en cultivos verticales puede ser crítico. Lo anterior abre una serie de interrogantes que deben ser consideradas, tales como si la velocidad de la epimastigogénesis está determinada por la constitución genética del aislado o por la riqueza nutricional del medio de diferenciación o por ambos.

7.2 Desarrollo de la infección por tripomastigotes sanguíneos y la respuesta inmune humoral en ratones infectados

El parásito *T. cruzi* presenta un patrón de formas clínicas y/o patologías diferentes, probablemente debido a la constitución genética del parásito y del hospedero (González-Cappa *et al.*, 1999; Tibayrenc, 2003; Magalhães, 2022).

Trabajando con modelos murinos, Zúñiga *et al.*, (1997) asociaron la composición de los antígenos expresados en el Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) con la resistencia o susceptibilidad a la infección con *T. cruzi*, de esta manera la cepa HTI presentó 100 % de supervivencia en tanto que las cepas A/Sn y AKR presentaron una alta susceptibilidad con un 100 % de mortalidad entre los días 34 y 54 post-infección. Los ratones Balb/c han sido considerados como susceptibles a la infección.

El estudio con ratones Balb/c de Rodríguez *et al.*, (2000) asocia los niveles de parasitemia máxima en sangre con el tamaño del inóculo, y los machos comparados con las hembras presentan un número de parásitos más elevados. Por otro lado, el periodo de mortalidad se incrementa con la edad, siendo más corto en los animales de cuatro semanas de edad (16-23) que en los de 12 semanas (31-38) y no evidencian la influencia del sexo.

De acuerdo con Palma *et al.*, (2021) la cepa IDIM/Mx/16/Mezcales, pertenece al linaje TcI. Los ratones inoculados con 1×10^5 exhibieron diferencias

importantes en relación al sexo dado que los machos exhibieron una parasitemia más alta que las hembras y desarrollaron leucopenia y niveles más bajos de anticuerpos anti-*T. cruzi* en comparación con ratones hembra.

Dado que en este trabajo se utilizó la misma cepa reportada por Palma *et al* (2021), se procuró que los animales tuvieran semejanza en edad, sexo, peso y condiciones ambientales. El grupo tres, inoculado con el mayor número de parásitos, los primeros decesos iniciaron mucho antes (día 21) comparado con el grupo uno (con menor inóculo de parásitos) y corresponde a lo mencionado por Rodríguez *et al.*, (2000); sin embargo en el grupo dos los decesos iniciaron hasta el día 46 y un animal sobrevivió hasta el final de las observaciones. Es posible que en este grupo y de manera azarosa se localizaran animales con una mayor resistencia genética dado que por el número de animales estudiados no todos corresponden a una camada única.

En cinco aislados provenientes de diferentes regiones geográficas de México y analizada la parasitemia en ratones Balb/c infectados con 5×10^5 formas metacíclicas por vía intraperitoneal, Monteón *et al.*, (2009) mostraron que independientemente del aislado, la presencia de tripomastigotes circulantes en sangre periférica de los ratones se manifestó a partir del día 10 post-inoculación. El aislado de Campeche presentó el pico máximo de parasitemia más elevado (6×10^5 parásitos/mL), hacia el día 22 post inoculación. Los aislados provenientes de los estados de Oaxaca, Guerrero y Nayarit alcanzaron su pico máximo el día 18, aunque el procedente de Nayarit presentó la menor parasitemia.

En este trabajo, utilizando las formas metacíclicas de la cepa IDIM/Mx/16/Mezcales, la presencia de formas sanguíneas de *T. cruzi* se manifestó en todos los grupos de animales a los 11 días post-inoculación lo que está de acuerdo con lo reportado por Monteón *et al.*, (2009). Aunque los resultados estadísticos indican que no existe alguna significancia estadística, el pico máximo de parasitemia se presentó más temprano en el grupo inoculado con mayor número de parásitos (día 18) e inversamente, la más tardía, correspondió al grupo

con menor número de parásitos inoculados (día 28). En este sentido los resultados son semejantes a los encontrados por Rodríguez *et al.*, (2000) con asociación entre los niveles de parasitemia máxima en sangre con el tamaño del inóculo

La variabilidad morfológica, antigénica y espacial combinada con estrategias de evasión activa de *T. cruzi*, presenta un gran desafío para el sistema inmunológico de los mamíferos, sin embargo, en la mayoría de las infecciones crónicas existe un equilibrio estable de replicación y supresión del parásito a través de una combinación de anticuerpos sostenidos y respuestas celulares tipo TH1 lo que llevaría a lo prolongado del tiempo en el que puede aparecer el compromiso tisular y en los asintomáticos, el cual puede ser de años o décadas.

Se considera que en la fase aguda de la enfermedad de Chagas existe una relación estrecha entre la parasitemia, anticuerpos y la gravedad de la enfermedad y que por el contrario en la fase crónica no existe ninguna relación entre la parasitemia, el título de anticuerpos de IgG y la severidad de los cuadros clínicos. Sin embargo se sabe que los títulos de las diferentes subclases de IgG podrían estar elevados en relación con las patologías desarrolladas (Hernández-Becerril *et al.*, 2001).

La infección aguda suele alcanzar su punto máximo, en términos de número total de parásitos y extensión de la diseminación tisular, entre dos a tres semanas después de la infección. Durante las semanas siguientes, la carga de parásitos se reduce en varios órdenes de magnitud gracias a una respuesta inmunitaria adaptativa vigorosa, aunque en última instancia poco eficaz.

En nuestros resultados los títulos de anticuerpos fueron detectados a partir del día 18 post-inoculación y de manera general la respuesta inmune de los grupos uno y tres fue similar en su desarrollo, aunque cuantitativamente diferente dado que ambos grupos alcanzaron el punto máximo de inmunoglobulinas en el día 39 post-infección y teniendo un declive en el día 42 post-infección. Interesantemente en todos los grupos cuando los niveles de inmunoglobulinas son ascendentes, la parasitemia en sangre disminuye drásticamente, hasta

desaparecer e iniciar el periodo de decesos. Los ratones del grupo dos alcanzaron el pico máximo hasta el día 63, además fue el grupo con un nivel de sobrevivencia alto, llegando hasta el día 46 con todos los ratones vivos y con tres individuos hasta el día 60, mientras que, en el grupo tres el último ratón vivió hasta el día 46. Así podemos considerar que lo establecido por González-Cappa *et al.*, (1999) sobre que algunas cepas de *T. cruzi* pudieran evadir la respuesta inmune humoral y que esta aunque vigorosa es ineficiente para controlar la infección. Además se conoce que el parásito presenta un arsenal de estrategias para minar tanto la inmunidad innata como la adaptativa, dado que de acuerdo con Flavia (2015) interfiere con la función tanto de la respuesta inmune innata como en la adaptativa.

7.3 Análisis de las proteínas del extracto soluble de epimastigotes de *T. cruzi*

Durante la infección en los hospederos mamíferos, se observan dos formas del

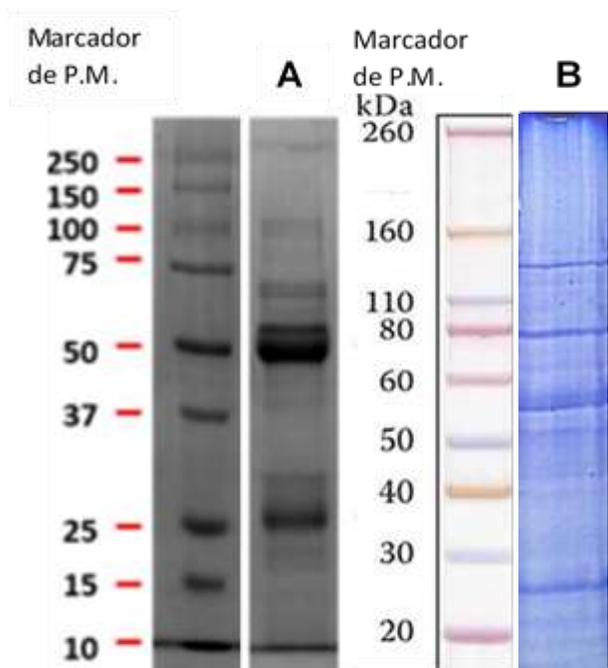


Figura 17. SDS-PAGE: A) cepas oaxaqueñas de *T. cruzi*, tomado de (Martínez Cuevas 2018) comparada con B) cepa IDIM/Mx/16/Mezcales, cada una con sus respectivos marcadores de pesos moleculares.

parásito: tripomastigotes y amastigotes por lo que en el curso de la diferenciación del parásito, cada estadio expresa un patrón de proteínas específicas de fase, las cuales son responsables de sus características morfológicas, bioquímicas y biológicas; los requisitos e influencias sobre cada etapa morfológica se reflejan en las propiedades de la membrana superficial de las células.

La electroforesis en geles de 10% de acrilamida (SDS-PAGE) del antígeno soluble de epimastigotes del aislado de *T. cruzi*

IDIM/Mx/16/Mezcales utilizado en la prueba de ELISA, reveló aproximadamente siete bandas de proteínas con diferente intensidad ubicadas entre los P.M. de 160 a 20 kDa. Burguete-Gutiérrez (2014) reportó un total de 34 bandas o cadenas polipeptídicas con pesos moleculares entre 13.18 a > 200 kDa para un homogeneizado de la cepa “Y”, aunque en otro estudio García-Escalante *et al.*, (1996), solo documentó 22 bandas para la misma cepa, lo que indica que los procesos de extracción pueden dar resultados variables.

Cuando se comparó el perfil proteico de la cepa IDIM/Mx/16/Mezcales con el obtenido de la cepa “Y”, se encontró que tres de ellas con pesos moleculares de 80, una banda entre 60 y 50 y otra banda ente 30 y 20 kDa parecen ser coincidente. La proteína de 80 KDa fue reportada por Nogueira *et al.*, (1982) como uno de los dos principales antígenos de la membrana de *T. cruzi* cuya función es la de adhesión e invasión celular, las bandas de 35-50 (Yoshida, 2005) y de 31 a 21 kDa (Araujo, 1986), fueron reportadas como inmunogénicas y que pudieran ser las responsables de indicar la presencia de anticuerpos anti *T. cruzi* en los ensayos de ELISA.

De acuerdo con Sánchez y colaboradores (2001), es importante hacer uso de antígenos provenientes de cepas mexicanas de *Trypanosoma cruzi* para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas en pacientes infectados en México, dado que incluso la prueba de ELISA, considerada como uno de los ensayos con mayor especificidad y sensibilidad falló al ser utilizada en combinación con antígenos solubles provenientes de cepas fuera de la zona de donde provienen los pacientes. En México las cepas aisladas corresponden DTU I, en contraste con el DTU II que es más común en Argentina (Sánchez *et al.*, 2001).

De acuerdo a lo anterior, podemos observar en la figura 15 que si bien existen algunas concordancias en el perfil proteico, también presentan diferencias, esto no es tan anormal debido a que la cepa “Y” es considerada TcII, mientras que la cepa IDIM/Mx/16/Mezcales pertenece al genotipo TcI (Palma-González, *et al.*, 2021; Magalhães *et al.*, 2022). Martínez Cuevas (2018), revela el perfil proteico de

algunas cepas aisladas en Oaxaca, aunque cabe resaltar que en el estudio se realizó con una mezcla de extractos totales de epimastigotes, con tipificaciones I, II y V, sin embargo la presencia de cepas DTU I fueron las dominantes. En la figura 18 A y B notamos que incluso entre cepas del mismo país (México) y pertenecientes a DTU I existe una diferencia significativa en el perfil proteico, aunque ciertamente esto puede deberse tanto a la combinación de cepas de diferentes DTU's o incluso al hecho de que las escala del peso molecular es diferente a la que utilizamos.

Dejando a un lado las diferencias de ambos métodos, podemos destacar la importancia de hacer pruebas inmunológicas con antígenos provenientes de las zonas de donde provienen las personas a diagnosticar para evitar resultados dudosos o el subregistro de las personas infectadas.

VIII. CONCLUSIONES

- El aislado de *T cruzi* puede iniciar la epimastigogénesis en un medio de cultivo axénico y propagada *in vitro* para futuros estudios
- La formas de epimastigotes en medio LIT se desarrolla partir del día 15-17 aunque su rendimiento posiblemente este condicionado a la cantidad del inculo o al medio de transformación.
- En el modelo murino de ratones Balb/c., el pico de parasitemia en sangre se presenta más temprano cuando el inculo de tripomastigotes es mayor.
- La cepa IDIM/Mx/16/Mezcales de *T. cruzi* es capaz de despertar una respuesta inmune humoral independientemente de la cantidad de parásitos inoculados.
- En el modelo murino utilizado, los parásitos en sangre disminuyen a medida que los anticuerpos se elevan, posiblemente como un mecanismo de evasión.
- La cepa IDIM/Mx/16/Mezcales de *Trypanosoma cruzi* puede ser considerada agresiva capaz de producir muerte en la cepa de ratones Balb/c.
- Las inmunoglobulinas provenientes de los sueros de los ratones infectados con tripomastigotes sanguíneos son capaces de reconocer proteínas solubles del estadio de epimastigote.

IX. PERSPECTIVAS

Dado los resultados del trabajo se pueden visualizar a corto plazo los siguientes estudios

- Identificar los antígenos inmunodominantes que son reconocidos entre un modelo murino y las poblaciones humanas.
- Establecer si los antígenos obtenidos de los cultivos de epimastigotes pueden ser utilizados en el inmunodiagnóstico en poblaciones humanas en el área endémica de Chiapas.
- Establecer la cercanía genética de este aislado con otros aislados que circulen en el estado.

X. REFERENCIAS DOCUMENTALES

- Abad-Franch, F. y Aguilar V. 2000. Control de la enfermedad de Chagas en el Ecuador: datos y reflexiones para una política de estado. *Rev. Inst. Juan Cesar García*. 12-32.
- Abbas, A.K., Lichtman, A.H. y Pillai, S. 2015. *Inmunología Celular y Molecular*. Elsevier. 8: 3-17.
- Araujo, F. G. 1986. Analysis of *Trypanosoma cruzi* Antigens Bound by Specific Antibodies and by Antibodies to Related. Trypanosomatids. *Infection and Immunity*. 53 (1): 179-185.
- Aurazo, C., Roldán, J. y Jara, C. A. 2014. *Trypanosoma cruzi*: características del crecimiento y susceptibilidad a violeta de genciana “*in vitro*” de dos poblaciones nativas de Zaña, Lambayeque, Perú. *REBIOL*. 34(1): 69-75.
- Balouz, V., Agüero, F., y Buscaglia, C. A. 2017. Chagas disease diagnostic applications: present knowledge and future steps. *Advances in parasitology*. 97: 1-45.
- Becerril Flores, M. A. 2014. *Parasitología médica*. McGraw-Hill
- Botero, D. y M., Restrepo. 2003. Tripanosomiasis. En: Botero, D. y Restrepo, M. (Editores). *Parasitosis Humanas*. Medellín: Corporación para la investigación biológica. Medellín, Colombia. 239-260.
- Burguete Gutiérrez, J. C. 2014. Antígenos de *Trypanosoma cruzi*, reconocidos por los anticuerpos de ratas y humanos. Tesis de licenciatura, Instituto de Ciencias Biológicas. Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas.
- Camargo, E. P. 1964. Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*; I. Origin of metacyclic trypanosomes in liquid media. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 6(3): 93-100.

- Cardillo, F., de Pinho, R.T., Antas, P.R. y Mengel, J. 2015. Immunity and immune modulation in *Trypanosoma cruzi* infection. *Pathogens and disease*. 73(9): 1-4.
- Carlier, Y., Altcheh, J., Angheben, A., Freilij, H., Luquetti, A. O., Schijman, A.G., Segovia, M., Wagner, N. y Albajar Vinas, P. 2019. Congenital Chagas disease: Updated recommendations for prevention, diagnosis, treatment, and follow-up of newborns and siblings, girls, women of childbearing age, and pregnant women. *PLoS Negl Trop Dis*. 13(10).
- Carlier, Y. y Truyens C. 2015 Congenital Chagas disease as an ecological model of interactions between *Trypanosoma cruzi* parasites, pregnant women, placenta and fetuses. *Acta Trop*.151:103–115.
- Ceballos-Pomares, J.C., Cuéllar-Rufino, S., Vázquez-Ortega, M.F., López-Domínguez, J., Romero-Cruz, V. y Calderón-Garcidueñas, A.L. 2017. Inmunología de la enfermedad de Chagas congénita. *Perinatología y Reproducción Humana*, 31(3): 144- 150.
- Chaplin, D. D. 2010. Overview of the immune response. *J Allergy Clin Immunol*. 125(2):3-23.
- Chippaux, J. P., Santalla, J. A., Postigo, J. R., Romero, M., Salas Clavijo, N. A., Schneider, D., y Brutus, L. 2009. Sensitivity and specificity of Chagas Stat-Pak® test in Bolivia. *Tropical Medicine & International Health*. 14(7): 732-735.
- Contreras, V. T., Lima, A. R., y Navarro, M. C. 2006. *Trypanosoma cruzi* morphogenesis: relevant factors for in vitro differentiation. *Acta Biológica Venezuelica*. 26: 49-60.
- Costa, A., de Brito, R., Carvalho, L. M., Cardoso, J., Vieira, P., Reis, A. B., Aguiar-Soares, R., y Roatt, B. M. 2020. Liver infusion tryptose (LIT): the best choice for growth, viability, and infectivity of *Leishmania infantum* parasites. *Parasitology research*. 119(12): 4185–4195.

- Cruz-Saavedra L.B. 2021. Genómica y transcriptómica comparativa de *Trypanosoma Cruzi*. Tesis de doctorado. Universidad del Rosario Bogotá. D.C.
- Cura, C., y Schijman, A. G. 2013. Relación entre los genotipos de *T. cruzi* y la presentación clínica de la enfermedad de Chagas. *Revista Española de Salud Pública*. 9-16.
- De Castro, A. L., da Silveira, J. F, Mortara, R. A. 2021. Comparative Analysis of Virulence Mechanisms of Trypanosomatids Pathogenic to Humans. *Front Cell Infect Microbiol*.
- De Fuentes-Vicente, J. A., Vidal-López, D. G., Flores-Villegas, A. L., Moreno-Rodríguez, A., De Alba-Alvarado, M. C., Salazar-Schettino, P. M., y Gutiérrez-Cabrera, A. E. 2019. *Trypanosoma cruzi*: A review of biological and methodological factors in Mexican strains. *Acta trópica*. 195: 51-57.
- De Lima, A. R., Aparicio, A., Berrocal, A., Navarro, M. C., Graterol, D., y Contreras, V. 2007. Epimastigogénesis de *Trypanosoma cruzi* en medio axénico: cambios peptídicos, glicopeptídicos y enzimáticos. *Salud*. 11(2): 39-47.
- Díaz Gómez, J. M. 2014. Efectos de la infección por *Trypanosoma cruzi* en fetos de ratas. Tesis de doctorado. Instituto en Ciencias Biológicas. UNICACH.
- Duran-Rehbein, G. A., Vargas-Zambrano, J. C., Cuéllar, A., Puerta, C. J., y González, J. M. 2014. Mammalian cellular culture models of *Trypanosoma cruzi* infection: a review of the published literature. *Parasite*, 21.
- El-Sayed, N. M., Myler, P. J., Bartholomeu, D. C., Nilsson, D., Aggarwal, G., Tran, A. N. y Andersson, B. 2005. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science*. 309(5733): 409-415.
- Engel, J. C. y Dvorak, J. A. 1988. *Trypanosoma cruzi*: Cell Biological Behavior of Epimastigote and Amastigote Forms in Axenic Culture. *The Journal of Protozoology*. 35(4): 513–518.

- Espinoza, B., Rico, T., Sosa, S., Oaxaca, E., Vizcaino-Castillo, A., Caballero, M. L. y Satoskar, A. R. 2009. Mexican *Trypanosoma cruzi*, *T. cruzi* i strains with different degrees of virulence induce diverse humoral and cellular immune responses in a murine experimental infection model. *Journal of biomedicine and biotechnology*. 2010: 51.
- Flávia Nardy, A., Freire-de-Lima, C.G. y Morrot, A. 2015. Immune evasion strategies of *Trypanosoma cruzi*. *J. Inmunol*.
- Flores-Chávez, M., de Fuentes, I., Gárate, T. y Cañavate, C. 2007. Diagnóstico de laboratorio de la enfermedad de Chagas importada. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 25: 29-37.
- García, M., Fumadó, V. y González, M. I. 2013. Actualización en el diagnóstico y tratamiento de la malaria. *Anales de Pediatría*. 78:124.
- García-Escalante, Ma. G., Ehrenberg-Enríquez, J., Puerto, F. I. 1996. Estudio del perfil antigénico de *Trypanosoma cruzi* a través de la reactividad de sueros hiperinmunes obtenidos de Conejos. *Revista Biomédica*. 7: 133-145.
- González-Cappa, S. M., Mirkin, G. A., Solana, Ma. E. y Tekiel, V. S. 1999. Patología por *Trypanosoma cruzi* ¿Cepa dependiente? *Medicina*. 59: 69-74.
- Graterol, D., Ramírez, D., Ramos, A., Arteaga, R. Y., Mundaray, O., Pineda, W., Navarro, M. C., Domínguez, M. I., De Lima, A. R. y Contreras, V. T. 2013. Epimastigogénesis de *Trypanosoma cruzi* Dm28c en medio ML15-HA: Análisis proteico, glicoproteico y antigénico. *Salus*. 17(1): 14-23.
- Guhl, F. 1990. Purified *Trypanosoma cruzi* specific glycoprotein for discriminative serological diagnosis of South American tripanosomiasis (chagas´disease). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 85 (4):531-532.
- Guhl, F. 2009. Enfermedad de Chagas: Realidad y perspectivas. *Revista Biomedica*. 20(3): 228-234.

- Gurungm, P, y Kanneganti, T. D. 2016. Immune responses against protozoan parasites: a focus on the emerging role of Nod-like receptors. *Cell Mol Life Sci.* 73(16):3035-51.
- Guzmán-Gómez, D., López-Monteon, A., de la Soledad Lagunes-Castro, M., Álvarez-Martínez, C., Hernández-Lutzon, M. J., Dumonteil, E., y Ramos-Ligonio, A. 2015. Highly discordant serology against *Trypanosoma cruzi* in central Veracruz, México: role of the antigen used for diagnostic. *Parasites & vectors.* 8(1): 1-8.
- Hernández-Becerril, N., Nava, A., Reyes, P. A., Monteón, V. M. 2021. IgG subclass reactivity to *Trypanosoma cruzi* in chronic chagasic patients. *Arch Cardiol Mex.* 71(3):199-205.
- Herrera, L. 2010. Una revisión sobre reservorios de *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* (Chagas, 1909), agente etiológico de la Enfermedad de Chagas. *Boletín de Malariología y Salud Ambiental,* 50(1): 3-15.
- Hoffmann, A., Jakob, M., y Ochsenreiter, T. 2016. A novel component of the mitochondrial genome segregation machinery in trypanosomes. *Microbial Cell* 3(8): 352-354. Doi: 10.15698/mic2016.08.519.
- Kaufer, A., Ellis, J., Stark, D. y Barratt, J. 2017. The evolution of trypanosomatid taxonomy. *Parasites Vectors* 10:287. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2204-7>.
- Magalhães, L. M., Gollob, K. J., Zingales, B., y Dutra, W. O. 2022. Pathogen diversity, immunity, and the fate of infections: lessons learned from *Trypanosoma cruzi* human–host interactions. *The Lancet Microbe.*
- Martín-Escolano, J., Marín, C., Rosales, M. J., Tsaousis, A. D., Medina-Carmona, E., Martín-Escolano, R. 2022. An Updated View of the *Trypanosoma cruzi* Life Cycle: Intervention Points for an Effective Treatment. *ACS Infect Dis.* 8(6):1107-1115.

- Martínez-Cuevas, T. I. 2018. Caracterización biológica, genotipificación e identificación de antígenos de aislados de *Trypanosoma cruzi* obtenidos en el estado de Oaxaca. Tesis de doctorado.
- Martínez, R. A. 1996. Variabilidad intraespecífica en *Trypanosoma cruzi* y ensayo de nuevos métodos para el cribado farmacológico. Tesis de doctorado. Universidad Complutense. Madrid.
- Martínez-Díaz, R. A., Escario, J. A., Nogal-Ruiz, J. J. y Gómez-Barrio, A. 2001. Biological characterization of *Trypanosoma cruzi* strains. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 96(1): 53-59.
- Molina-Garza, G. J., Rosales-Encina, J. L., Galaviz-Silva, L., Molina-Garza, D. 2007. Prevalencia de *Trypanosoma cruzi* en triatominos silvestres de Nuevo León, México. *Salud Pública de México*. 49: 37-44.
- Monteón, V., Godínez, S., Cruz, Zetina, G., Balmes, J., López, R., y Hernández, Ó. 2009. Caracterización biológica de aislados mexicanos de *Trypanosoma cruzi*: metacicloogénesis, parasitemia y resistencia contra benznidazol. *Revista Biomédica*. 20(3): 206-214.
- Murcia, L., Carrilero, B., Saura, D., Iborra, M. A., y Segovia, M. 2013. Diagnóstico y tratamiento de la enfermedad de Chagas. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*. 31: 26-34.
- Nakamura, I. B., Miguel, D. C., Bruscatto, A., Pereira, M. B., Campiolo, D., de Almeida, E. A., de Figueiredo Peloso, E. y Gadelha, F. R. 2022. Biological characterization of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes derived from trypomastigotes isolated from Brazilian chagasic patients. *Current Research in Microbial Sciences*. 3:100-110.
- Nogueira, N., Unkeless, U., Cohn Z. 1982. Specific glycoprotein antigens on the surface of insect and mammalian stages of *Trypanosoma cruzi*. *Immunology*. 79: 1259-1263.

- Noireau, F. 1999. La enfermedad de Chagas y sus particularidades epidemiológicas en Bolivia. EG.
- Oliveira I, Torrico F, Muñoz J, Gascon J. 2010- Congenital transmission of Chagas disease: a clinical approach. *Expert Rev Anti Infect Ther.* (8):945-56.
- Organización Mundial de la Salud (OMS). 2021. La Enfermedad de Chagas: Datos y cifras. [https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis)) Consultado 14/10/2022.
- Padilla, J. C., Pardo, R. y Molina, J. A. 2017. Manejo integrado de los riesgos ambientales y el control de vectores: una nueva propuesta para la prevención sostenible y el control oportuno de las enfermedades transmitidas por vectores. *Biomédica.* 37 (2).
- Palma-González, C. A., Recinos-Vázquez, H. I., Burguete-Gutiérrez, J. C., de Fuentes-Vicente, J. A., Schlie-Guzmán, M. A., Vidal-López, D. G. y Gutiérrez-Jiménez, J. 2021. A *Trypanosoma cruzi* strain from southern México is more virulent for male mice in part by blocking the immune response. *The Journal of Infection in Developing Countries.* 15(11): 1714-1723.
- Peña-Callejas, G., James González, J., Jiménez-Cortés, G., De Fuentes-Vicente, J. A., Salazar-Schettino, P. M., Bucio-Torres, M. I., Cabrera-Bravo, M. y Flores-Villegas, A. L. 2022. Enfermedad de Chagas: biología y transmisión de *Trypanosoma cruzi*. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas* 25: 1-19.
- Pérez, C. de J., Orjuela, A., Vanegas, D. I., Montenegro, J. de J. 2007. Etiología, fisiopatología e inmunología de la enfermedad de Chagas. En: Rosas, F., Vanegas, D. I., Cabrales, M. F. Enfermedad de Chagas. *Sociedad Colombiana de Cardiología y Cirugía Cardiovascular.* 15-20.
- Perez-Fuentes, R., Sanchez-Guillen, M. González-Alvarez, C., Monteón, V. M., Reyes, P. A., y Rosales-Encina, J. L. 1998. Humoral nitric oxide levels and

antibody immune response of symptomatic and indeterminate Chagas' disease patients to commercial and autochthonous *Trypanosoma cruzi* antigen. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 58(6): 715-720.

Ramsey, J. M, Peterson, A. T, Carmona-Castro, O., Moo-Llanes, D. A., Nakazawa, Y., Butrick, M., Tun-Ku, E., la Cruz-Félix, K., Ibarra-Cerdeña, C. N. 2015. Atlas of Mexican Triatominae (Reduviidae: Hemiptera) and vector transmission of Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 110(3):339-52.

Rodriguez, A. M., Aragort De Rossell, R., De Jesus, R., Calcagno, M., Maizo De Segnini, Z., Segnini, S., y Diaz, S. 2000. Tripomastigotes de sangre y de cultivo celular de *Trypanosoma cruzi* Y.: I.- Diferencia en la infectividad para ratones Balb/c. *Parasitología al día*. 24(1-2): 12-21.

Rojo-Medina, J. Ruiz-Matus, C., Salazar-Schettino, P. M., y González-Roldán, J. F. 2018. Enfermedad de Chagas en México. *Gaceta Médica de México*. 154(5): 605-612.

Rubio-Ortiz, M., Hernández-López, L. A., Pérez-Galicia, A., Guzmán-Bracho, C., Martínez-Calvillo, S., y Manning-Cela, R. G. 2020. Diagnóstico de la infección con *Trypanosoma cruzi*: Avances y retos. *Revista Médica de la Universidad Veracruzana*. 20(1): 7-27.

Sacks, D. y Sher, A. 2002. Evasion of innate immunity by parasitic protozoa. *Nature Immunology*. 3(11): 1041–1047.

Salazar-Schettino, P., y Marín, R. 2006. Manual para el diagnóstico de la infección de *Trypanosoma cruzi*. *Secretaría de Salud*. México, D.F. México.

Salazar-Schettino, P. M., Rojas-Wastavino, G. E., Cabrera-Bravo, M., Bucio-Torres, M. I., Martínez-Ibarra, J. A., Monroy-Escobar, M. C. y Torres-Gutiérrez, E. (2010). A revision of thirteen species of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) vectors of Chagas disease in Mexico. *Journal of the Selva Andina Research Society*, 1(1): 57-80.

- Saldaña, C., Córdova, O., y Vargas, F. 2006. Utilización de *Lepidium Peruvianum* Maca, como medio de cultivo para el crecimiento de *Trypanosoma Cruzi*. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 23(2): 137-140.
- Saldaña, I., González, P. C., y Hernández, V. 2009. Enfermedad de Chagas: abordaje de una afección emergente en nuestro país. *FMC: Formación Médica Continuada en Atención Primaria*, 16(2): 68.
- Sánchez, B., Monteón, V., Reyes, P. A., y Espinoza, B. 2001. Standardization of micro-enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and Western blot for detection of *Trypanosoma cruzi* antibodies using extracts from Mexican strains as antigens. *Archives of medical research*. 32(5): 382-388.
- Schmuñis G. 1999. Riesgo de la enfermedad de Chagas a través de las transfusiones en las Américas. *Medicina*. 59: 125-34.
- Schwartz, B. S., Paster, M., Ison, M. G., y Chin-Hong, P. V. 2011. Organ Donor Screening Practices for *Trypanosoma cruzi* Infection among US Organ Procurement Organizations. *American Journal of Transplantation*. 11(4): 848-851.
- Secretaría de Salud (SSA). 2019. Manual de Procedimientos para la Enfermedad de Chagas en México. https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/447946/Manual_de_Procedimientos_para_la_Enfermedad_de_Chagas_en_Mexico.pdf. Consultado 22 de mayo de 2022.
- Siqueira, Meneses, Storino. 1994. Diagnóstico de laboratorio de la Enfermedad de Chagas. *Revista Médica de Costa Rica y Centroamérica XLI*. 527: 69-75.
- Snary, D. 1985. The cell surface of *Trypanosoma cruzi*. *The Biology of Trypanosomes*. 75-92.
- SSA/ Dirección General de Epidemiología. (2020). *Boletín Epidemiológico. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica*.

<https://www.gob.mx/salud/acciones-y-programas/direccion-general-de-epidemiologia-boletin-epidemiologico>. Consultado el 02/10/2022

- Teixeira, D. E., Benchimol, M., Crepaldi, P. H., y de Souza, W. 2012. Interactive multimedia to teach the life cycle of *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas disease. *PLoS Negl Trop Dis* 6(8).
- Tibayrenc, M. 2003. Genetic subdivisions within *Trypanosoma cruzi* (Discrete Typing Units) and their relevance for molecular epidemiology and experimental evolution. *Kinetoplastid biology and disease*. 2(1): 1-6.
- Torres, R. A., Caldera, Y. y Rubio, D. 1988. Dinámica de crecimiento de cuatro cepas de *Trypanosoma cruzi* en tres medios de cultivo. *Kasmera*, 16.
- Truyens, C., Dumonteil, E., Alger, J., Cafferata, M. L., Ciganda, A., Gibbons, L., Herrera, C., Sosa-Estani, S., Buekens, P. 2021. Geographic variations in test reactivity for the serological diagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection. *J Clin Microbiol*. 59. 62-21.
- Vacca-Carvajal, M. A. y Mercado-Reyes, M. M. 2005. Determinación de las características operativas de las pruebas serológicas con cepas colombianas de *Trypanosoma cruzi* utilizadas para el diagnóstico de enfermedad de Chagas. Tesis de Maestría en Epidemiología Clínica. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia. 164.
- Valente, S., Valente, V. y Fraiha Neto, H. 1999. Considerations on the epidemiology and transmission of Chagas disease in the Brazilian Amazon. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 94: 395-398.
- Vega, S., Náquira, C., y Cáceres, A. 2005. Seroprevalencia de la Tripanosomiasis Americana en los Departamentos de Amazonas y Cajamarca-Perú. *Parasitol Latinoamer*. 60: 220.
- Voller, A., Bartlett A., y Bidwell D. E. 1978. Enzyme immunoassays with special reference to ELISA techniques. *Journal of Clinical Pathology*. 31: 507-520.

- Werner, A., Zulantay, I., Solari, A., Ortiz, S., Oddo, D., Corral, G. Y Carlier, Y. 2010. Vertical transmission of *Trypanosoma cruzi* in the province of Choapa, IV Region, Chile: preliminary report (2005-2008). *Biological research*, 43(3): 269-274.
- Yoshida, N. 2005. Molecular basis of mammalian cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. 78 (1): 87-11.
- Zaidenberg, A., Tournier, H. A., Schinella, G. R., y Buschiazco, H. O. 2000. *Trypanosoma cruzi*: Obtención de amastigotes extracelulares y estudio de su crecimiento en diferentes condiciones de cultivo. *Revista latinoamericana de microbiología*, 42(1): 21-26.
- Zingales, B. 2018. *Trypanosoma cruzi* genetic diversity: Something new for something known about Chagas disease manifestations, serodiagnosis and drug sensitivity. *Acta tropica*, 184: 38-52.
- Zambrano-Villa, S., Rosales-Borjas, D., Carrero, J. C. y Ortiz-Ortiz, L. 2002. How protozoan parasites evade the immune response. *Trends in Parasitology*, 18(6): 272–278.
- Zuñiga, C., Vargas, R., Courcelles, M. T., y Vergara, U. 1997. Infeccion Experimental Con *Trypanosoma Cruzi* en machos y hembras de tres Cepas de ratones. *Parasitología al día*, 21(3-4): 85-91. <https://dx.doi.org/10.4067/S0716-07201997000300004>.

XI. ANEXOS

Anexo 1

Preparación del medio de cultivo LIT para el cultivo de *Trypanosoma cruzi*

Reactivos:

0.5 g	Caldo de infusión de hígado
0.5 g	Triptosa
0.4 g	NaCl
0.8 g	Na ₂ HPO ₄
0.04 g	KCl
0.2 g	Glucosa 0-(+)-0

Procedimiento:

Se colocan todos los reactivos en un vaso de precipitado, con 70 mL de agua destilada, con agitación constante sin calor hasta su completa disolución. Ajustar el pH a 7.3 y aforar a 100 mL.

- Esterilizar en autoclave, y dejar una alícuota en prueba de esterilidad al menos dos días.
- Conservar a 4°C hasta su uso.

Medio LIT con 10% de Suero Fetal Bovino (medio completo) para el cultivo de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*.

Reactivos:

27 mL	Medio LIT
3 mL por 15 min.)	Suero Fetal Bovino (des-complementado a 56° C
7.5 µl	Hemina
12.5 µl	Estreptomicina

12.5 µl

Penicilina

Procedimiento:

- Bajo condiciones de esterilidad, agregar al medio LIT estéril el siguiente orden: el suero fetal bovino descomplementado, la hemina y los antibióticos.
- Esterilizar por filtración con una membrana de 0.22µl de poro y dejar nuevamente en prueba de esterilidad.
- Guardar a 4°C.

Anexo 2 Preparación de soluciones para la prueba de ELISA

Solución de recubrimiento con el antígeno (Solución amortiguadora de carbonatos pH 9.6)

1.59 g Na_2CO_3

2.93 g NaHCO_3

Ajustar el pH con 1M de NaOH y aforar en un litro de agua destilada.

Solución de lavado (solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4) conteniendo 0.05% Tween 20 (PBS/T)

8.5 g NaCl

1.096 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$,

0.315 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$

Aforar a un litro de agua destilada. Ajustar a pH 7.4. A esta solución agregar

0.5 mL Tween 20

Solución bloqueadora (PBS/T con leche descremada 1%)

1 g Leche en polvo descremada

100 mL PBS/T

Solución de revelado (Solución amortiguadora de citrato-fosfato pH5.0)

24.3 mL 0.1 M de ácido cítrico

25.7 mL 0.2 M de Na₂HPO₄

40 mL Agua destilada.

Ajustar el pH a 5.0

Anexo 3

Reactivos y preparación de geles de poliacrilamida para electroforesis de proteínas (SDS PAGE).

Preparación de soluciones:

Acrilamida/Bisacrilamida (30% t, 2.67% c):

30.00 g Acrilamida

0.80 g N'N'-bis-methylene-acrylamide

Disolver en 100 mL con agua destilada

Solución Tris 0.5M pH 6.8:

6.05 g Trizma base

0.40 g SDS

Disolver en 100 mL con agua destilada y ajustar a pH 6.8

Solución Tris 1.5M pH 8.8:

18.20 g Trizma base

0.40 g SDS

Disolver en 100 mL con agua destilada y ajustar a 8.8 pH

Solución de corrimiento (para los electrodos)

3.03 g Tris base

14.4 g Glicina

1 g SDS

Disolver en 1000 mL con agua destilada

Amortiguador de muestra (2x)

1.00 g	SDS
2.00 mL	Glicerol
2.00 mL	Azul de bromofenol (0.1% en agua destilada)
1.25 mL	Tris 6.8
2.00 mL	2-mercaptoetanol

Ajustar a 10 mL en agua destilada

Solución de carga de la muestra

3.55 mL	Agua desionizada o destilada
5 mL	Tris-HCl 1.5 M pH 6.8
2.5 mL	Glicerol
2 mL	SDS 20%
50 µL	Marcaptoetanol
20-200 µg	Azul bromofenol

Preparación de los geles de acrilamida (SDS- PAGE)

- Ensamblar en el soporte las dos placas de vidrio de acuerdo a las instrucciones del Mini-PROTEAN II (BioRad)
- Para obtener el gel separador de 10% de acrilamida, en un tubo falcón limpio se mezcló 1.25 mL de tris-HCl pH 8.8, 1.65 mL de acrilamida/Bis-acrilamida (30 % T, 2.67 % T), 0.5 mL de SDS 10% y 2.1 mL de agua destilada.
- Inmediatamente antes vaciar la mezcla entre las dos placas de vidrio, se agrega los agentes polimerizantes, 50 µl de persulfato de amonio 10 % y

2.5 μ l de TEMED, mezclando rápidamente. El gel separador debe tener una altura que permita posteriormente agregar el gel concentrador.

- Se sobrepuso con cuidado una capa de isopropanol a fin de evitar en los extremos del gel una la curvatura por la tensión superficial.
- Una vez polimerizado el gel, se retiró el alcohol y se lavó la superficie con agua destilada. Se secó con papel filtro sin tocar el gel.
- Para preparar el gel concentrador de 5% de acrilamida, en un tubo falcón limpio se mezcló 0.375 mL de tris- HCl pH 6.8, más 0.25 mL de acrilamida/Bis-acrilamida (30 % T, 2.67 % T), 0.04 mL SDS 10% y 0.875 mL de agua destilada.
- Se añadió 20 μ l de persulfato de amonio 10%, más 1 μ l de TEMED.
- Se mezcló rápidamente y se le agregó al molde hasta el tope, colocando con rapidez el molde formador de pozas (peine).
- Se esperó hasta que el gel polimerizó y se retiró el peine con cuidado.
- Las placas con el gel se trasladaron a la cámara de electroforesis MINI Protean y se agregó el buffer de corrimiento (0.025 Tris-HCl, 0.192 M Glycin, 0.1% SDS, pH 8.3) en los compartimentos del ánodo y cátodo de acuerdo con las instrucciones del fabricante.