

UNIVERSIDAD NACIONAL DE PIURA

Facultad de Ciencias

Escuela Profesional de Ciencias Biológicas



TESIS

Comparación de los niveles séricos y de expresión génica de citocinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias en ratones infectados experimentalmente con dos cepas de *Trypanosoma cruzi*

Presentado por:

Br. ANGELA GIOVANA VIDAL RIVA

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

BIÓLOGO

Línea de Investigación:

SALUD PÚBLICA

Sub línea de Investigación:

INTERVENCIONES INTEGRALES EN ENFERMEDADES TRANSMISIBLES Y NO TRANSMISIBLES EN SALUD COMUNITARIA

Piura - Perú

2022

UNIVERSIDAD NACIONAL DE PIURA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA PROFESIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

TESIS

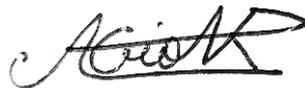
**Comparación de los niveles séricos y de expresión génica de citocinas
pro-inflamatorias y anti-inflamatorias en ratones infectados
experimentalmente con dos cepas de *Trypanosoma cruzi***

Línea de Investigación:

SALUD PÚBLICA

Sub línea de Investigación:

INTERVENCIONES INTEGRALES EN ENFERMEDADES
TRANSMISIBLES Y NO TRANSMISIBLES EN SALUD
COMUNITARIA



Br. Angela Giovana Vidal Riva



Blgo. Mcblgo. Jaime Fernández Ponce,
Mg. Sc.
ASESOR INTERNO



Blgo. Edward Valencia Ayala, PhD.
ASESOR EXTERNO

DECLARACIÓN JURADA DE ORIGINALIDAD DE LA TESIS

Yo: **ANGELA GIOVANA VIDAL RIVA**, identificado con DNI N° **76182633**, Bachiller de la Escuela Profesional de **CIENCIAS BIOLÓGICAS**, de la Facultad de **CIENCIAS** y domiciliado en **Calle Espinar N° 564** del Distrito **SULLANA**, Provincia **SULLANA**, Departamento **PIURA**. Celular: **937774744**. Email: **vidalrivaangela@gmail.com**.

DECLARO BAJO JURAMENTO: que la tesis que presento es original e inédita, no siendo copia parcial ni total de una tesis desarrollada, y/o realizada en el Perú o en el Extranjero, en caso contrario de resultar falsa la información que proporciono, me sujeto a los alcances de lo establecido en el Art. N° 411, del código Penal concordante con el Art. 32° de la Ley N° 27444, y Ley del Procedimiento Administrativo General y las Normas Legales de Protección a los Derechos de Autor.

En fe de lo cual firmo la presente.

Piura, 7 de marzo del 2022



ANGELA GIOVANA VIDAL RIVA

DNI N° 76182633

Art. 411.- El que, en un proceso administrativo, hace una falsa declaración en relación con hechos o circunstancias que le corresponde probar, violando la presunción de veracidad establecida por ley, será reprimido con pena privativa de libertad no menor de uno ni mayor de cuatro años.

Art. 4 Inciso 4.12 del Reglamento del Registro Nacional de Trabajos de Investigación para optar grados académicos y títulos profesionales – RENATI Resolución de Consejo Directivo N°033-2016- SUNEDU/CD.

UNIVERSIDAD NACIONAL DE PIURA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA PROFESIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

TESIS

**Comparación de los niveles séricos y de expresión génica de citocinas
pro-inflamatorias y anti-inflamatorias en ratones infectados
experimentalmente con dos cepas de *Trypanosoma cruzi***

Línea de Investigación:

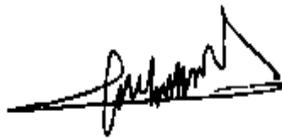
SALUD PÚBLICA

Sub línea de Investigación:

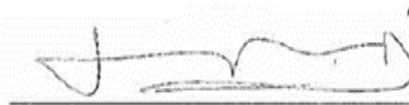
INTERVENCIONES INTEGRALES EN ENFERMEDADES
TRANSMISIBLES Y NO TRANSMISIBLES EN SALUD
COMUNITARIA



Blgo. Mcblgo. María Dorothy Torres de León, Mg. Sc.
PRESIDENTE DEL JURADO



Blgo. Mcblgo. Carlos Enrique Holguin Mauricci, Mg. Sc.
SECRETARIO DEL JURADO



Ing. Mg. Sc Luciano Rondoy Infante
VOCAL DEL JURADO



UNIVERSIDAD NACIONAL DE PIURA FACULTAD DE CIENCIAS



ACTA DE SUSTENTACIÓN 034 - 2022-UI-FC-UNP

Los Miembros del Jurado Calificador que suscriben, reunidos para evaluar la Tesis denominada "COMPARACIÓN DE LOS NIVELES SÉRICOS Y DE EXPRESIÓN GÉNICA DE CITOCINAS PRO-INFLAMATORIAS Y ANTI-INFLAMATORIAS EN RATONES INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE CON DOS CEPAS DE *TRYPANOSOMA CRUZI*", presentada por la señorita Bachiller ANGELA GIOVANA VIDAL RIVA, con el asesoramiento del Mclbgo. Jaime Napoleón Fernández Ponce, M.Sc. y co-asesor Bigo. Edward Valencia Ayala, PhD; oídas las observaciones y respuestas a las preguntas formuladas, y de conformidad al Reglamento de Tesis para obtener el Título Profesional en la Facultad de Ciencias, la declaran:

APROBADA (X)

DESAPROBADA ()

Con la mención de:

.....**SOBRESALIENTE**.....

(x) En consecuencia, queda en condición de ser ratificado por el Consejo de Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Piura, y recibir el **TÍTULO PROFESIONAL DE BIÓLOGO**.

() En consecuencia, queda en condición de ser ratificado por el Consejo Universitario de la Universidad Nacional de Piura, y recibir el **TÍTULO PROFESIONAL DE BIÓLOGO**; después que la sustentante incorpore la sugerencia del Jurado Calificador.

Piura, 11 de agosto del 2022.

Mclbgo. **MARÍA DOROTHY TORRES DE LEÓN, M.Sc.**
PRESIDENTE DE JURADO DE TESIS

Mclbgo. **CARLOS ENRIQUE HOLGUIN MAURICCI, M.Sc.**
SECRETARIO DE JURADO DE TESIS

Ing. **LUCIANO RONDOY INFANTE, M.Sc.**
VOCAL DE JURADO DE TESIS



Campus Universitario - Urb. Miraflores S/N. Castilla
PIURA - PERU

DEDICATORIA

A mis padres Iris y Wilfredo, por impulsarme a seguir cumpliendo mis metas personales y profesionales.

A mis hermanos Franchesca y Renato, para quienes trato de ser una buena hermana mayor.

AGRADECIMIENTOS

La presente investigación fue realizada gracias al apoyo incondicional del Blgo. PhD. Edward Valencia Ayala, quien me asesoró desde el primer momento en que me uní al equipo de trabajo del proyecto convenio N°119-2015-FONDECYT del cual también formó parte y fue pieza fundamental en su realización.

A la Blga. PhD. Manuela Verastegui Pimentel, coordinadora del Laboratorio de Investigación en Enfermedades Infecciosas (LIEI) en la Universidad Peruana Cayetano Heredia, por brindarme la maravillosa oportunidad de realizar una pasantía en el área de Inmunología, donde conocí muchas personas admirables por quienes pude adquirir nuevos conocimientos y así direccionar mi carrera profesional hacia el estudio de enfermedades infecciosas.

A la Blga. PhD. Maritza Calderón Sánchez, coordinadora del área de Biología Molecular del LIEI-UPCH, por su predisposición hacia la continuación de mi proceso de aprendizaje en su equipo de trabajo y en el proyecto convenio N°119-2015-FONDECYT.

A mis compañeros de laboratorio en las áreas de Inmunología y Biología Molecular del LIEI-UPCH, con quienes compartí amenas horas de trabajo y momentos de diversión, especialmente a la Blga. Mg. Sc. Jessy Córdori Añazco y la Blga. Edith Málaga Machaca, de quienes aprendí mucho sobre la enfermedad de Chagas.

Al Blgo. Mclgo. Mg. Sc Jaime Fernández Ponce, por su asesoramiento en la redacción del presente informe de tesis y sus enseñanzas durante mis estudios en la Universidad Nacional de Piura.

A mis estimados amigos con quienes compartí increíbles e inolvidables experiencias dentro de la Universidad Nacional de Piura y fuera de esta: Rayza Suárez Jimenez, Dania Nonajulca Córdova, Tania Villegas Gómez, Judith Matorel Ruiz, Tatiana Palacios Chira, Fiorella Miranda Reyes, Karen León Atoche, Diana Seminario Farfán y Anthony Torres Ruesta, gracias por sus consejos y continuos ánimos.

A mis queridos padres Iris Riva Ortiz y Wilfredo Vidal Inga, así como también a mis hermanos Franchesca Vidal Riva y Renato Vidal Riva, por ser la principal motivación en el cumplimiento de mis metas.

A mi querida familia López Trigoso, por acogerme en su hermoso hogar y brindarme su apoyo cuando llegué a la ciudad de Lima en busca de nuevas oportunidades de superación profesional.

Y principalmente, al Ser Divino, que inexplicablemente sé que vela por mí en todo momento.

ÍNDICE GENERAL

INTRODUCCIÓN	14
CAPÍTULO I: ASPECTOS DE LA PROBLEMÁTICA	16
1.1. DESCRIPCIÓN DE LA REALIDAD PROBLEMÁTICA.....	16
1.2. JUSTIFICACIÓN E IMPORTANCIA DE LA INVESTIGACIÓN.....	17
1.3. OBJETIVOS	17
1.3.1. Objetivo general.....	17
1.3.2. Objetivos específicos.	17
1.4. DELIMITACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN	18
CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO.....	19
2.1. ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN	19
2.2. BASES TEÓRICAS	20
2.2.1. Agente etiológico: <i>Trypanosoma cruzi</i>	20
2.2.2. Ciclo de vida y vías de transmisión de <i>Trypanosoma cruzi</i>	20
2.2.3. Variabilidad genética de <i>Trypanosoma cruzi</i>	21
2.2.4. Epidemiología de la Enfermedad de Chagas.	23
2.2.5. Etapas de la infección y manifestaciones clínicas de la Enfermedad de Chagas.	25
2.2.6. Diagnóstico y tratamiento de la Enfermedad de Chagas.	25
2.2.7. Respuesta inmune en la Enfermedad de Chagas: Papel de las citocinas.	26
2.2.8. Modelo animal para la Enfermedad de Chagas.	27
2.2.9. Técnicas de PCR y ELISA para el análisis de la infección por <i>T. cruzi</i>	28
2.2.9.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).	28
2.2.9.2. Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA).	30
2.3. GLOSARIO.....	30
2.4. HIPÓTESIS.....	32
2.4.1. Hipótesis general	32
2.4.2. Hipótesis específica.....	32
CAPÍTULO III: MARCO METODOLÓGICO.....	33
3.1. ENFOQUE Y DISEÑO.....	33
3.2. SUJETOS DE LA INVESTIGACIÓN.....	33
3.3. MÉTODOS Y PROCEDIMIENTOS	33
3.3.1. Distribución de ratones	33
3.3.2. Cultivo <i>in vitro</i> de parásitos e infección experimental con <i>T. cruzi</i>	34
3.3.3. Determinación de parasitemia y carga parasitaria en tejido cardíaco de ratones infectados por <i>T. cruzi</i> mediante qPCR en Tiempo Real.	35
3.3.3.1. Extracción de ADN.	35

3.3.3.2. Elaboración de las curvas estándares para la cepa Arequipa y CL Brener de <i>T. cruzi</i> en coágulo y tejido cardíaco.....	36
3.3.3.3. Cuantificación absoluta de <i>T. cruzi</i> cepa Arequipa y CL Brener mediante qPCR en tiempo real.	37
3.3.4. Dosaje de citocinas en suero de ratones infectados con la cepa Arequipa y CL Brener mediante ELISA sándwich.....	37
3.3.5. Cuantificación relativa de la expresión génica de citocinas en tejido cardíaco por RT-qPCR en tiempo real.	38
3.4. TÉCNICAS E INSTRUMENTOS	39
3.5. ASPECTOS ÉTICOS.....	40
CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DICUSIÓN.....	41
4.1. RESULTADOS	41
4.1.1. Parasitemia en ratones C57BL/6 infectados con las cepas Arequipa y CL Brener de <i>T. cruzi</i>	41
4.1.2. Carga parasitaria en tejido cardíaco de ratones C57BL/6 infectados con las cepas Arequipa y CL Brener de <i>T. cruzi</i>	42
4.1.3. Niveles séricos de citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias en ratones C57BL/6 infectados con <i>T. cruzi</i>	43
4.1.4. Niveles de expresión génica de citocinas proinflamatoria y antiinflamatorias en tejido cardíaco de ratones C57BL/6 infectados con <i>T. cruzi</i>	45
4.2. DISCUSIÓN	47
CONCLUSIONES	52
RECOMENDACIONES	53
REFERENCIAS	54
ANEXOS.....	61

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Número de ratones sacrificados según el día posinfección.....	33
Tabla 2. Secuencias nucleotídicas de los cebadores utilizados en la qPCR tiempo real y tamaño de los fragmentos amplificados.....	39

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida de <i>Trypanosoma cruzi</i>	21
Figura 2. Origen evolutivo de las DTU's.	22
Figura 3. Distribución geográfica de las 6 DTU's y su correspondencia con ciclos de transmisión asociados al ambiente silvestre o domiciliario.....	23
Figura 4. Casos anuales de la Enfermedad de Chagas en Perú desde el 2000 al 2021.....	24
Figura 5. Casos de la Enfermedad de Chagas por departamento en Perú el 2016 al 2021.....	24
Figura 6. Perfil de citocinas producidas según el tipo de células.	27
Figura 7. Pasos de un ciclo de la PCR.	29
Figura 8. Esquema del mecanismo de amplificación de PCR en tiempo real utilizando sondas TaqMan.....	29
Figura 9. Diagrama de formatos ELISA.	30
Figura 10. Parasitemia de <i>T. cruzi</i> en coágulo de ratones C57BL/6 infectados con las cepas Arequipa y CL Brener.	41
Figura 11. Carga parasitaria de <i>T. cruzi</i> en tejido cardíaco de ratones C57BL/6 infectados con la cepa Arequipa y CL Brener.	42
Figura 12. Niveles séricos de citocinas en ratones C57BL/6 infectados con la cepa Arequipa y CL Brener.....	44
Figura 13. Expresión génica de citocinas en tejido cardíaco de ratones C57BL/6 infectados con la cepa Arequipa y CL Brener.....	46

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Protocolos para la preparación de los medios de cultivo utilizadas en cultivo celular.....	61
Anexo 2. Pasos de extracción de ARN según el método TRIzol®.....	61
Anexo 3. Curvas estándares en la PCR tiempo real para cuantificación de <i>T. cruzi</i> en coágulo.....	62
Anexo 4. Curvas estándares en la PCR tiempo real para para cuantificación de <i>T. cruzi</i> en tejido cardíaco.....	63
Anexo 5. Curvas estándares de citocinas en ELISA sándwich.....	64
Anexo 6. Imágenes del trabajo en cultivo celular.....	65
Anexo 7. Fórmula de conversión de fuerza g a rpm y viceversa.....	66
Anexo 8. Fórmula para el recuento de epimastigotes <i>T. cruzi</i> en Cámara de Neubauer.....	66
Anexo 9. Recuento de epimastigotes de <i>T. cruzi</i> en Cámara de Neubauer.....	67
Anexo 10. Inoculación de tripomastigotes de <i>T. cruzi</i> vía intraperitoneal de ratones C57BL/6.....	67
Anexo 11. Secuencia del análisis estadístico seguido en el programa GraphPad Prism Instat3.....	67
Anexo 12: Resumen del análisis estadístico obtenido en el programa GraphPad Prism Instat3...	69
Anexo 13: Definición y operacionalización de variables.....	70

RESUMEN

Trypanosoma cruzi, el agente etiológico de la enfermedad de Chagas, presenta gran variabilidad genética ocasionando diferencias en la respuesta inmune y en el desarrollo de esta afección, que afecta aproximadamente a diez millones de personas a nivel mundial, principalmente en veintiún países endémicos de América Latina incluido Perú. La presente investigación en el modelo experimental de ratón C57BL/6 para la enfermedad de Chagas tuvo como objetivo determinar la parasitemia y carga parasitaria en tejido cardíaco, así como también los niveles séricos y la expresión génica en tejido cardíaco de citocinas proinflamatorias (INF- γ , IL-12 y TNF- α) y antiinflamatorias (IL-10 e IL-4), comparando la infección por la cepa Arequipa (Tc I), originaria de Perú, y la cepa CL Brener (Tc VI), originaria de Brasil. Los resultados de parasitemia mostraron niveles significativamente menores para la cepa Arequipa solo a los 5 días posinfección y la carga parasitaria en tejido cardíaco tuvieron niveles significativamente menores para la cepa Arequipa durante todos los días evaluados. Los resultados de citocinas fueron muy variables y no se detectaron diferencias significativas en los niveles séricos; sin embargo, resalta la sobre expresión génica en tejido cardíaco donde INF- γ fue significativamente menor a los 15, 30 y 60 días posinfección, IL-12 a los 30 días y TNF- α e IL-10 a los 30 y 60 días posinfección en los ratones C57BL/6 infectados con *T. cruzi* cepa Arequipa en comparación con los infectados por la cepa CL Brener. En conjunto, todo esto parece indicar que la presencia de *T. cruzi* cepa peruana genera variables reacciones inflamatorias en el hospedero, con menor intensidad solo en ciertos días posinfección que la cepa CL Brener.

Palabras clave: *Trypanosoma cruzi*, enfermedad de Chagas, citocinas, PCR, ELISA

ABSTRACT

Trypanosoma cruzi, the etiological agent of Chagas disease, has large genetic variability that causes differences in the immune response and in the development of this condition, which affects approximately ten million people worldwide, mainly in twenty one endemic countries of Latin America included Peru. This investigation in the experimental mouse model C57BL/6 for Chagas disease aimed to determine the parasitaemia and parasitic load in cardiac tissue, as well as serum levels and gene expression in cardiac tissue of proinflammatory (INF- γ , IL -12 and TNF- α) and antiinflammatory (IL-10 and IL-4) cytokines, comparing the infection by Arequipa strain (TcI), native to Peru, and the CL Brener strain (TcVI), native to Brazil. The parasitaemia results showed significantly lower levels for the Arequipa strain only 5 days after infection and the parasite load in cardiac tissue had significantly lower levels for the Arequipa strain during all the days evaluated. Cytokine results were highly variable and no significant differences in serum levels were detected; however, the gene overexpression in cardiac tissue is notable, where INF- γ was significantly lower at 15, 30 and 60 days post-infection, IL-12 at 30 days and TNF- α and IL-10 at 30 and 60 days post-infection in C57BL/6 mice infected with *T. cruzi* Arequipa strain compared to those infected with the CL Brener strain. Taken together, all this seems to indicate that the presence of the Peruvian *T. cruzi* strain generates variable inflammatory reactions in the host, with less intensity only on certain days post-infection than the CL Brener strain.

Key word: *Trypanosoma cruzi*, Chagas disease, cytokine, PCR, ELISA

INTRODUCCIÓN

Se estima que diez millones de personas en el mundo están infectadas con *Trypanosoma cruzi* (Andrade et al., 2018), el protozoo causante de la enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis Americana (Organización Mundial de la Salud [OMS], 2021).

Esta enfermedad potencialmente mortal es endémica en veintiún países del continente americano, incluyendo Perú, donde las poblaciones más afectadas se encuentran en zonas rurales o periurbanas (De Lana y Marques, 2010), principalmente en la región Arequipa (Ministerio de Salud [MINSA], 2021) por lo que la OMS (2021) ha catalogado a la enfermedad de Chagas en la lista de “enfermedades tropicales desatendidas”.

T. cruzi es genéticamente complejo y por eso varían sus características patogénicas (Burgos et al., 2007). En este sentido, se conoce que 20% a 35% de los individuos infectados desarrollan lesiones irreversibles (OMS, 2021) en el corazón, esófago, colon o el sistema nervioso periférico durante la fase crónica de la enfermedad de los cuales, el daño cardíaco representa la mayor causa de mortalidad (Miles et al., 2009; Moncayo, 2010).

Estas manifestaciones clínicas dependen de la inflamación provocada por el parásito y también por la respuesta inmune (Valencia, 2017). Aunque no se comprende completamente los mecanismos precisos por los cuales ocurre el desarrollo de la patología en la fase crónica, el uso de modelos experimentales parece indicar que las citocinas cumplen un rol crucial en el control de la parasitemia y la intensidad de las reacciones inflamatorias (Ayo et al., 2015; Talvani et al., 2000).

De la gran variedad de citocinas existentes, el interferón gama (IFN- γ), factor de necrosis tumoral (TNF- α) e interleucina 12 (IL-12) son generalmente detectadas durante la infección por *T. cruzi* (Talvani et al., 2000). Estas citocinas proinflamatorias generan una fuerte activación del componente celular en el sistema inmunológico con el fin de controlar la replicación del parásito y la supervivencia del hospedero, pero están relacionadas con el daño tisular y la destrucción neuronal en el corazón al presentarse predominantemente en pacientes con cardiomiopatía chagásica (Ayo et al., 2015; Planelles et al., 2003; Talvani et al., 2000).

Por otra parte, las citocinas antiinflamatorias como interleucina 4 (IL-4), interleucina 10 (IL-10) y el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) tienen como función suprimir la síntesis de las citocinas proinflamatorias limitando los efectos potencialmente perjudiciales de las reacciones inflamatorias sostenidas o excesivas (Talvani et al., 2000), pero en condiciones patológicas pueden inhibir la respuesta inmune haciendo que el huésped esté en riesgo de infección sistémica.

En conjunto, un equilibrio dinámico y cambiante entre las citocinas proinflamatorias y los componentes antiinflamatorios del sistema inmunitario humano parece ser esencial para el mantenimiento de un estado "saludable" entre el parásito y el huésped (Gulati et al., 2016; Opal y DePalo, 2000).

Debido a que la variabilidad genética de *T. cruzi* dificulta la generación de posibles métodos para contrarrestar los efectos de la enfermedad de Chagas y con el fin de aportar información para enriquecer el conocimiento de los procesos inmunológicos desarrollados durante esta afección, en la presente investigación se comparó los niveles de citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias en ratones C57BL/6 infectados experimentalmente con la cepa Arequipa (Tc I) y la cepa CL Brener (Tc VI).

Los resultados obtenidos mostraron variables niveles séricos y de sobreexpresión génica en tejido cardíaco de IFN- γ , TNF- α , IL-12, IL-4, IL-10 para ambos grupos evaluados; además se encontró una menor parasitemia y carga parasitaria en tejido cardíaco para la cepa Arequipa. En conjunto, los hallazgos de la presente investigación indican la menor capacidad patogénica de *T. cruzi* cepa Arequipa en comparación con la cepa CL Brener.

El presente informe está compuesto del capítulo uno que trata sobre los aspectos de la problemática como la descripción de la realidad problemática, justificación e importancia de la investigación, objetivos y la delimitación de la investigación; procede con el capítulo dos donde se describe el marco teórico cuyo contenido son los antecedentes de la investigación, bases teóricas, glosario, marco referencial e hipótesis; continua con el capítulo tres que está compuesto por el marco metodológico donde se incluye el enfoque y diseño, sujetos de la investigación, métodos y procedimientos, técnicas e instrumentos, así como también los aspectos éticos; seguido del capítulo cuatro donde se describe los resultados y la discusión; así mismo contiene las conclusiones, recomendaciones, referencias bibliográficas y finaliza con los anexos.

CAPÍTULO I: ASPECTOS DE LA PROBLEMÁTICA

1.1. DESCRIPCIÓN DE LA REALIDAD PROBLEMÁTICA

La enfermedad de Chagas se encuentra principalmente en zonas rurales de la parte continental de América Latina, pero con la migración de las poblaciones la infección se ha extendido a zonas urbanas y países no endémicos como Estados Unidos de América, Canadá y muchos países europeos (Moncayo y Silveira, 2010; OMS, 2021).

Perú es uno de los países endémicos que a lo largo del tiempo ha reportado casos de la enfermedad de Chagas donde más del 80% proviene de la vertiente suroccidental, principalmente de la región Arequipa (De Lana y Marques, 2010; Valencia, 2017).

En Perú, el 95% de los casos agudos de la enfermedad de Chagas son asintomáticos o no presentan algún signo, pero puede ocurrir invasión de tejidos profundos y prueba de ello son los reportes de miocarditis en el Hospital General de Arequipa; además, las manifestaciones crónicas descritas en el país son las megaformaciones como el megaesófago y el megacolon, afecciones similares a las señaladas en otros países endémicos (Náquira y Cabrera, 2009).

T. cruzi presenta gran variabilidad genética a lo largo del continente americano, con los genotipos TcI, TcII, TcIII, TcIV, TcV y TcVI (Zingales et al., 2012), de los cuales TcI es el linaje más extendido en Perú, probablemente por eso varía su capacidad infecciosa, patogénica, inmunogénica y la manera en que desarrolla la enfermedad de Chagas (Náquira y Cabrera, 2009; Cura, 2014). Sin embargo, mediante el uso del modelo animal de ratón se sabe que el desequilibrio inmunológico tiene un patrón predominantemente inflamatorio mediado por citocinas, lo que propicia el desarrollo del daño cardíaco (Dorn et al., 2017; Padilla et al. 2017).

En la presente investigación se estudió *T. cruzi* cepa Arequipa (TcI), proveniente de la región del mismo nombre, y la cepa CL Brener (TcVI) proveniente de Brasil, cepa de referencia manejada a nivel de laboratorios de investigación.

El problema general de la presente investigación fue: ¿Cuáles son los niveles séricos de citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias y su expresión génica en tejido cardíaco, en ratones C57BL/6 infectados experimentalmente con la cepa Arequipa de *Trypanosoma cruzi* en comparación con la cepa CL Brener?

1.2. JUSTIFICACIÓN E IMPORTANCIA DE LA INVESTIGACIÓN

La complejidad de *T. cruzi* representa un reto en su estudio para el control, tratamiento y generación de vacunas contra la enfermedad de Chagas, una afección que se mantiene silenciosa durante años para luego ser la causa de muerte de miles de personas a nivel mundial y principalmente en las regiones endémicas del continente americano.

En este sentido, describir los mecanismos por los cuales se desarrolla la infección permite crear mejores estrategias para hacer frente a la enfermedad, es por eso que los estudios en modelos animales aportan datos sobre las diversas manifestaciones patológicas que están relacionadas al tipo de respuesta inmune mediada por citocinas.

Además, este tipo de estudios generalmente se ha realizado con cepas propias de cada país ya que *T. cruzi* presenta gran variabilidad genética, por lo que es una necesidad trabajar con cepas provenientes de Perú.

Es por eso que la infección experimental de ratones con *T. cruzi*, utilizada en la presente investigación, generará información sobre la dinámica de las citocinas implicadas en la modulación y resistencia a la enfermedad de Chagas tomando en comparación la infección experimental de ratones C57BL/6 con la cepa proveniente de Arequipa, que en general se considera menos patogénica por ser del genotipo TcI, y la cepa CL Brener de Brasil caracterizada como una muy patogénica al ser del genotipo TcVI.

1.3. OBJETIVOS

1.3.1. Objetivo general.

Comparar los niveles séricos y los niveles de expresión génica de citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias en ratones C57BL/6 infectados experimentalmente con la cepa Arequipa y CL Brener de *Trypanosoma cruzi*.

1.3.2. Objetivos específicos.

Determinar la parasitemia y carga parasitaria en tejido cardíaco de ratones C57BL/6 experimentalmente infectados con la cepa Arequipa y compararlas con la cepa CL Brener de *T. cruzi*.

Determinar los niveles séricos de citocinas proinflamatorias (INF- γ , IL-12, TNF α) y antiinflamatorias (IL-10, IL-4) en ratones C57BL/6 experimentalmente infectados con la cepa Arequipa y compararlas con la cepa CL Brener de *T. cruzi*.

Determinar los niveles de expresión génica de citocinas proinflamatorias (INF- γ , IL-12, TNF- α) y antiinflamatorias (IL-10, IL-4) en tejido cardíaco de ratones C57BL/6 experimentalmente infectados con la cepa Arequipa y compararlas con la cepa CL Brener de *T. cruzi*.

1.4. DELIMITACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

La presente investigación se realizó en el área de Biología Molecular e Inmunología del Laboratorio de Investigación de Enfermedades Infecciosas (LIEI) ubicado en la facultad de Ciencias y Filosofía de la Universidad Peruana Cayetano Heredia con dirección Av. Honorio Delgado 430, San Martín de Porres 15102; donde se realizó el proceso experimental en el modelo animal desde noviembre del 2017 hasta abril del 2018 además del análisis de las muestras obtenidas y el procesamiento de la información.

El financiamiento fue por parte del proyecto Convenio N°119-2015-FONDECYT titulado “Uso potencial del epítotope inmunogénico Alpha Galactosyl (α -Gal) acoplado a partículas virales ($q\beta$ -VLP) para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas”, el cual fue presentado por el Laboratorio de Investigación en Enfermedades Infecciosas (LIEI) de la Universidad Peruana Cayetano Heredia en colaboración con el Laboratorio de Inmunología y Genómica de Parásitos de la Universidad Federal de Minas Gerais (Brasil) y el Georgia Institute of Technology (EEUU).

CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO

2.1. ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN

El primer caso de la presencia de *Trypanosoma* en sangre humana en Perú fue descrita por el Dr. Edmundo Escomel en 1919; veinticinco años después se verificó el segundo caso y al mismo tiempo se realizó la primera investigación epidemiológica (De Araujo et al., 2010). Sin embargo, la infección parasitaria ha existido desde la época precolombina, (Náquira y Cabrera, 2009) y *T. cruzi* ha acumulado variaciones genéticas por lo que actualmente en Perú, de cuatro DTU (TcI, TcII, TcIII y TcIV) reportados entre las especies de triatomos infectados, TcI es la predominante (Padilla et al., 2017).

Varios estudios como el de Burgos et al., 2007 y Laucell et al., 1996 han demostrado que las cepas de *T. cruzi* parecen diferir en términos de patogenicidad y en la respuesta al tratamiento; además de estar asociada con varias alteraciones inmunológicas donde las citocinas juegan un papel fundamental.

Talvani et al. (2000) infectaron ratones C57BL/6 con la cepa Colombiana de *T. cruzi* y analizaron la cinética del parasitismo y la inmunopatología en el tejido cardíaco, los cuales estuvieron asociadas con la expresión de citocinas y demostraron que el control del parasitismo tisular se acompaña de la elevada expresión de ARNm IFN- γ y TNF- α ; pero se mantuvo la expresión de citocinas antiinflamatorias como IL-4 e IL-10 después que se controló el parasitismo en tejido, indicando la importancia de los componentes del parásito como estimulantes de la inflamación durante la miocarditis chagásica experimental.

Planelles et al. (2003) encontraron producción de IL-12 y TNF- α en macrófagos de ratones C57BL/6 y no en ratones BALB/c infectados por *T. cruzi*, pero sí mostraron un aumento en el porcentaje de células que expresan IL-4 después que la infección fue controlada; mientras que los ratones C57BL/6 presentaron un aumento en las células peritoneales CD3+ productoras de IFN- γ .

Song y Hwang (2017) resaltan a los ratones C57BL/6 como individuos caracterizados por expresar citocinas que median una fuerte respuesta inmune de células Th1 relacionadas a la resistencia de diversas infecciones y los resultados de Pedra et al. (2021) reafirman esta idea al encontrar menores niveles de parasitemia, una menor tasa de mortalidad y miocarditis menos intensa para ratones C57BL/6 infectados con la cepa Y de *T. cruzi* en comparación con ratones Balb/c infectados por la misma cepa.

Otro ensayo en el modelo animal de ratón, como el de Ferreira et al. (2018), asoció la alteración de la respuesta inmune típica de la fase crónica de la enfermedad de Chagas con la producción de citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias en la fase aguda.

2.2. BASES TEÓRICAS

2.2.1. Agente etiológico: *Trypanosoma cruzi*.

Trypanosoma cruzi es el agente etiológico de la enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana, perteneciente al Reino *Protista*, Phylum *Sarcomastigophora*, Orden *Kinetoplastida* y Familia *Trypanosomatidae* (Wainszelbaum, 2002).

Al ser un protozooario flagelado del orden *Kinetoplastida*, se caracteriza por la presencia de un kinetoplasto, una estructura que corresponde a una condensación de ADN (ADNk), localizado en el interior de una única mitocondria ramificada por toda la célula (Cura, 2014; De Lana y Marques, 2010).

2.2.2. Ciclo de vida y vías de transmisión de *Trypanosoma cruzi*.

T. cruzi es un parásito unicelular que alterna su vida entre un hospedero invertebrado y otro vertebrado (ciclo de vida digenético) (De Lana y Marques, 2010). Presenta tres estadios evolutivos denominados tripomastigote, epimastigote y amastigote que son diferenciados por la posición del kinetoplasto en relación con el núcleo celular y la aparición del flagelo (Cura, 2014).

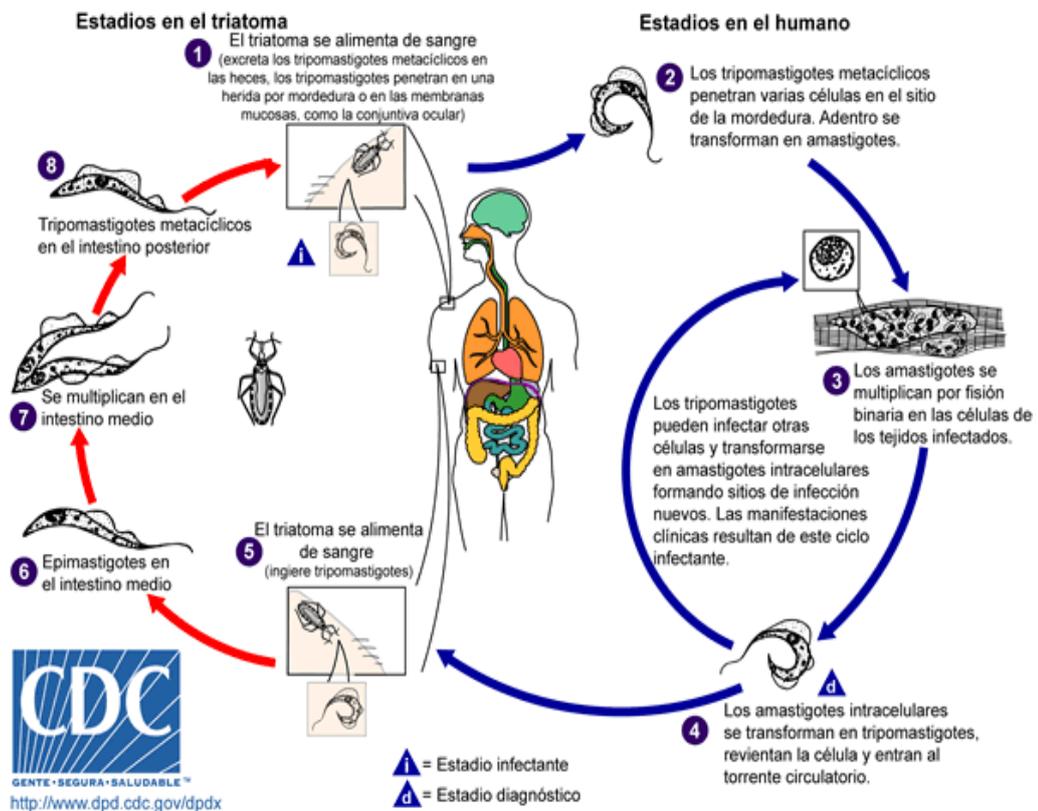
Cuando los insectos de la familia *Reduviidae* se alimentan de la sangre de mamíferos infectados, ingieren el parásito en su forma tripomastigote que, al llegar al estómago, se diferencian en la forma replicativa de epimastigote el cual migra al intestino (Gil-Jaramillo et al., 2016; Nogueira et al., 2007), estos se diferencian en tripomastigotes metacíclicos altamente infecciosos en las regiones posteriores del intestino y el recto para ser liberados junto con las heces u orina cerca al lugar donde se alimentó el insecto (Azambuja et al., 2005; De Souza et al., 2010).

Las formas tripomastigotes metacíclicos generalmente entran en contacto con el hospedero mamífero a través de los ojos, la boca o alguna lesión cutánea producida por la picadura del insecto vector, pero también por ingestión de alimentos contaminados con *T. cruzi*, transfusión de sangre, trasplante de órganos, vía congénita o accidentes de laboratorio (Yoshida, 2009).

Los tripomastigotes metacíclicos se dispersan a través del torrente sanguíneo e invaden células nucleadas (macrófagos, células musculares lisas y estriadas, células de Schwann, fibroblastos, células de la glía y neuronas, con excepción de los eosinófilos y neutrófilos) mediante fagocitosis y endocitosis inducida, dentro de los cuales se diferencian en amastigotes y, después de multiplicarse, se transforman en tripomastigotes para luego regresar al torrente sanguíneo después de la lisis celular (Yoshida, 2009).

Figura 1

Ciclo de vida de Trypanosoma cruzi



Nota. Tomado de *Ciclo biológico, Trypanosoma cruzi*, de DPDx - Laboratory Identification of Parasites of Public Health Concern, 2004, DPDx ([https://www.mcdinternational.org/trainings/malaria/spanish/dpdx/HTML/Trypanosomos isAmericana](https://www.mcdinternational.org/trainings/malaria/spanish/dpdx/HTML/Trypanosomos%20isAmericana)).

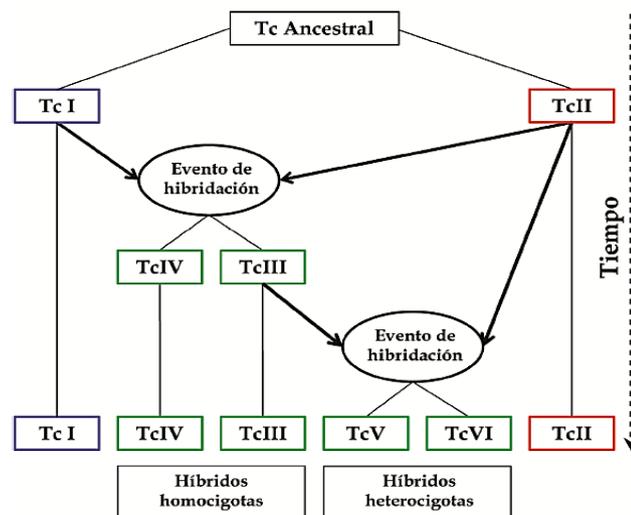
2.2.3. Variabilidad genética de *Trypanosoma cruzi*.

T. cruzi es una especie que está compuesta de poblaciones heterogéneas las cuales circulan por la naturaleza entre los vectores, el hombre, reservorios salvajes y animales domésticos. Su gran variabilidad se refleja en la morfología, sus enzimas específicas, su capacidad infectiva y patogénica, propiedades inmunológicas y el tropismo tisular (Cura, 2014).

Inicialmente, variantes denominadas como zymodemes I y II (ZI y ZII), con el tiempo fueron reconocidos formalmente como dos grupos principales llamados *T. cruzi* I y II (TcI y TcII) (Zingales et al., 2012) y, con estudios moleculares adicionales, se estableció un sistema de cinco unidades de tipificación discretas (Discreet Typing Units: DTU) para representar mejor la diversidad dentro de TcII, denominados TcIIa hasta TcIIe (Brisse et al., 2001). Con el tiempo se les asignó a las seis cepas como TcI, TcII, TcIII, TcIV, TcV y TcVI tal como se muestra en la Figura 2. (Cura, 2014; Miles et al., 2009).

Figura 2

Origen evolutivo de las DTU's



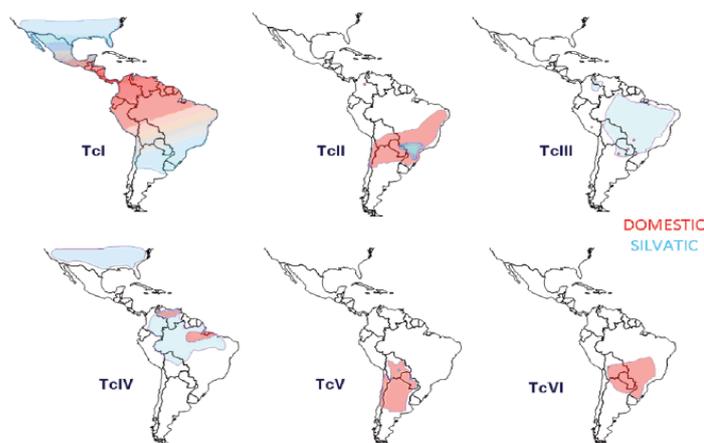
Nota. Tomado de *Modelos evolutivos y el origen de las UDTs de T. cruzi* (p.18), de Cura, 2014, Repositorio Digital Institucional de la Universidad de Buenos Aires.

Como se muestra en la Figura 3 sobre la distribución de las DTU's, TcI es la más abundante y con más amplia distribución en el continente americano. TcII, TcV y TcVI se restringen más al ciclo doméstico de transmisión en el sur de la cuenca del Amazonas y constituyen la causa principal de enfermedad de Chagas en esa región. TcIII se distribuye ampliamente a lo largo de América del Sur, pero es muy infrecuente en el ciclo de transmisión doméstico y en la infección en humanos. TcIV se distribuye mayormente en América del Norte, en la amazonia y norte de Sudamérica, además, es relativamente más frecuente que TcIII en la infección en humanos (Cura, 2014).

En Perú, de los cuatro DTU (TcI, TcII, TcIII y TcIV) reportados entre las especies de triatomos infectados, TcI es la predominante, siendo la mayoría de las muestras procedentes de Arequipa. Así mismo, TcI es considerada como la cepa de mayor transmisión intradomiciliaria principalmente en el sur del país (Náquira y Cabrera, 2009; Padilla et al., 2017).

Figura 3

Distribución geográfica de las 6 DTU's y su correspondencia con ciclos de transmisión asociados al ambiente silvestre o domiciliario



Nota. Tomado de “The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: Rationale, epidemiological relevance and research applications” (p. 243), de Zingales, 2012, *Infection, Genetics and Evolution*, 12(2).

2.2.4. Epidemiología de la Enfermedad de Chagas.

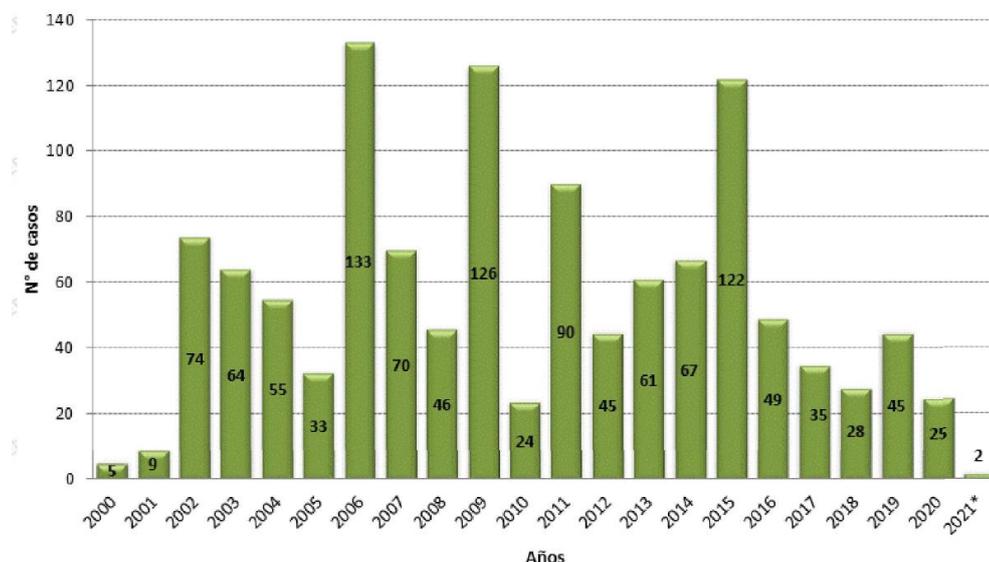
La OMS indica que en el mundo hay aproximadamente diez millones de personas infectadas por *T. cruzi* de las cuales ocho millones se encuentra principalmente en la parte continental de América Latina (De Andrade et al., 2018), sobre todo en zonas endémicas de veintidós países, pero los movimientos migratorios cambiaron el patrón epidemiológico de condición rural a una infección urbana y su extensión hacia países no endémicos como Estados Unidos de América, Canadá, muchos países europeos y algunos del Pacífico Occidental (Moncayo y Silveira, 2010; OMS, 2021).

La enfermedad de Chagas existe en varias regiones del Perú, tal como se muestra en la Figura 4 y Figura 5, de las cuales el área más importante se encuentra en la vertiente suroccidental del Pacífico comprendida entre los 13 y los 19 grados de latitud sur y los 10 a 3075 m.s.n.m. siendo Arequipa la región de mayor incidencia de casos (Náquira et al, 2001; Náquira y Cabrera, 2009).

Específicamente en la región norte de Perú (La Libertad, Lambayeque, Piura y Tumbes), hay escasa información sobre la magnitud de la infección, sin embargo, algunos datos permiten inferir que es importante el problema debido a la presencia del insecto vector infectado con *T. cruzi*. Así, en Chirinos (Piura), entre abril y diciembre del año 2000, la seroprevalencia fue de 11,5% en 304 muestras de la población (Náquira y Cabrera, 2009).

Figura 4

Casos anuales de la Enfermedad de Chagas en Perú desde el 2000 al 2021



Nota. Datos del 2021 reportados hasta la semana 11. Tomado de *Número de casos de enfermedad de Chagas, Perú 2000 – 2021**, de MINSA, 2021, (<https://www.dge.gob.pe/portal/docs/vigilancia/sala/2021/SE11/chagas.pdf>).

Figura 5

Casos de la Enfermedad de Chagas por departamento en Perú el 2016 al 2021

Departamentos	Años					
	2016	2017	2018	2019	2020	2021*
AMAZONAS	22	5	1	2	1	0
ANCASH	0	0	1	1	0	0
APURIMAC	0	0	0	0	0	0
AREQUIPA	19	17	9	23	10	2
AYACUCHO	1	2	2	1	3	0
CAJAMARCA	0	1	3	1	2	0
CALLAO	0	0	0	0	0	0
CUSCO	1	1	0	0	0	0
HUANCAVELICA	0	0	0	0	0	0
HUANUCO	0	0	1	1	0	0
ICA	0	1	0	0	1	0
JUNIN	0	1	0	0	0	0
LA LIBERTAD	0	0	0	0	0	0
LAMBAYEQUE	0	0	0	0	0	0
LIMA	0	1	1	0	0	0
LORETO	1	0	3	3	1	0
MADRE DE DIOS	0	0	0	0	0	0
MOQUEGUA	1	4	0	1	1	0
PASCO	0	0	0	0	0	0
PIURA	0	0	0	0	0	0
PUNO	0	0	0	1	1	0
SAN MARTIN	4	1	3	5	0	0
TACNA	0	1	0	3	2	0
TUMBES	0	0	1	0	0	0
UCAYALI	0	0	3	3	3	0
Perú	49	35	28	45	25	2

Nota. Datos del 2021 reportados hasta la semana 11. Tomado de *Número de casos de enfermedad de Chagas según departamentos, Perú 2016 – 2021**, de MINSA, 2021, (<https://www.dge.gob.pe/portal/docs/vigilancia/sala/2021/SE11/chagas.pdf>).

2.2.5. Etapas de la infección y manifestaciones clínicas de la Enfermedad de Chagas.

Durante la Enfermedad de Chagas la fase aguda dura de dos a cuatro meses y existe un elevado número de tripomastigotes en sangre. Rara vez se observan signos como el chagoma y el signo de Romana, pero generalmente es asintomática o puede generar fiebre, edema, adenopatías, hepatomegalia y esplenomegalia. Estas manifestaciones clínicas son más frecuentes en niños, donde el desarrollo de miocarditis aguda llega a ser mortal en un 5% de los casos (Cura, 2014; Hontebeyrie et al., 2010)

La fase indeterminada inicia luego que la fase aguda es controlada, por lo tanto, esta etapa es asintomática y se caracteriza, principalmente, por la presencia de anticuerpos IgG y una muy baja parasitemia; además puede ser asintomática de por vida (portador) o puede iniciar la forma crónica de la enfermedad (Cura, 2014; Náquira y Cabrera, 2009).

La fase crónica puede iniciar en un lapso de 10 a 30 años después del contacto con el parásito y los pacientes presentan cardiomiopatía y/o los megasíndromes digestivos; además se caracteriza por su evolución lenta, el predominio de daño tisular y títulos altos de anticuerpos (Cura, 2014).

2.2.6. Diagnóstico y tratamiento de la Enfermedad de Chagas.

Las pruebas de diagnóstico para la enfermedad de Chagas dependen de la forma clínica. Así se tiene que, en la fase aguda, debido a la parasitemia elevada, los métodos parasitológicos presentan alta sensibilidad en esta etapa (examen en fresco, gota gruesa, microconcentración, xenodiagnóstico, hemocultivo, métodos moleculares) (Cura, 2014).

En la forma crónica, para la detección de anticuerpos IgG específicos contra *T. cruzi*, es recomendable las pruebas serológicas. Los métodos frecuentemente usados son la hemoaglutinación indirecta (HAI), inmunofluorescencia indirecta (IFI), inmunoensayo enzimático (ELISA) y el Inmunoblot (IB) (Náquira y Cabrera, 2009).

El propósito del tratamiento para la enfermedad de Chagas es usar agentes tripanocidas como el benznidazol (BZN) y el nifurtimox (NFX) para reducir la carga parasitaria (esperando prevenir, retrasar o reducir el impacto de las complicaciones clínicas) y así reducir su transmisión, aunque por sus eventos adversos su uso es aún controversial (Herwaldt, et al. 2018)

2.2.7. Respuesta inmune en la Enfermedad de Chagas: Papel de las citocinas.

Aunque la fisiopatología de la enfermedad de Chagas no se conoce completamente, la variación en la manifestación patológica está relacionada con la complejidad del parásito y con las diferencias en la respuesta inmune, que determina la capacidad del huésped para controlar la parasitemia, la intensidad de las reacciones inflamatorias y la inducción de respuestas de tipo autoinmune (Ayo et al., 2015; Chaves et al., 2016).

Además, estrategias de evasión inmune desarrolladas por *T. cruzi* le son prescindibles para el establecimiento de una infección de larga duración; algunos ejemplos son la inactivación del complemento, el escape del fagolisosoma, los anticuerpos sin especificidad a *T. cruzi* y la respuesta inmune retardada (Gil-Jaramillo et al., 2016).

Los mecanismos precisos involucrados en la respuesta antiparasitaria en la Enfermedad de Chagas siguen sin estar claros, pero se sabe que la generación de células T funcionales CD4⁺ y CD8⁺ es crucial para controlar la parasitemia y la supervivencia a la infección aguda; además, su intervención junto con la participación de citocinas como IFN- γ , TNF- α e IL-12, ayudan en el control de la infección. Por otro lado, IL-4, IL-10 y el Factor de Crecimiento Transformante Beta (TGF- β) son capaces de regular el proceso inflamatorio durante la fase aguda (Talvani et al., 2000).

Sin embargo, la dinámica de las citocinas en el proceso inflamatorio puede promover lesiones en órganos como el corazón, en donde un incremento en la actividad de las células T CD8⁺ está asociado con el daño cardíaco, la mayor causa de mortalidad en la enfermedad de Chagas (Ayo et al., 2015; Planelles et al., 2003).

Las citocinas son pequeñas glicoproteínas con un peso molecular menor a 30 kDa (~ 200 aminoácidos) que tienen una influencia reguladora muy compleja sobre la inflamación y la inmunidad. Son los mensajeros intercelulares del sistema inmune donde integran la función de varios tipos de células y en diversos compartimentos corporales para provocar una respuesta inmune coherente. Se clasifican según la base a partir de la cual se producen, ya sea de células Th1, Th2 o Th17 tal como se muestra en la Figura 6 (Gulati et al., 2016).

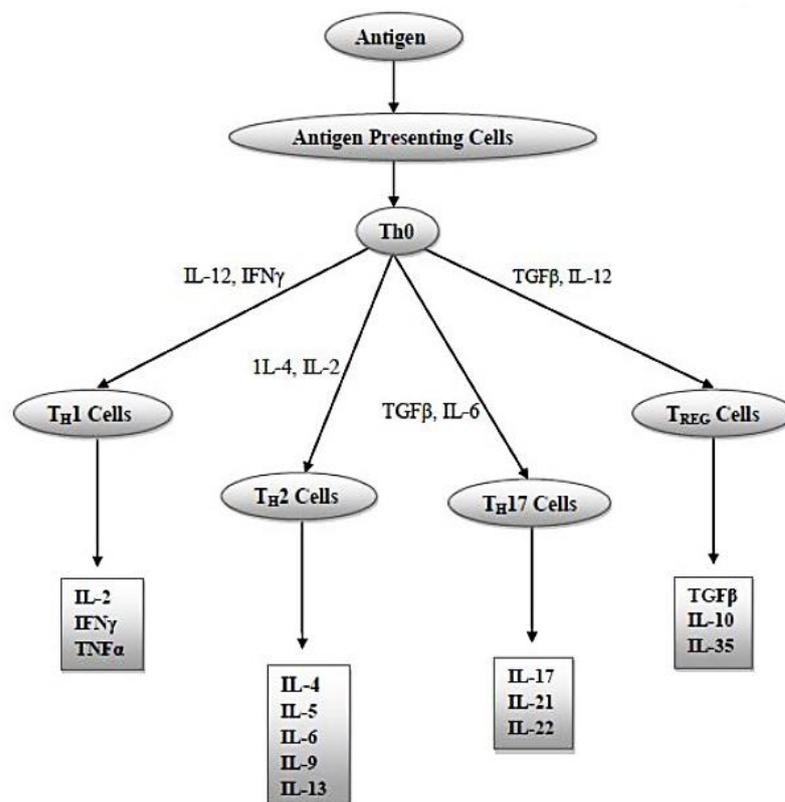
De acuerdo con su secreción, las citocinas se clasifican en linfocinas (citocinas que son secretadas por las células T y regulan la respuesta inmune), citocinas proinflamatorias (citocinas que amplifican y perpetúan el proceso inflamatorio), factores de crecimiento (citocinas que promueven la supervivencia celular y producen cambios estructurales en las vías respiratorias), quimiocinas (citocinas que son quimiotácticas para las células

inflamatorias) y citocinas antiinflamatorias (citocinas que modulan negativamente la respuesta inflamatoria) (Gulati et al., 2016).

Más allá de la inmunidad innata y adaptativa, las citocinas tienen un papel importante en muchas funciones diversas, como la diferenciación de células inmunes, la inflamación, la angiogénesis, la tumorigénesis, la neurobiología, la patogénesis viral, etc. Por lo tanto, las citocinas pueden ser biomarcadores útiles para la salud y enfermedad actuando como agentes de diagnóstico, pronóstico y terapéuticos (Gulati et al., 2016).

Figura 6

Perfil de citocinas producidas según el tipo de células



Nota. Tomado de “Cytokines and their Role in Health and Disease: A Brief Overview” (p.2), de Gulati et al., 2016, *MOJ Immunol*, 4(2).

2.2.8. Modelo animal para la Enfermedad de Chagas.

Los ratones se han utilizado con mucha frecuencia como modelos experimentales para estudiar la enfermedad de Chagas por varias razones; porque permite el aislamiento del parásito a lo largo del curso de la infección, tiene reacciones serológicas positivas indicativas de la infección, presenta las diversas manifestaciones clínicas de la enfermedad

de Chagas crónica, desarrolla miocarditis y otras alteraciones patológicas que caracterizan a la enfermedad e induce la respuesta inmune en el tejido huésped; además se reproducen fácilmente, son fáciles de mantener, manipular e infectar experimentalmente (Ayo et al., 2015; Desquesnes y De Lana, 2010).

Diferentes cepas de ratones presentan distintos patrones de susceptibilidad a la infección por *T. cruzi*. Son elegidas de acuerdo con la virulencia de la cepa del parásito o el objetivo del estudio. Además, hoy en día la existencia de varios linajes knockout ha facilitado el estudio de diferentes aspectos inmunológicos de la infección por *T. cruzi* (Desquesnes y De Lana, 2010).

Particularmente, los ratones C57BL/6 destacan por su inmunogenicidad debido a que esta cepa de ratón se desarrolló para el estudio del cáncer y las respuestas inmunitarias. Se caracterizan por el desarrollo de un alto nivel de células Th1 lo que los hace óptimos para combatir agentes infecciosos (Song y Hwang, 2017).

Comparando con ratones BALB/c, C57BL/6 muestran menores picos de parasitemia, tasas de mortalidad y miocarditis menos intensa ante la infección por *T. cruzi*; además las hembras son más resistentes que los machos, lo que conlleva a su supervivencia de la fase crónica de la enfermedad de Chagas debido a que en estudios previos se ha indicado que la participación de hormonas como el estradiol podría jugar un papel relevante (Pedra et al., 2021).

Los ratones C57BL/6 muestran menores niveles de inflamación que otras cepas de ratón infectadas por *T. cruzi*, esto se explica debido a que desarrollan una respuesta inmune enriquecida con células Th1, con diferentes mecanismos para hacer frente a la infección parasitaria intracelular. Así mismo, presenta un perfil de citocinas compatible con pacientes que tienen la enfermedad de Chagas (Pedra et al., 2021).

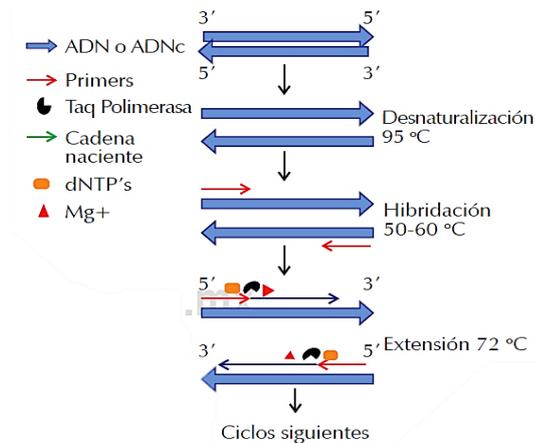
2.2.9. Técnicas de PCR y ELISA para el análisis de la infección por *T. cruzi*.

2.2.9.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

La PCR es una técnica enzimática *in vitro* que amplifica millones de veces una secuencia de ADN durante varios ciclos repetidos en los que la secuencia blanco es copiada fielmente en una serie de pasos, tal como describe en la Figura 7, pero si se usa ADN complementario (ADNc) proveniente del ARNm (ácido ribonucleico mensajero) se le conoce como RT-PCR (Reverse Transcription-PCR) (Tamay et al., 2013).

Figura 7

Pasos de un ciclo de la PCR

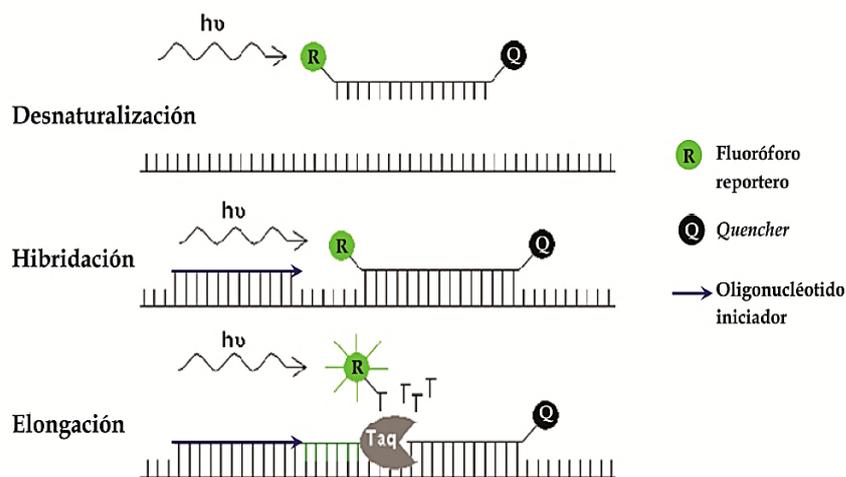


Nota. Tomado de “Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real” (p. 75) de Tamay et al., 2013, *Investigación en Discapacidad*, 2(2).

Una de las variantes de la PCR, la PCR en tiempo real, utiliza agentes intercalantes fluorescentes o sondas TaqMan®, que permiten el seguimiento continuo de la reacción durante el proceso de amplificación, en donde el valor de Ct se determina indicando el número de ciclos en el que la acumulación del producto generó una fluorescencia mayor al umbral fijo y con este valor se logra medir la concentración de ADN o ADNc de interés por cuantificación relativa (en relación a una muestra control) o absoluta (utilizando una curva estándar) (Kouadjo et al., 2007; Cura, 2014).

Figura 8

Esquema del mecanismo de amplificación de PCR en tiempo real utilizando sondas TaqMan



Nota. Tomado de *Esquema del mecanismo de amplificación de PCR en tiempo real utilizando sondas TaqMan para la detección del producto de la reacción* (p. 27), de Cura, 2014, Repositorio Digital Institucional de la Universidad de Buenos Aires.

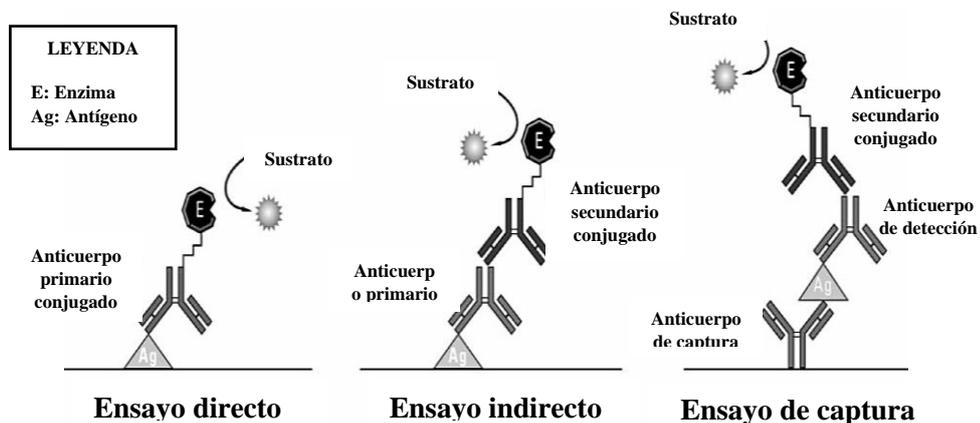
2.2.9.2. Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA).

Es una técnica diseñada para detectar y cuantificar péptidos, proteínas, anticuerpos y hormonas mediante la interacción anticuerpo-antígeno y la producción de una señal calorimétrica detectada por absorbancia; cuyas variantes dependerán de la distribución de los reactivos, tal como se muestra en la Figura 9 (Boster Antibody And Elisa Experts [BOSTER], s.f.).

Con el ensayo ELISA se puede obtener resultados cuantitativos mediante el uso de una curva estándar, y cualitativos que indican la presencia o ausencia de un antígeno en comparación a un control (BOSTER, s.f.).

Figura 9

Diagrama de formatos ELISA



Nota. Adaptado de “ELISA technical guide and protocols” (p. 2), de Thermo Scientific, 2010. TECH TIP # 65 Thermo Scientific (<http://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/TR0065-ELISA-guide.pdf>).

2.3. GLOSARIO

In vitro. Producido en el laboratorio por métodos experimentales. Es lo opuesto a *in vivo* (Instituto Nacional del Cáncer, 2022).

Parasitemia. Una condición en la que parásitos están presentes en la sangre (Merriam Webster, 2022).

Carga parasitaria. Expresa la cantidad de parásitos interiorizados en un hospedador (Valencia, 2017).

Virulencia. Capacidad de un microorganismo de causar daño a su anfitrión (Instituto Nacional del Cáncer, 2022).

Absorbancia. Al incidir la luz sobre una muestra, una parte de la radiación es absorbida por la sustancia; por lo tanto, una menor intensidad de luz ingresa a un detector con el que es posible realizar la medición (ThermoFisher Scientific, 2022).

Equivalente parásito. Término que hace referencia a la cantidad de ADN perteneciente a un parásito que es detectado por el termociclador en tiempo real (Valencia, 2017).

Ct. Abreviatura del término en inglés cycle threshold (ciclo de umbral) cuyo valor es el número de ciclo en el que la fluorescencia generada en la PCR en tiempo real es significativamente superior al ruido de fondo. En el ciclo umbral, se ha generado una cantidad detectable de amplicón durante la primera fase exponencial de la reacción (Qiagen, 2022).

Amplicón. Un segmento de ADN cromosómico que sufre amplificación y contiene material genético replicado (Merriam Webster, 2022).

Ratón knockout (KO). Ratón de laboratorio en el que los investigadores han inactivado un gen existente reemplazándolo o interrumpiéndolo con una pieza artificial de ADN mediante ingeniería genética para que no exprese una proteína en particular (National Human Genome Research Institute [NIH], 2020).

Partícula q β -VLP. Virus-like particles (VLPs) del español “partículas similares a virus”, son complejos de proteínas similares a las partículas de un virus nativo (bacteriófago q β por ejemplo), pero que no contienen el genoma viral. Por lo tanto, no pueden replicarse, pero pueden imitar la antigenicidad viral sin ser patógenos (Lomonosoff y Ponndorf, 2021).

LLC-MK2. Abreviatura que hace referencia al término en inglés Rhesus Monkey Kidney Epithelial Cells, es una línea celular epitelial establecida a partir del tejido renal extirpado de seis monos rhesus (*Macaca mulatta*) para ser utilizada en el cultivo *in vitro* de diversos agentes infecciosos (Evident, 2021).

Epítotope Alpha Galactosyl (α -gal). Abreviatura de Gal α (1,3)Gal β (1,4)GlcNAc α (α -gal), el cual es un carbohidrato que forma parte de las glicoproteínas de la superficie del *Trypanosoma cruzi* (Valencia et al., 2020).

Zymodeme. Grupo de parásitos con las mismas isoenzimas (Zingales et al., 2012).

2.4. HIPÓTESIS

2.4.1. Hipótesis general

Los niveles séricos y los niveles de expresión génica en tejido cardíaco de citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias son significativamente menores en ratones infectados con *T. cruzi* cepa Arequipa que con *T. cruzi* cepa CL Brenner.

2.4.2. Hipótesis específicas

La parasitemia y carga parasitaria en tejido cardíaco de ratones C57BL/6 son menores ante la infección por *T. cruzi* cepa Arequipa que con la cepa CL Brenner.

Los niveles séricos de citocinas proinflamatorias (INF- γ , IL-12, TNF α) y antiinflamatorias (IL-10, IL-4) en ratones C57BL/6 son menores ante la infección por *T. cruzi* cepa Arequipa que con la cepa CL Brenner.

Los niveles de expresión génica de citocinas proinflamatorias (INF- γ , IL-12, TNF- α) y antiinflamatorias (IL-10, IL-4) en tejido cardíaco de ratones C57BL/6 son menores ante la infección por *T. cruzi* cepa Arequipa que con la cepa CL Brenner.

CAPÍTULO III: MARCO METODOLÓGICO

3.1. ENFOQUE Y DISEÑO

La presente investigación tuvo un enfoque cuantitativo y diseño experimental.

3.2. SUJETOS DE LA INVESTIGACIÓN

La población seleccionada para los ensayos experimentales fue la cepa de ratón C57BL/6, la cual se adquirió en la Unidad de Bioterio-LID de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (UPCH).

La muestra representativa estuvo conformada por treinta y cinco ratones; número seleccionado teniendo en cuenta los resultados piloto del proyecto Convenio N°119-2015-FONDECYT.

Los sujetos de investigación fueron ratones hembra de treinta y cinco días de vida, mantenidos en condiciones estándares de limpieza, alimento, agua y fueron distribuidos en grupos, tal como se explica en la siguiente sección.

3.3. MÉTODOS Y PROCEDIMIENTOS

3.3.1. Distribución de ratones

Los ratones fueron distribuidos en dos grupos de quince individuos (según la cepa de *T. cruzi* a usar en la infección) y un grupo de cinco ratones como controles negativos, los cuales se sacrificaron según la Tabla 1:

Tabla 1

Número de ratones sacrificados según el día posinfección

Día posinfección	Infectados con la cepa Arequipa de <i>T. cruzi</i>	Infectados con la cepa CL Brener de <i>T. cruzi</i>	Número de ratones control
5	3	3	1
15	3	3	1
30	3	3	1
60	3	3	1
120	3	3	1
Total	15	15	5

3.3.2. Cultivo *in vitro* de parásitos e infección experimental con *T. cruzi*.

Todo el proceso de cultivo *in vitro* se realizó en condiciones estériles, dentro de una cabina de flujo laminar.

La línea celular LLC-MK2 (ATCC® CCL-7™) fue cultivada en frasco de cultivo para células adherentes Corning® de 75 cm² con 10 ml de medio de cultivo RPMI (Anexo 1). Después de tres días de incubación a 37 °C, 95% humedad y 5% CO₂, fueron infectadas con tripomastigotes de la cepa Arequipa (TcI) y la cepa CL Brener (TcVI) proporcionadas por el Laboratorio de Investigación de Enfermedades Infecciosas (LIEI) de la UPCH. La cepa Arequipa (TcI) provenía del contenido intestinal del vector *Triatoma infestans* y la cepa CL Brener (TcVI) era originaria de Brasil (Valencia, 2017).

Para la mencionada infección, los parásitos (que estaban preservados en nitrógeno líquido) fueron descongelados en baño maría a 37°C durante 30 segundos y se agregaron a la línea celular con medio RPMI. 4 - 5 días después, los parásitos del sobrenadante fueron trasladados a tubos cónicos estériles de 15 ml y se centrifugó a 40 x g (fuerza g) durante 10 minutos para precipitar algunas células, se decantó el sobrenadante en otro tubo y se centrifugó a 700 x g durante 10 minutos para precipitar los tripomastigotes.

Los tripomastigotes fueron resuspendidos en medio RPMI con el volumen necesario para obtener la concentración de 10⁵ tripomastigotes/ml (Talvani et al., 2000). Con 100 ul de la resuspensión, se infectó vía intraperitoneal cada uno de los quince ratones C57BL/6 con la cepa Arequipa y quince ratones con la cepa CL Brener; además, a los cinco ratones control solo se les inyectó solución salina fisiológica.

Se realizó la eutanasia de los ratones en los días 5, 15, 30, 60 y 120 posinfección mediante inyección letal de 200 mg/kg de Ket-A-Xyl® y 16 mg/kg de DORMI-XYL®. Se procedió a diseccionar con un corte longitudinal en la parte ventral para coleccionar sangre del corazón mediante punción en el ventrículo, se separó el suero mediante centrifugación a 3000 revoluciones por minuto (rpm) durante 10 minutos y se preservaron a -20 °C. Del tejido cardíaco obtenido, la mitad fue preservado en alcohol de 70° a -20 °C para extracción de ADN y la otra mitad fue preservada en RNAlater® (Sigma-Aldrich®) a -20 °C para la extracción de ARN (Talvani et al., 2000).

Algunos tripomastigotes se mantuvieron en tubos cónicos estériles con medio LIT (Anexo 1) y fueron incubados a 28 °C para su diferenciación en epimastigotes, los cuales fueron usados en la elaboración de la curva estándar y así determinar el límite de cuantificación para la qPCR en Tiempo Real, explicado en la siguiente sección (Piron et al., 2007).

3.3.3. Determinación de parasitemia y carga parasitaria en tejido cardíaco de ratones infectados por *T. cruzi* mediante qPCR en Tiempo Real.

3.3.3.1. Extracción de ADN.

Se usó los coágulos para la determinación de la parasitemia y los tejidos cardíacos para la determinación de la carga parasitaria. La extracción de ADN para ambos tipos de muestra se realizó mediante el método fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (López et al., 2014).

Para la extracción de ADN a partir de los coágulos de los ratones control e infectados, primero se colocó 300 microlitros (μL) de muestra en tubos eppendorf® de 2.0 ml, luego se adicionó 1 ml de buffer de lavado de eritrocitos (BLE: 10 milimolar (mM) Tris HCl pH 8, 5mM MgCl₂, 10mM NaCl), se agitó en vortex y después de centrifugar a 16000 x g durante 2 minutos se decantó el sobrenadante; este paso de lavado fue repetido hasta 4 veces para obtener un precipitado blanquecino.

Luego de resuspender el precipitado en 400 μL de BLE, se adicionó 35 μL de SDS (10% Ambion®) y 20 μL de proteinasa K (20 mg/ml Ambion®) obteniéndose un volumen final aproximado de 500 μL , el cual se incubó durante 16 horas a 56 °C.

Posteriormente se agregó 500 μL de Fenol: Cloroformo: Alcohol Isoamílico en la proporción 25:24:1 (Ambion®), se homogenizó en vortex y después de centrifugar a 16000 x g por 5 minutos se obtuvo tres fases conformadas por fenol (inferior), otros compuestos orgánicos (intermedia) y la fase acuosa con los ácidos nucleicos (superior). La fase acuosa fue transferida pipeteado cuidadosamente a un nuevo tubo de 1.5 ml y después de agregar 400 μL de Cloroformo: Alcohol Isoamílico en la proporción 24:1 (SIGMA-ALDRICH®) se centrifugó a 16000 x g por 5 minutos para obtener dos fases.

La fase superior se trasladó a un nuevo tubo de 1.5 ml para precipitar el ADN adicionando 900 μL de etanol absoluto (SIGMA-ALDRICH®), 30 μL de acetato de sodio (SIGMA-ALDRICH®) e incubando la mezcla a -70 °C por 1 hora; luego se centrifugó a 16000 x g durante 15 minutos a 4 °C, se decantó el sobrenadante y después de realizar dos lavados del ADN precipitado con 1 ml de alcohol 70° se dejó secando el pellet para después ser eluido en 100 μL buffer Tris-EDTA (TE: 10 mM Tris HCl pH 8 y 1mM EDTA pH 8).

La extracción de ADN para las muestras de tejido cardíaco de los ratones control e infectados se realizó como lo explicado anteriormente, con la diferencia que la lisis celular

de 25 mg de tejido se realizó en 500 µL de buffer de lisis TNES (10 mM Tris HCl pH 8, 200 mM NaCl, 10 mM EDTA, 0.5% SDS) y 20 µL de proteinasa K.

El ADN obtenido de todas las muestras fue cuantificado por medio del espectrofotómetro NanoDrop™ 2000/2000c, se normalizó las concentraciones a 100 nanogramos/microlitro (ng/µL) diluyendo con el buffer de elución Tris-EDTA y fueron mantenidos -20 °C hasta su posterior uso en la qPCR en tiempo real.

3.3.3.2. Elaboración de las curvas estándares para la cepa Arequipa y CL Brener de *T. cruzi* en coágulo y tejido cardíaco.

Para la elaboración de las curvas estándares en coágulo, primero se colectó los epimastigotes de cada cepa (Arequipa y CL Brener) de *T. cruzi* mantenidos en cultivo con medio LIT y se contó mediante examen microscópico en cámara de Neubauer, luego se ajustó a 10^5 parásitos en 1 mL de sangre total recién obtenida de ratones sanos, se dejó coagular y el suero fue separado mediante centrifugación a 700 x g durante 10 minutos.

El mismo procedimiento de infección se llevó a cabo para la elaboración de la curva estándar de cada cepa (Arequipa y CL Brener) en tejido cardíaco, con la diferencia que la cantidad de epimastigotes de *T. cruzi* que se agregó fue de 25×10^5 parásitos en 25 mg de tejido cardíaco de ratones sanos (Valencia, 2017).

La extracción de ADN del coágulo y el tejido infectado experimentalmente fue realizada con el procedimiento mencionado en la sección anterior y, a partir de lo obtenido, se elaboró diluciones sucesivas (1:10) hasta la cantidad mínima de ADN detectable para cada cepa de *T. cruzi*, empleando como diluyente ADN de muestras negativas en una concentración de 50 ng/µL.

Para cada cepa de *T. cruzi*, se realizó la qPCR en tiempo real a las diluciones seriadas por duplicado y se evaluó la eficiencia de los ensayos ($E_{exp} = 10^{(-1/s)} - 1 \times 100$; s = pendiente). Las curvas con la mayor eficiencia fueron usadas como curvas estándares de referencia en la evaluación de las muestras infectadas y sus controles negativos (Piron et al., 2007).

La menor dilución, detectable por la qPCR, fue tomada como el límite de cuantificación.

3.3.3.3. Cuantificación absoluta de *T. cruzi* cepa Arequipa y CL Brener mediante qPCR en tiempo real.

Para realizar la qPCR en tiempo real se emplearon primers específicos que tienen como blanco de amplificación e hibridación una región de 166 pb del ADN satelital de *T. cruzi*:
Directo: 5'-ASTCGGCTGATCGTTTTTCGA-3' y Reverso: 5'-AATTCCTCCAAGCAGCGGATA-3', cuya amplificación fue detectada con la Sonda: 5' 6FAM-CACACACTGGACACCAA-NFQ-MGB 3' (Llano et al., 2014; López et al., 2014).

Cada reacción de amplificación fue realizada en un volumen final de 15 µL que contenía 1.2 µL de agua libre de nucleasas, 1x MasterMix (Quiagen®), 1µM de cada cebador, 0.2µM de la Sonda adquiridos de IDT Integrated DNA Technologies (USA) y 3 µL de ADN molde.

Las condiciones de amplificación en el equipo de PCR en tiempo real Applied Biosystems StepOne™ fueron: 1 min. a 50 ° C, 15 min a 95 ° C y 40 ciclos de tres temperaturas (95 ° C / 15 seg, 54 ° C / 1 min y 72 ° C / 1 min) (Talvani et al., 2000; Piron et al., 2007).

Las muestras infectadas con la cepa Arequipa y CL Brener fueron evaluadas en la qPCR en tiempo real junto con sus respectivas curvas estándares, los controles negativos y controles en blanco que solo contenían reactivos.

3.3.4. Dosaje de citocinas en suero de ratones infectados con la cepa Arequipa y CL Brener mediante ELISA sándwich.

Se realizó el dosaje de citocinas en suero usando el método de ELISA sándwich del kit DuoSet® Elisa Development System (R&D SYSTEMS, 2017).

Las placas de ELISA Immulon® 4 HBX fueron sensibilizadas a 4°C durante toda la noche con 100 µL/pocillo de los anticuerpos de captura INF-γ (diluido a 5 µg/ml), IL-12 (diluido a 4 µg/ml), TNF-α (diluido a 1.8 µg/ml), IL-10 (diluido a 5 µg/ml) e IL-4 (diluido a 5 µg/ml). Dichas diluciones fueron en buffer carbonato (0.21 gramos de NaHCO₃ y 0.26 gramos de Na₂CO₃ en 50ml de agua destilada).

Después de retirar el contenido y lavar las placas, se usó 200 µL/pocillo de la solución de bloqueo albúmina sérica bovina 1% (BSA) diluido en buffer fosfato salino 1X (PBS) el cual fue incubado durante 1 hora a temperatura ambiente y luego se lavó. Se agregó 100 µL/pocillo de los sueros de ratones control e infectados diluidos a 1/50 con PBS 1X y la

curva estándar de cada citocina recombinante del kit comercial DuoSet® que estuvo conformada por diluciones 1/2 desde 1000 picogramos/mililitro (pg/ml) a 7.81 pg/ml.

Luego de agregar los anticuerpos de detección biotinilados (DuoSet®) para cada citocina, se colocó la dilución 1/2500 de Ultra Streptavidin-HRP (ThermoFisher Scientific™) y se reveló con la solución sustrato 1-STEPTM Ultra TMB-ELISA (ThermoFisher Scientific™) cuya reacción fue detenida con H₂SO₄ (SIGMA-ALDRICH®) 2 molar (M).

Los lavados fueron realizados con PBS 1X (137mM NaCl, 2.7mM KCl, 8.1mM Na₂HPO₄, 1.5mM KH₂PO₄) y TWEEN® 20 al 0.05 % después de cada incubación del procedimiento antes mencionado.

La lectura de las absorbancias se realizó al final del proceso a una longitud de onda de 450 nanómetros (nm) en el lector de microplacasplacas de ELISA VersaMax™, cuyos resultados fueron analizados en el software SoftMax® Pro.

3.3.5. Cuantificación relativa de la expresión génica de citocinas en tejido cardíaco por RT-qPCR en tiempo real.

El ARN total a partir del tejido cardíaco se extrajo utilizando la metodología de TRIzol® Reagent (Ambion®) descrito en el Anexo 2 (Hummon et al., 2007).

El ARN obtenido fue cuantificado por medio del espectrofotómetro NanoDrop™ 2000/2000c, luego se normalizaron las concentraciones a 250 ng/uL con agua libre de nucleasas y se mantuvieron a -80 °C hasta su posterior uso.

Para la RT-qPCR en tiempo real, primero se realizó la retrotranscripción del ARN obtenido, por lo que las reacciones se procesaron utilizando el QuantiTect Rev. Transcription Kit (QIAGEN™) en un volumen final de 20 µL que contenía 3.2 µL de agua libre de nucleasas, 1X buffer de retrotranscripción, 4 mM de dNTPs, 1X de primers de retrotranscripción, 1 µL de enzima transcriptasa reversa, 1 µL de inhibidores de ARNasas y 10 µL de ARN total molde a una concentración de 250 ng/ µL. Las condiciones en el termociclador fueron: 10 min a 25 °C, 120 min a 37 °C y 5 min a 85 °C (Valencia, 2017).

La cuantificación relativa de la expresión génica mediante qPCR en tiempo real con Sybr Green (QuantiTect®) fue realizada según las condiciones de reacción para cada citocina y el control endógeno de β-actina en el que el volumen final de 15 µL contenía 1µM de los primers (IDT Integrated DNA Technologies), 1X de Syber Green (QuantiTect®), 2.5 µL de agua libre de nucleasas y 2 µL de ADNc.

Las condiciones de amplificación en el equipo de PCR en tiempo real Applied Biosystems StepOne™ fueron: 15 min a 95 ° C y 40 ciclos de tres temperaturas (95°C / 15 seg, 60°C / 1 min y 72°C / 1 min) (Pereira et al., 2014; Valencia, 2017).

Tabla 2

Secuencias nucleotídicas de los cebadores utilizados en la qPCR tiempo real y tamaño de los fragmentos amplificados.

Gen	Primers	Secuencia (5' - 3')	Amplicón (pb)
β-actina	Directo	GCT TCT TTG CAG CTC CTT CGT	68
	Reverso	CGT CAT CCA TGG CGA ACC TG	
INF-γ	Directo	TCA GCA ACA GCA AGG CGA AA	140
	Reverso	CCG CTT CCT GAG GCT GGAT	
IL-12	Directo	TCA CAC GGG ACC AAA CCA	72
	Reverso	CAG GCA ACT CTC GTT CTT GTG TAGT	
TNF-α	Directo	CAT CTT CTC AAA ATT CGA GTG ACAA	63
	Reverso	CCT CCA CTT GGT GGT TTG CT	
IL-10	Directo	CAT TTG AAT TCC CTG GGT GAGA	101
	Reverso	TGC TCC ACT GCC TTG CTC TT	
IL-4	Directo	ACA GGA GAA GGG ACG CCAT	95
	Reverso	GAA GCC CTA CAG ACG AGC TCA	

Nota. Tomado de *Caracterização da capacidade patogênica de Trypanosoma cruzi isolado em Arequipa - área endêmica do Peru* (p. 51), de Valencia, 2014, Tesis de Doctorado, Universidade Federal de Minas Gerais.

Las muestras infectadas con la cepa Arequipa y CL Brener de *T. cruzi* fueron evaluadas en la qPCR en tiempo real junto a los controles negativos y los controles en blanco que solo contenían reactivos.

Con los datos obtenidos (Ct) en el equipo Applied Biosystems StepOne™ se calculó la expresión de cada citocina (gen) en cada muestra, mediante el método comparativo de Ct desarrollado por PE Applied Biosystems (Applied Biosystems, 2004); para esto se aplicó la siguiente fórmula: Expresión del gen = $2^{-\Delta\Delta Ct}$, donde:

$\Delta\Delta Ct$: ΔCt muestra - ΔCt control negativo

ΔCt muestra: Ct gen (en la muestra) - Ct β-actina (en la muestra)

ΔCt control negativo: Ct gen (en el control negativo) - Ct β-actina (en el control negativo)

3.4. TÉCNICAS E INSTRUMENTOS

Se recolectó los datos obtenidos en el equipo de PCR en tiempo real Applied Biosystems StepOne™ sobre la cuantificación absoluta de *T. cruzi* y la cuantificación relativa de

citocinas para generar una base de datos en Excel 2013 y así determinar la parasitemia en coágulo, carga parasitaria en tejido cardíaco y la expresión génica de citocinas en tejido cardíaco.

De igual manera se recolectó los datos de absorbancias obtenidas en el lector de microplacas de ELISA VersaMax™ y fueron analizados por el software SoftMax® Pro para el dosaje de citocinas en suero, con lo que se generó una base de datos.

Los resultados fueron expresados como la media aritmética \pm desviación estándar y fueron evaluados con la prueba Mann Whitney para analizar la significancia estadística de datos no paramétricos entre las cepas Arequipa y CLBrenner, por lo que se usó el programa GraphPad Prism InStat3 con un intervalo de confianza del 95% ($p < 0,05$).

3.5. ASPECTOS ÉTICOS

El manejo de los animales de experimentación fue llevado a cabo de acuerdo a las directrices del Comité de Ética de la Universidad Peruana Cayetano Heredia con código SIDISI N° 64977 para el trabajo con ratones C57BL/6.

CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DICUSIÓN

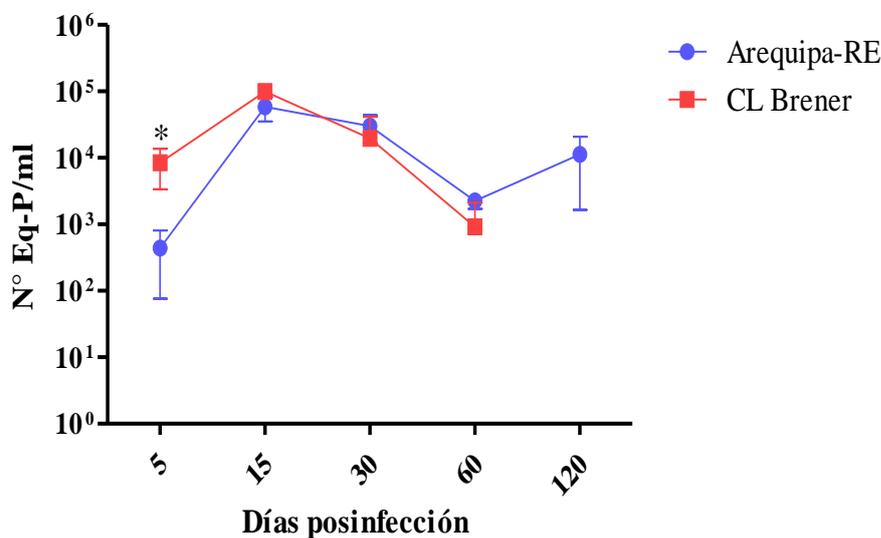
4.1. RESULTADOS

4.1.1. Parasitemia en ratones C57BL/6 infectados con las cepas Arequipa y CL Brener de *T. cruzi*.

Los niveles de parasitemia, mostrados en la Figura 10, fueron detectables para ambos grupos de ratones infectados con cada cepa de *T. cruzi* a partir de los 5 días posinfección, donde se observó una diferencia significativa ($p < 0.05$) entre la cepa Arequipa (441.3 ± 210.8 equivalente parásito/ml) y CL Brener (8511.3 ± 2974.1 Eq. P/ml) y alcanzaron su nivel máximo a los 15 días posinfección. Sin embargo, uno de los grupos de ratones infectados con la cepa CL Brener no sobrevivieron a la infección para su evaluación a los 120 días posinfección.

Figura 10

*Parasitemia de *T. cruzi* en coágulo de ratones C57BL/6 infectados con las cepas Arequipa y CL Brener*



Nota. Un asterisco (*) indica la diferencia estadísticamente significativa a niveles de $p < 0.05$ (Prueba Mann Whitney).

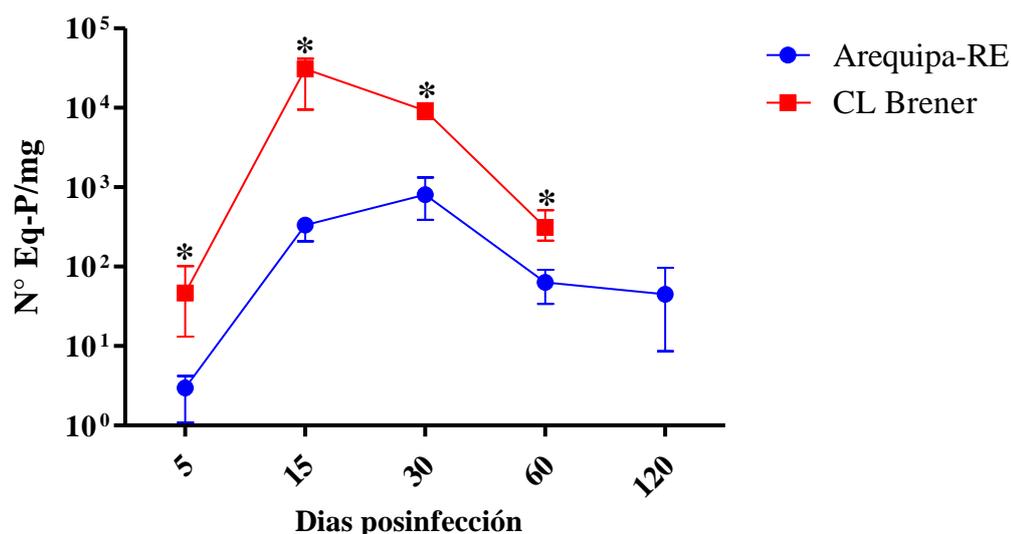
Estos resultados fueron obtenidos en base a las curvas estándares de la qPCR en tiempo real que tuvieron una eficiencia de 89.416% y 96.413% para la cepa Arequipa y CL Brener respectivamente (Anexo 3), en las que el límite de cuantificación fue de 1 Eq. P/ml.

4.1.2. Carga parasitaria en tejido cardíaco de ratones C57BL/6 infectados con las cepas Arequipa y CL Brener de *T. cruzi*.

En los resultados de carga parasitaria mostrados en la Figura 11 se observó una diferencia significativa ($P < 0.05$) a los 5, 15, 30 y 60 días posinfección entre la cepa Arequipa ($2,6 \pm 0,5$; $322,8 \pm 30,85$; $829,3 \pm 157,5$ y $63,4 \pm 9,1$ Eq. P/mg; respectivamente) y CL Brener ($52,8 \pm 16,2$; $28037,8 \pm 4759,9$; $8826 \pm 520,7$ y $331,4 \pm 48,1$ Eq. P/mg; respectivamente) donde el máximo nivel fue a los 30 días posinfección para la cepa Arequipa y a los 15 días posinfección para la cepa CL Brener.

Figura 11

Carga parasitaria de T. cruzi en tejido cardíaco de ratones C57BL/6 infectados con la cepa Arequipa y CL Brener.



Nota. Un asterisco (*) indica la diferencia estadísticamente significativa a niveles de $p < 0.05$ (Prueba Mann Whitney).

Estos resultados fueron obtenidos en base a las curvas estándares de la qPCR en tiempo real que tuvieron una eficiencia de 93.303% y 91.055% para la cepa Arequipa y CL Brener respectivamente (Anexo 4), en el que el límite de cuantificación fue 2.5 equivalentes parásitos (Eq. P) para ambas cepas de *T. cruzi*.

4.1.3. Niveles séricos de citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias en ratones C57BL/6 infectados con *T. cruzi*.

Se obtuvo niveles séricos de INF- γ solamente en los 15 días posinfección para los ratones infectados con la cepa CL Brener de *T. cruzi* (34.28 ± 29.59 pg/ml) el cual se muestra en la Figura 12.A.

En los resultados para IL-12 mostrados en la Figura 12.B, se observó niveles séricos a los 5 y 15 días posinfección para ambas cepas, pero sin diferencias significativas; además se obtuvo resultados a los 60 días posinfección solo para la cepa Arequipa (1.94 ± 4.43 pg/ml).

Para TNF α , los resultados observados en la Figura 12.C fueron detectables a los 5 días posinfección solo ante la infección por la cepa Arequipa (1.35 ± 4.7 pg/ml); y a los 15, 30 y 60 días posinfección en ambas cepas, pero sin diferencias significativas.

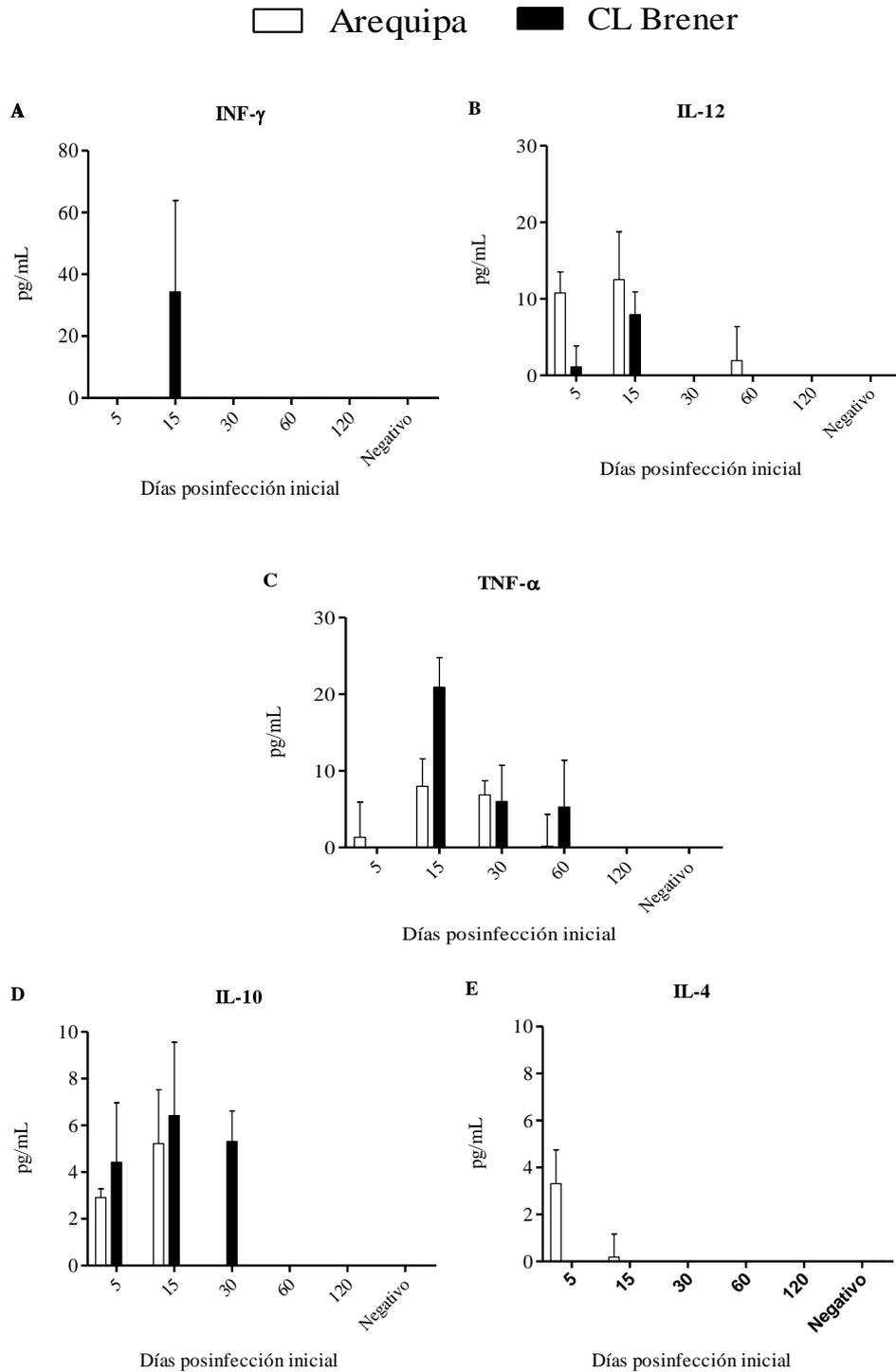
Los niveles séricos de IL-10 mostrados en la Figura 12.D tuvieron diferencias significativas a los 5 y 15 días posinfección entre ambas cepas de *T. cruzi*; y a los 30 días posinfección solo fueron detectables para la cepa CL Brener (5.31 ± 1.31 pg/ml).

Para IL-4, se observó niveles séricos a los 5 y 15 días posinfección solo ante la infección por la cepa Arequipa (3.32 ± 1.44 y 0.19 ± 0.98 pg/ml respectivamente), tal como se muestra en la Figura 12.E.

Estos resultados fueron obtenidos en referencia a las curvas estándares generadas mediante el ELISA sándwich, las cuales mostraron niveles aceptables de confiabilidad (R²) de 0.9933, 0.9774, 0.9884, 0.9974 y 0.9963 para INF- γ , IL-12, TNF α , IL-10 e IL-4 respectivamente (Anexo 5).

Figura 12

Niveles séricos de citocinas en ratones C57BL/6 infectados con la cepa Arequipa y CL Brener



Nota. Las barras blancas muestran los niveles séricos de citocinas antes de la infección por *T. cruzi* cepa Arequipa y las barras negras antes de la infección por la cepa CL Brener, entre las cuales no se encontró diferencia estadísticamente significativa con la Prueba Mann Whitney para las citocinas proinflamatorias INF- γ (A), IL-12 (B), TNF- α (C) y las citocinas antiinflamatorias IL-10 (D) e IL-4 (E).

4.1.4. Niveles de expresión génica de citocinas proinflamatoria y antiinflamatorias en tejido cardíaco de ratones C57BL/6 infectados con *T. cruzi*.

Los niveles de expresión obtenidos en la cuantificación relativa por PCR en tiempo real que se muestran en la Figura 13.A, tuvieron diferencia significativa ($p < 0,05$) en la expresión de INF- γ a los 5, 15, 30 y 60 días posinfección entre las cepas Arequipa ($1,43 \pm 0,49$; $17,21 \pm 2,21$; $52,26 \pm 4,95$ y $25,38 \pm 1,59$; respectivamente) y CL Brener ($0,35 \pm 0,14$; $175,1 \pm 29,98$; $88,11 \pm 5,35$ y $50,27 \pm 4,80$; respectivamente).

En los resultados mostrados en la Figura 13.B sobre la expresión de IL-12, no se observó diferencias significativas a los 15 y 60 días posinfección entre ambas cepas; sin embargo, a los 5 días posinfección se observó una diferencia significativa ($p < 0,05$), con mayor expresión de esta citocina para la cepa Arequipa ($2,07 \pm 0,41$) comparada con la cepa CL Brener ($0,32 \pm 0,08$); contrariamente, a los 30 días posinfección se observó una diferencia significativa ($p < 0,05$), con menor expresión de la citocina para la cepa Arequipa-RE ($0,83 \pm 0,08$) comparada con la cepa CL Brener ($1,40 \pm 0,06$).

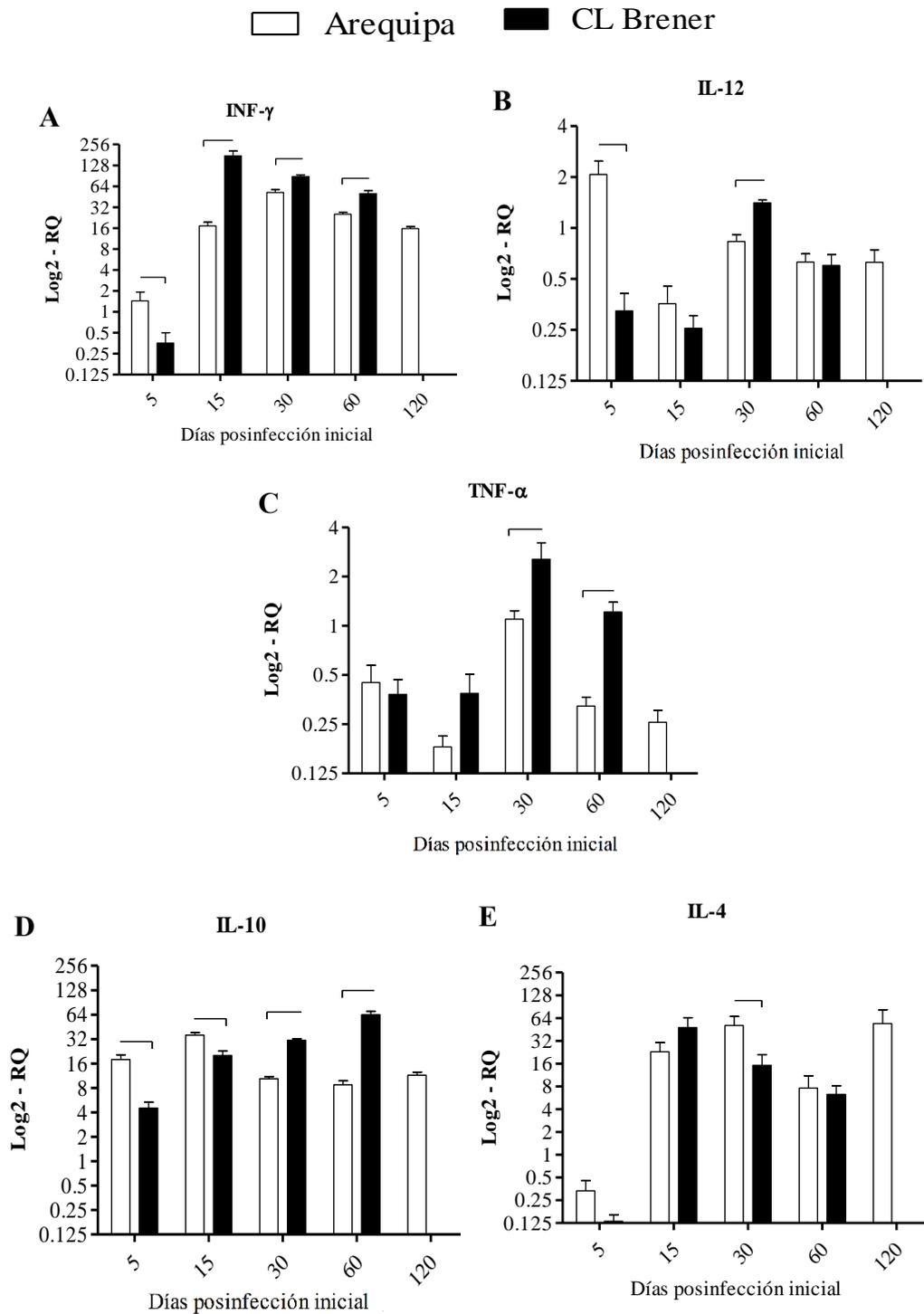
En cuanto a la expresión de TNF- α , se observa en la Figura 13.C que a los 5 y 15 días posinfección no hubo diferencias significativas; contrariamente, a los días 30 y 60 días posinfección se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$), con menor expresión de esta citocina para la cepa Arequipa ($1,09 \pm 0,13$ y $0,32 \pm 0,04$; respectivamente) comparada con la cepa CL Brener ($2,55 \pm 0,66$ y $1,21 \pm 0,18$; respectivamente).

En la expresión de IL-10, se observó diferencias significativas ($p < 0,05$) a los 5 y 15 días posinfección, con mayor expresión de la citocina para la cepa Arequipa ($17,96 \pm 2,48$ y $35,83 \pm 2,62$; respectivamente) comparada con la cepa CL Brener ($4,51 \pm 0,80$ y $20,15 \pm 2,66$; respectivamente); contrariamente, se observó diferencias significativas ($p < 0,05$) a los 30 y 60 días posinfección, con menor expresión de la citocina para la cepa Arequipa ($10,35 \pm 0,72$ y $8,75 \pm 1,05$, respectivamente) comparada con la cepa CL Brener ($30,90 \pm 1,40$ y $63,93 \pm 6,14$, respectivamente) tal como se observa en la Figura 13.D.

Para la citocina IL-4, se detectó sobreexpresión con diferencias significativas solo a los 30 días posinfección, siendo significativamente mayor para la cepa Arequipa ($51,07 \pm 16,20$) en comparación con la cepa CL Brener ($15,18 \pm 5,84$) así como se observa en la Figura 13.E.

Figura 13

Expresión génica de citocinas en tejido cardíaco de ratones C57BL/6 infectados con la cepa Arequipa y CL Brener



Nota. La línea conectora representa la diferencia significativa a niveles de $p < 0.05$ (Prueba Mann Whitney) entre las cepas de *T. cruzi* Arequipa (barra blanca) y CL Brener (barra negra) en cuanto a la expresión de las citocinas proinflamatorias INF- γ (A), IL-12 (B), TNF- α (C) y las citocinas antiinflamatorias IL-10 (D) e IL-4 (E) medidas en cantidad de moléculas de cDNA.

4.2. DISCUSIÓN

La presente investigación se desarrolló usando el modelo animal de ratón para la enfermedad de Chagas; un modelo experimental previamente evaluado en diferentes cepas de ratones (BALB/c y C57BL/6) que reproduce las fases aguda y crónica de la enfermedad, las formas clínicas observadas en humanos (especialmente la miocardiopatía) y ha demostrado ser una buena base experimental para estudios de la respuesta inmune ante diferentes cepas del agente infeccioso; todo esto con el fin de entender el papel del parásito y el huésped en el desarrollo de la enfermedad.

Tomando como referencia los estudios previos (Ayo et al., 2015; Desquesnes y De Lana, 2010; Pereira et al., 2014; Planelles et al., 2003) se eligió ratones hembra C76BL/6 por presentar mayor resistencia ante la infección con cepas muy virulentas de *T. cruzi*. Es así que se pudo trabajar bajo condiciones controladas para comparar la parasitemia, carga parasitaria en tejido cardíaco y la síntesis de citocinas, durante la infección por las cepas de *T. cruzi* Arequipa y CL Brener (DTU TcI y TcVI, respectivamente). Ambos DTUs fueron previamente determinados en los ensayos de genotipificación realizados por Valencia (2017) durante el proyecto Convenio N°119-2015-FONDECYT.

Después del inicio de la infección experimental en los ratones C57BL/6, se evaluó la cantidad de parásitos circulantes en diferentes puntos de tiempo mediante cuantificación absoluta por PCR en tiempo real, para lo cual se obtuvo curvas estándares con eficiencias aceptables según Pirón et al. (2007) para cada cepa de *T. cruzi*. Con esto se encontró que la parasitemia fue significativamente menor solo a los 5 días para la cepa Arequipa en comparación con la cepa CL Brener lo cual se muestra en la Figura 10.

Ambos grupos de ratones infectados mostraron elevación de la parasitemia hasta alcanzar el nivel más alto a los 15 días posinfección y luego fue disminuyendo; no obstante, los ratones infectados con la cepa CL Brener (TcVI) murieron antes de llegar al último día de evaluación; en cambio, los individuos infectados con la cepa Arequipa (TcI) sobrevivieron hasta los 120 días posinfección. Estos resultados coinciden con otros estudios en modelos experimentales como el de Ferreira et al. (2018), Gil Jaramillo et al. (2016), Mateus et al. (2019) y Yoshida (2006), donde se ha observado el aumento progresivo de la parasitemia durante una infección aguda y su posterior regulación en la fase crónica.

Aunque se sabe que los ratones C57BL/6 son más resistentes a la infección por *T. cruzi*, su respuesta ante la enfermedad puede variar debido a los diferentes linajes genéticos (DTU) del parásito, es así que Ferreira et al. (2018) y Gil Jaramillo et al. (2016) también mencionan

la menor capacidad patogénica de TcI en comparación con otros DTUs, resaltando a TcVI como una cepa altamente infecciosa, ya sea en ensayos *in vitro* e *in vivo*.

La menor capacidad infectiva de *Trypanosoma cruzi* del DTU TcI en comparación con TcVI, mencionada en los trabajos de Gil –Jaramillo et al. (2016) y Ferreira et al. (2018), también se demostró en el presente estudio con los resultados obtenidos sobre carga parasitaria en el tejido cardíaco de los ratones C57BL/6. Haciendo uso de la cuantificación absoluta por PCR en tiempo real se encontró que durante todos los puntos de tiempo comparados las cantidades de Eq. P/ml fueron significativamente más bajas ($p < 0.05$) en los ratones infectados por la cepa Arequipa (TcI) que en los infectados con la cepa CL Brener (TcVI) tal como se observa en la Figura 11; además, a la cepa Arequipa le tomó más tiempo llegar a su nivel más alto de carga parasitaria (30 días posinfección) que a la cepa CL Brener (15 días posinfección).

Después de los picos altos de carga parasitaria en tejido cardíaco, al igual que en los estudios de Ferreira et al. (2018), se observó una disminución progresiva, lo que indica una tendencia, por parte del hospedero, de controlar la infección; aunque los ratones infectados con la cepa CL Brener no lograron sobrevivir hasta el último día de evaluación.

Para entender la respuesta del hospedero ante la infección por *T. cruzi* fue necesario evaluar los niveles de citocinas ya que, en el presente estudio, aunque se observó aumento y posterior disminución de la cantidad de parásitos en sangre periférica y en tejido cardíaco para ambos grupos de estudio, los ratones infectados con la cepa CL Brener no resistieron la infección.

En estudios del modelo animal de ratón ante la infección por *T. cruzi*, realizados por Talvani et al. (2000) con la cepa Colombiana, Ferreira et al. (2018) con las cepas G (TcI) y CL Brener (TcVI), y Mateus et al. (2019) con la cepa Y (TcII), indican que, incluso a niveles bajos, la sola presencia del parásito es componente esencial de inflamación durante la fase crónica de la enfermedad de Chagas, ocasionando sobre expresión de citocinas proinflamatorias, tales como INF- γ , IL-12 y TNF- α , para controlar la replicación del parásito; además de una posterior sobreexpresión de citocinas antiinflamatorias como IL-4 e IL-10 para modular la inflamación, cuyos niveles dependían de la cepa infectante.

La evaluación de los niveles séricos de citocinas en el trabajo de Ferrerira (2018) evidenció un incremento de INF- γ en ratones C57BL/6 infectados con la cepa CLBrener a los 2 días posinfección y la posterior producción continua de IL-10 estuvo relacionada a los altos niveles de parásitos, independientemente de la cepa de *T. cruzi*. De manera similar, un incremento de INF- γ se observó en este estudio solo para CL Brener a los 15 días

posinfección, lo cual se puede observar en la Figura 12.A; en cuanto a IL-10 la producción solo fue hasta los 30 días posinfección para la misma cepa (Figura 12. D). Sin embargo, la producción continua fue observada para TNF- α (Figura 12.C), lo que también estaría relacionada con la presencia de parásitos, indicando que no se llegó a controlar el perfil inflamatorio. Esto es perjudicial, porque según Pereira et al. (2014), el aumento de los niveles plasmáticos del factor de necrosis tumoral (TNF) está relacionado con el grado de disfunción ventricular izquierda en pacientes con miocardiopatía chagásica crónica (CCC).

En trabajos con el tejido cardíaco del modelo animal de ratón para la enfermedad Chagas, como el de Talvani et al. (2000), encontraron altos niveles en la expresión de ARNm de la citocina proinflamatoria IFN- γ durante los primeros días de infección por la cepa Colombina TcI, el cual fue decayendo con el tiempo y estuvo relacionado con el control de la carga parasitaria; también menciona que estos niveles altos fueron mostrados en el trabajo de Zhang y Tarleton (1996) con la cepa de Brasil.

Los resultados del trabajo *in vitro* de Valencia (2017), con las cepas Arequipa TcI y CL Brener TcVI, indican que la producción de óxido nítrico (NO) y especies reactivas de oxígeno (EROs), encargados de controlar al parásito, estarían siendo promovidas por la expresión de IFN- γ . Estos hallazgos concuerdan con los resultados del presente estudio en tejido cardíaco, ya que también hubo aumento en los niveles de IFN- γ durante los primeros días de la infección, pero con un mínimo declive durante los siguientes días evaluados, siendo significativamente menores ante la infección por *T. cruzi* cepa Arequipa y mayores para CL Brener. Además, la cinética de esta citocina coincidió con el aumento y disminución de la carga parasitaria en ambas cepas (Figura 13.A y Figura 11), evidenciando su efecto controlador en la replicación de *T. cruzi* en el tejido cardíaco de los ratones infectados.

En estudios como los de Andrade (1999) y Gil-Jaramillo et al. (2016) se mencionan que IL-12 es otro aspecto importante relacionado a la infección por *T. cruzi* para linajes de ratones resistentes, ya que la administración de esta citocina potenció la respuesta de células CD4 del tipo Th-1, lo que dio como resultado la producción de INF- γ , IL-2 y TNF- α y, por consiguiente, provocó una reducción en la parasitemia de animales infectados.

Específicamente en tejido cardíaco de ratones C57BL/6, Talvani et al. (2000) encontró un aumento en la expresión de IL-12 a los 15 días posinfección y su disminución a niveles basales durante los siguientes días de infección por la cepa colombiana TcI. En este estudio, al igual que los resultados obtenidos para INF- γ , la sobreexpresión de IL-12 fue detectable a partir de los 5 días posinfección y también fue significativamente mayor para la cepa

Arequipa en comparación con la cepa CL Brener; situación que se invirtió, entre ambas cepas, a los 30 días post infección (Figura. 13.A y B) pero mantuvo bajos niveles de sobre expresión, lo que indica una estimulación constante para la producción de las otras citocinas proinflamatorias.

En cuanto a la citocina TNF- α , Talvani et al. (2000) demostraron sus altos niveles de expresión a los 15 días posinfección el cual siguió siendo detectable por encima de los valores control, incluso en los 120 días, cuando se controló el infiltrado inflamatorio, todo esto en el tejido cardíaco infectado por la cepa colombiana TcI. Al analizar sus resultados, ellos indicaron que fueron consistentes con previos hallazgos donde demostraron elevada expresión de TNF- α durante la enfermedad de Chagas crónica en humanos.

A diferencia de la cepa colombiana, la sobreexpresión de TNF- α , en el tejido cardíaco de los ratones evaluados durante el presente estudio, fue detectable en todos los días evaluados, siendo significativamente menor para la cepa Arequipa en comparación con la cepa CL Brener, lo cual coincidió con sus niveles altos de carga parasitaria en ambas cepas (Figura 13.C) evidenciando el perfil proinflamatorio no regulado y el constante riesgo de daño cardíaco.

Además, Mateus et, al. (2019) también relacionaron la producción de TNF- α con la infección crónica en ratones y mencionó una asociación entre las células productoras de esta citocina en muestras de corazón y plasma de pacientes con complicaciones cardíacas severas durante la cardiomiopatía chagásica crónica, ya que esta sobre expresión no es controlada por las citocinas antiinflamatorias; además, Ferreira et al. (2018) indicaron que las características relacionadas con la cepa pueden influir en el desarrollo de la enfermedad, esto da entender que la muerte del grupo de ratones infectados por la cepa CL Brener, puede estar relacionado con la sobreexpresión de TNF- α acompañado de, la también sobre expresada citocina proinflamatoria, INF- γ ; las cuales eran detectables aunque la carga parasitaria haya disminuido en los últimos días evaluados (Figura 11).

Otro aspecto importante evaluado en el presente estudio, fue la expresión de citocinas antiinflamatorias, ya que, como lo menciona Curtin et al. (2009), tienen la capacidad para inhibir y controlar la producción de citocinas proinflamatorias. Es así que, Talvani et al. (2000) presenta hallazgos sobre la expresión al alza de citocinas antiinflamatorias, como IL-4 e IL-10, en el tejido cardíaco de animales infectados con la cepa colombiana (TcI) e indica que ocurre lo mismo con otra cepa de Brasil durante la fase crónica de la enfermedad de Chagas. De igual manera, se detectó la sobreexpresión de IL-4 durante todos los días de infección para las cepas evaluadas en el presente proyecto, y la expresión al alza de IL-10

para la cepa CL Brener siendo significativamente menor para la cepa Arequipa a los 30 y 60 días posinfección (Figura 13.D).

Sin embargo, aunque se conoce que IL-10 está involucrado en la regulación de los procesos inflamatorios, parece indicar que en este estudio no ejercieron eficientemente su función reguladora ya que las citocinas se mantuvieron sobre expresadas, principalmente para la cepa CL Brener cuyo grupo de 120 días posinfección no sobrevivió.

Finalmente, en el presente estudio en el modelo animal con una cepa peruana de *T. cruzi*, el hecho de observar un perfil proinflamatorio constante en tejido cardiaco evidencia lo igual de perjudicial que es la cepa Arequipa para un portador humano a nivel del daño cardiaco que puede sufrir.

CONCLUSIONES

La parasitemia fue significativamente menor ($p < 0.05$) solo a los 5 días posinfección y la carga parasitaria en tejido cardíaco fue significativamente menor durante todos los días posinfección en los ratones C57BL/6 infectados con *T. cruzi* cepa Arequipa en comparación con los infectados por la cepa CL Brener.

Los niveles séricos de la citocina INF- γ solo se detectaron a los 15 días posinfección en los ratones C57BL/6 infectados con *T. cruzi* cepa CL Brener. No se observó diferencia significativa para la citocina IL-12, TNF- α e IL-10 entre los ratones infectados por la cepa Arequipa y CL Brener. Los niveles de IL-4 solo fueron detectados a los 5 y 15 días posinfección en los ratones infectados por la cepa Arequipa de *T. cruzi*.

Los niveles de expresión génica en tejido cardíaco para la citocina INF- γ fueron significativamente menores solo a los 15, 30 y 60 días posinfección; para IL-12 solo a los 30 días posinfección y para TNF- α e IL-10 solo a los 30 y 60 días posinfección en los ratones C57BL/6 infectados con *T. cruzi* cepa Arequipa en comparación con los infectados por la cepa CL Brener. Para IL-4 se observó diferencia significativa solo a los 30 días posinfección, pero con mayores niveles para la cepa Arequipa en comparación con la cepa CL Brener.

RECOMENDACIONES

1. Para futuros ensayos en el modelo animal de la enfermedad de Chagas, se sugiere incluir un mayor número de ratones por grupo y realizar la evaluación de su supervivencia ante la infección por *T. cruzi* dependiendo de la cepa a trabajar.
2. Para una mejor conservación de las muestras de suero de ratones que se usarán en la determinación de citocinas de futuras investigaciones, se recomienda agregar inhibidores de proteasas.
3. Para complementar los resultados en el modelo animal de la enfermedad de Chagas, se sugiere evaluar la inflamación del tejido cardíaco mediante métodos histológicos y correlacionarlo con los datos de expresión de citocinas.

REFERENCIAS

- Andrade, Z. (1999). Immunopathology of Chagas Disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 94, 71-80. <https://doi.org/10.1590/S0074-02761999000700007>
- Ayo, C., Reis, P., Dalalio, M., Visentainer, J., Oliveira, C., de Araújo, S., de Oliveira, D. y Sell, C. (2015) Killer Cell Immunoglobulin-like Receptors and Their HLA Ligands are Related with the Immunopathology of Chagas Disease. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 9(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003753>
- Azambuja, P., Ratcliffe, N., y Garcia E. (2005). Towards an understanding of the interactions of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* within the reduviid insect host *Rhodnius prolixus*. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 77(3), 397-404. DOI: 10.1590/s0001-37652005000300004
- Applied Biosystems. (2004). *Guide to Performing Relative Quantitation of Gene Expression Using Real-Time Quantitative PCR* [Archivo PDF]. <https://biotech.illinois.edu/sites/biotech.illinois.edu/files/uploads/Guide%20to%20relative%20quantitation.pdf>
- Boster Antibody and Elisa Experts. (s.f.). *ELISA Handbook* [Archivo PDF]. <https://www.bosterbio.com/>
- Brisse, S., Verhoef, J. y Tibayrenc, M. (2001). Characterisation of large and small subunit rRNA and mini-exon genes further supports the distinction of six *Trypanosoma cruzi* lineages. *International Journal for Parasitology*, 31(11), 1218-1226. DOI: 10.1016/s0020-7519(01)00238-7
- Burgos, J., Altchek, J., Bisio, M., Duffy, T., Valadares, H., Seidenstein, M., Piccinali, R., Freitas, J., Levin, M., Macchi, L., Macedo, A., Freilij, H. y Schijman, A. (2007). Direct molecular profiling of minicircle signatures and lineages of *Trypanosoma cruzi* bloodstream populations causing congenital Chagas disease. *International Journal for Parasitology*, 37(12), 1319-1327. DOI: 10.1016/j.ijpara.2007.04.015
- Chaves, A., Silva, J., Araújo, J., Teixeira, F., Silvestre, K., Gomes, R., Gazzinelli, P., de Souza, E., Morato, M., Fujiwara, R., da Costa, M. y Correa, R. (2016). Immunoregulatory mechanisms in Chagas disease: modulation of apoptosis in T-cell mediated immune responses. *BMC Infectious Diseases*, 16(1), 191. <https://doi.org/10.1186/s12879-016-1523-1>

- Cura, C. (2014). *Desarrollo, estandarización y aplicación de tipificación molecular de poblaciones de Trypanosoma cruzi en muestras clínicas, vectores y reservorios de la enfermedad de Chagas*. [Tesis de Doctorado. Universidad De Buenos Aires]. http://repositorioubi.sisbi.uba.ar/gsd/cgi-bin/library.cgi?a=d&c=posgraafa&cl=CL1&d=HWA_818.
- Curtin, N., Mills, K., H. y Connor, T. (2009). Psychological stress increases expression of IL-10 and its homolog IL-19 via β -adrenoceptor activation: Reversal by the anxiolytic chlordiazepoxide. *Brain, Behavior, and Immunity*, 23(3), 371–379. DOI: 10.1016/j.bbi.2008.12.010
- De Andrade, M. F., de Almeida, V. D., de Souza, L. M. S., Paiva, D. C. C., de Mesquita Andrade, C., y de Medeiros Fernandes, T. (2018). Involvement of Neutrophils in Chagas Disease Pathology. *Parasite Immunology*, 40(12). DOI: 10.1111/pim.12593
- De Araujo, T., Telleria, J. y Rios-Dalenz, J. (2010). Chapter 1. History of the Discovery of American Trypanosomiasis (Chagas Disease). En Tibayrens, M. y Telleria, J. (Eds.), *American Trypanosomiasis Chagas Disease: One Hundred Years of Research* (pp. 3-23). Elsevier.
- De Lana, M. y Marques, E. (2010). Chapter 14: Biology of *Trypanosoma cruzi* and Biological Diversity. En Tibayrens, M. y Telleria, J. (Eds.), *American Trypanosomiasis Chagas Disease: One Hundred Years of Research* (39-363). Elsevier.
- De Souza, W., Ulisses, T. y Santos, B. (2010). Chapter 16. Ultrastructure of *Trypanosoma cruzi* and Its Interaction with Host Cells. En Tibayrens, M. y Telleria, J. (Eds.), *American Trypanosomiasis Chagas Disease: One Hundred Years of Research* (394-432). Elsevier.
- Desquesnes, M. y De Lana. M. (2010). Chapter 12: Veterinary Aspects and Experimental Studies. En Tibayrens, M. y Telleria, J. (Eds.), *American Trypanosomiasis Chagas Disease: One Hundred Years of Research* (277-317). Elsevier.
- Dorn, P., McClure, A., Gallaspy, M., Waleckx, E., Woods, A., Monroy, M. y Stevens, L. (2017). The diversity of the Chagas parasite, *Trypanosoma cruzi*, infecting the main Central American vector, *Triatoma dimidiata*, from Mexico to Colombia. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 11(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005878>
- DPDx - Laboratory Identification of Parasites of Public Health Concern. (2004). *Identificación de parásitos de importancia en salud pública, Trypanosomiasis americana*.

<https://www.mcdinternational.org/trainings/malaria/spanish/dpdx/HTML/TrypanosomosisAmericana>.

- Evident. (2021). *Rhesus Monkey Kidney Epithelial Cells (LLC-MK2 Line)*. Olympus Life Science solutions. <https://www.olympus-lifescience.com/es/microscope-resource/galleries/confocal/cells/llcmk2/llcmk2sb0/>
- Ferreira, B., Ferreira, É., De Brito, M., Salu, B., Oliva, M., Mortara, R. y Oriksa, C. (2018). BALB/c and C57BL/6 Mice Cytokine Responses to *Trypanosoma cruzi* Infection Are Independent of Parasite Strain Infectivity. *Frontiers in Microbiology*, 9(553). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00553>
- Gil-Jaramillo, N., Motta, F., Favali, C., Bastos, I. y Santana, J. (2016). Dendritic Cells: A Double-Edged Sword in Immune Responses during Chagas Disease. *Frontiers in Microbiology*, 7(1076). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01076>
- Gulati, K., Guhathakurta, S., Joshi, J., Rai, N. y Ray, A. (2016). Cytokines and their Role in Health and Disease: A Brief Overview. *MOJ Immunol*, 4(2), 2-9. DOI: 10.15406/moji.2016.04.00121
- Herwaldt, B., Dougherty, C., Allen, C., Jolly, J., Brown, M., Yu, P. y Yu, Y. (2018). Characteristics of Patients for Whom Benznidazole Was Released Through the CDC-Sponsored Investigational New Drug Program for Treatment of Chagas Disease - United States, 2011-2018. *MMWR. Morbidity and mortality weekly report*, 67(29), 803-805. DOI: 10.15585/mmwr.mm6729a3.
- Hontebeyrie, M., Truyens, C. y Breniere, S. (2010). Chapter 25: Pathological Consequences of Host Response to Parasite. En Tibayrens, M. y Telleria, J. (Eds.), *American Trypanosomiasis Chagas Disease: One Hundred Years of Research* (669-690). Elsevier.
- Hummon, A., Lim, S., Difilippantonio, M. y Ried, T. (2007). Isolation and solubilization of proteins after TRIzol® extraction of RNA and DNA from patient material following prolonged storage. *BioTechniques*, 42(4), 467-472. DOI: 10.2144/000112401
- Instituto Nacional del Cáncer. (2022). *Diccionarios del NCI de los Institutos Nacionales de la Salud de EE. UU.* <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionarios>
- Kouadjo, K., Nishida, Y., Cadrin-Girard, J. et al. (2007). Housekeeping and tissue-specific genes in mouse tissues. *BMC Genomics*, 8 (127). DOI: 10.1186/1471-2164-8-127

- Llano, M., Pavía, P., Flórez, A., Cuéllar, A., González, J. y Puerta, C. (2014). Evaluación preliminar de la prueba comercial Chagas (*Trypanosoma cruzi*) IgG-ELISA® en individuos colombianos. *Biomédica*, 34(2), 28-36. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i2.1580>
- Lomonosoff, G. y Ponndorf, D. 2021. Biotechnology Approaches to Modern Vaccine Design en Encyclopedia of Virology. En Bamford, D. y Zuckerman, M. (Eds.), *Encyclopedia of Virology* (4ta ed., pp. 662-670). Elsevier.
- López, M., Rivera, M., Viettri, M., Lares, M., Morocoima, A., Herrera, L. y Ferrer, E. (2014). Comparación de dos protocolos de extracción de ADN de *Trypanosoma cruzi* cultivados en medio axénico. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 31(2).
- Mateus, J., Guerrero, P., Lasso, P., Cuervo, C., González, J., Puerta, C. y Cuéllar, A. (2019). An Animal Model of Acute and Chronic Chagas Disease With the Reticulotropic Y Strain of *Trypanosoma cruzi* That Depicts the Multifunctionality and Dysfunctionality of T Cells. *Front. Immunol*, 10, 918. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00918>
- Merriam Webster 2022. *Medical Dictionary*, <https://www.merriam-webster.com/>
- Miles, M., Llewellyn, M., Lewis, M., Yeo, M., Baleela, R., Fitzpatrick, S., Gaunt, M. y Mauricio, I. (2009). The molecular epidemiology and phylogeography of *Trypanosoma cruzi* and parallel research on Leishmania: looking back and to the future. *Parasitology*, 136(12), 1509-1528. DOI: 10.1017/S0031182009990977
- Ministerio de Salud. (2021). *Número de casos de enfermedad de Chagas, Perú 2000 – 2021* [Archivo PDF]. <https://www.dge.gob.pe/portal/docs/vigilancia/sala/2021/SE11/chagas.pdf>
- Moncayo, A. y Silveira, A. (2010). Chapter 4: Current Trends and Future Prospects for Control of Chagas Disease En Tibayrens, M. y Telleria, J. (Eds.), *American Trypanosomiasis Chagas Disease: One Hundred Years of Research* (55-82). Elsevier.
- Náquira, C. y Cabrera, R. (2009). Breve reseña histórica de la Enfermedad de Chagas, a cien años de su descubrimiento y situación actual en el Perú. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, 26(4).
- Náquira, C., Huapaya, P., Espinoza, Y. y Vega, S. (2001). *Enfermedad De Chagas* [Archivo PDF]. http://bvs.minsa.gob.pe/local/OGEI/796_MS-OGI109.pdf

- National Human Genome Research Institute - NIH. (2020). *Knockout Mice Fact Sheet*.
<https://www.genome.gov/about-genomics/fact-sheets/Knockout-Mice-Fact-Sheet>
- Nogueira, N., Gonzalez, M., Gomes, J., de Souza, W., Garcia, E., Azambuja, P., Nohara, L., Almeida, I., Zingales, B. y Colli, W. (2007). *Trypanosoma cruzi*: Involvement of glycoinositolphospholipids in the attachment to the luminal midgut surface of *Rhodnius prolixus*. *Experimental Parasitology*, 116(2), 120-128. DOI: 10.1016/j.exppara.2006.12.014
- Opal, S. y DePalo, V. (2000). Anti-Inflammatory Cytokines. *Chest*, 117(4), 1162–1172. DOI: 10.1378/chest.117.4.1162
- Organización Mundial de la Salud. (2021). *La enfermedad de Chagas (Tripanosomiasis Americana)*. [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))
- Padilla, C., Alvarado, U., Ventura, G. et al. (2017). Detección de unidades discretas de tipificación de *Trypanosoma cruzi* en triatomíneos recolectados en diferentes regiones naturales de Perú. *Biomédica*, 37(2), 167-179. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v37i0.3559>
- Pedra, Y., Barbosa, J., Bombac, A., Dantas, L., Gibaldi, D., Vilar, G., dos Santos, H., Ramos, I., Silva, N., Moreira, O., Lannes, J. y Menna, R. (2021) Physical Exercise Promotes a Reduction in Cardiac Fibrosis in the Chronic Indeterminate Form of Experimental Chagas Disease. *Frontiers in Immunology*. 12. 712034. doi: 10.3389/fimmu.2021.712034
- Pereira, I., Vilar-Pereira, G., Silva, A., Moreira, O., Britto, C., Sarmiento, E. et al. (2014). Tumor Necrosis Factor Is a Therapeutic Target for Immunological Unbalance and Cardiac Abnormalities in Chronic Experimental Chagas Heart Disease. *Mediators of Inflammation*, 2014, 1-16. DOI: 10.1155/2014/798078
- Pereira, I., Vilar-Pereira, G., Silva, A. y Lannes-Vieira, J. (2014). Severity of chronic experimental Chagas' heart disease parallels tumour necrosis factor and nitric oxide levels in the serum: models of mild and severe disease. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 109(3), 289–298. DOI: 10.1590/0074-0276140033
- Piron, M., Fisa, R., Casamitjana, N., López, P., Puig, L., Vergés, M. et al. (2007). Development of a real-time PCR assay for *Trypanosoma cruzi* detection in blood samples. *Acta Tropica*, 103(3), 195-200. DOI: 10.1016/j.actatropica.2007.05.019

- Planelles, L., Thomas, M., Maranon, C., Morell, M. y Lopez, M. (2003). Differential CD86 and CD40 co-stimulatory molecules and cytokine expression pattern induced by *Trypanosoma cruzi* in APCs from resistant or susceptible mice. *Clinical and Experimental Immunology*, 131(1), 41-47. DOI: 10.1046/j.1365-2249.2003.02022.x
- Qiagen. (2022). *What is the threshold cycle or Ct value?*
<https://www.qiagen.com/kr/resources/faq?id=783d4566-9ad9-4fab-9936-182beda65617&lang=en>
- R&D Systems. (2017). Mouse IFN-gamma DuoSet ELISA DY485-05. Disponible en: https://www.rndsystems.com/products/mouse-ifn-gamma-duoset-elisa_dy485
- R&D Systems. (2017). Mouse TNF-alpha DuoSet ELISA DY410-05. https://www.rndsystems.com/products/mouse-tnf-alpha-duoset-elisa_dy410 [accesado el 30 de julio 2017].
- R&D Systems. (2017). Mouse IL-10 DuoSet ELISA DY417-05. https://www.rndsystems.com/products/mouse-il-10-duoset-elisa_dy417
- R&D Systems. (2017). Mouse IL-12/IL-23 p40 Allele-specific DuoSet ELISA. https://www.rndsystems.com/products/mouse-il-12-il-23-p40-allele-specific-duoset-elisa_dy499
- R&D Systems. (2017). Mouse IL-4 DuoSet ELISA DY404-05. https://www.rndsystems.com/products/mouse-il-4-duoset-elisa_dy404
- Song, H. y Hwang, D. (2017). Use of C57BL/6N mice on the variety of immunological researches. *Laboratory Animal Research*. 33(2), 119–123 (2017). <https://doi.org/10.5625/lar.2017.33.2.119>
- Tamay, D., Ibarra, C. y Velasquillo, C. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en Discapacidad*. 2(2), 70-78.
- Talvani, A., Ribeiro, C., Aliberti, J., Michailowsky, V., Santos, P., Murta, S., Romanha, A., Almeida, I., Farber, J., Lannes-Vieira, J., Silva, J. y Gazzinelli, R. (2000). Kinetics of cytokine gene expression in experimental chagasic cardiomyopathy: tissue parasitism and endogenous IFN- γ as important determinants of chemokine mRNA expression during infection with *Trypanosoma cruzi*. *Microbes and Infection*, 2(8), 851-866. DOI: 10.1016/s1286-4579(00)00388-9

- Thermo Fisher Scientific Inc. (2010). *ELISA technical guide and protocols*.
<http://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/TR0065-ELISA-guide.pdf>
- ThermoFisher Scientific, (2022). *Technical note: Properties of Absorbance and Turbidimetric Scattering Measurements in Photometry*.
<https://www.thermofisher.com/pe/en/home/life-science/cell-analysis/cell-analysis-learning-center/cell-analysis-resource-library/cell-analysis-application-notes/absorbance-turbidimetric-scattering-photometry.html>
- Valencia, E. (2017). *Caracterização da capacidade patogênica de Trypanosoma cruzi isolado em Arequipa - área endêmica do Peru*. [Tesis de Doctorado, Universidade Federal de Minas Gerais].
- Valencia, E., Rodrigues, G., Araujo, M., Calderon, M., Jimenez, J., Venuto, A., Gazzinelli, R., Ynocente, R., Vidal, A., Hincapie, R., Finn, M. y Marques, A. (2020). C57BL/6 α -1,3-Galactosyltransferase Knockout Mouse as an Animal Model for Experimental Chagas Disease. *ACS Infectious Diseases*, 6(7), 1807–1815. DOI: 10.1021/acsinfecdis.0c00061
- Wainszelbaum, M. (2002). *Trypanosoma cruzi: Mecanismos reguladores de la metaciclogenesis*. [Tesis de Doctorado, Universidad de Buenos Aires]. digital.bl.fcen.uba.ar
- Yoshida, N. (2006). Molecular basis of mammalian cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *Anais da Academia Brasileira de Ciencias*, 78(1), 87-111. DOI: 10.1590/s0001-37652006000100010
- Yoshida, N. (2009). Molecular mechanisms of *Trypanosoma cruzi* infection by oral route. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104(1), 101-107. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762009000900015>
- Zingales, B., Miles, M., Campbell, D., Tibayrenc, M., Macedo, A., Teixeira, M., Schijman, A., Llewellyn, M., Lages-Silva, E., Machado, C., Andrade, S. y Sturm, N. (2012). The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: Rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infection, Genetics and Evolution*, 12(2), 240-253. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.12.009>
- Zhang, L. y Tarleton, R. (1996). Characterization of cytokine production in murine *T. cruzi* infection by in situ immunocytochemistry: lack of association between susceptibility and type 2 cytokine production. *Eur. J. Immunology*, 26, 102-109. DOI: 10.1002/eji.1830260116

ANEXOS

ANEXO 1: Protocolos para la preparación de los medios de cultivo utilizadas en cultivo celular.

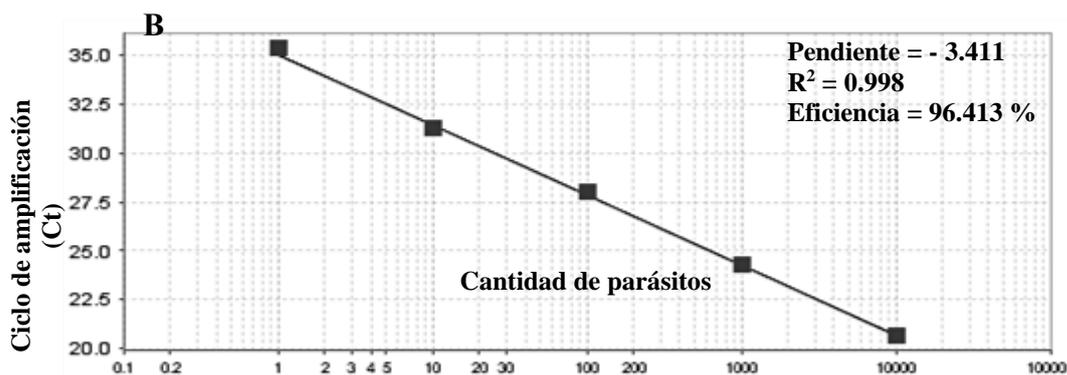
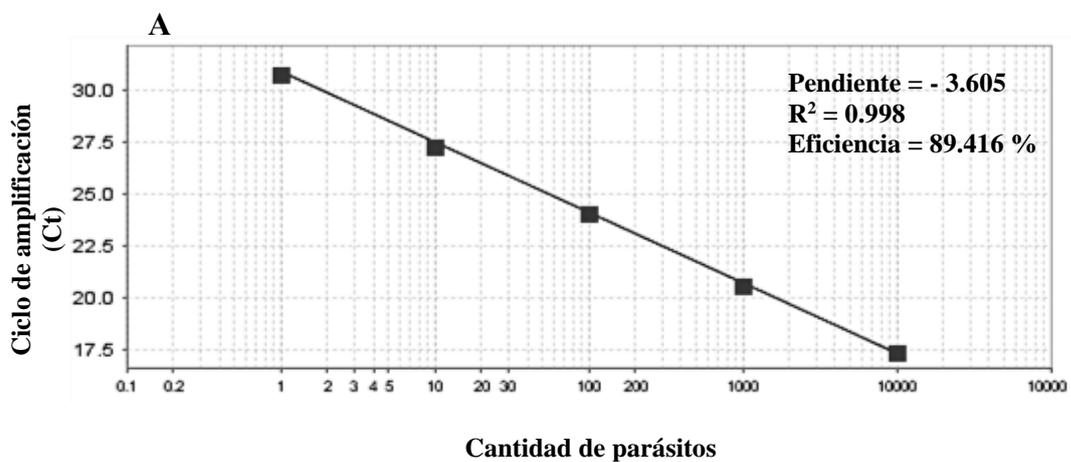
- A) Medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI):** Diluir 10 g de RPMI (Gibco™), 2 g de bicarbonato de sodio, 5.95 g (25 mM) de Hepes, 2,5 ml de gentamicina (80mg/2ml), 1 000 000 UI de bencilpenicilina en agua destilada y enrazar a 1L. Verificar y corregir el pH a 7.4. En cabina de flujo laminar, filtrar el medio en una unidad de filtración estéril con membrana 0.22 µm Millipore®, suplementar al 10% de Suero fetal bovino (SFB) y conservar estéril a 4°C.
- B) Medio Liver Infusion Triptose (LIT):** Diluir 4 g (0,4%) de NaCl, 0.4 g (0,04%) de KCl, 8 g (0,8%) de Na₂HPO₄, 2 g (0,2%) de glucosa, 5 g (0,5%) de triptosa y 5 g (0,5%) de Liver infusion broth en agua destilada y enrazar a 1 L. Verificar y corregir el pH a 7.2 para luego esterilizar en autoclave 120 °C, 15 libras de presión durante 15 min. En cabina de flujo laminar, suplementar al 10% SFB, 2,5 ml de gentamicina (80mg/2ml), 1 000 000 UI de bencilpenicilina y conservar estéril a 4°C.

ANEXO 2: Pasos de extracción de ARN según el método TRIzol®.

1. Prepara la cabina de flujo laminar y los materiales, limpiando las superficies con alcohol 70% y RNase away. Dejar en UV por 30min.
2. Del tejido guardado en RNAlater, separar 25 mg y colocarlo en un tubo limpio de microcentrifuga (2 ml eppendorf) con 1ml de reactivo TRIzol®. Triturar el tejido con un homogenizador de energía.
3. Realizar spin e incubar a temperatura ambiente por 5min,
4. Añadir 0.2ml de cloroformo por 1ml de reactivo TRIzol® usado en la homogenización y agitar enérgicamente por 15 segundo e incubar por 2-3 minutos a temperatura ambiente.
5. Centrifugar a 12 000g por 15min a 4°C. Nota: Se forman tres fases; la inferior contiene fenol-cloroformo, la interfase, y la superior es la fase acuosa con el ARN (600ul aprox.)
6. Transferir la fase acuosa, inclinando el tubo a 45° y pipeteado, a un tubo limpio. Nota: La interfase se puede utilizar para extracción de ADN el cual se puede guardar a 4°C durante la noche.
7. Añadir 0.5ml de isopropanol al 100% por 1ml de TRIzol® usado en la homogenización; homogenizar con la mano e incubar a temperatura ambiente por 10min.
8. Centrifugar a 12 000g por 10min a 4°C
9. Eliminar el sobrenadante, decantando con cuidado sin dejar caer el pellet.

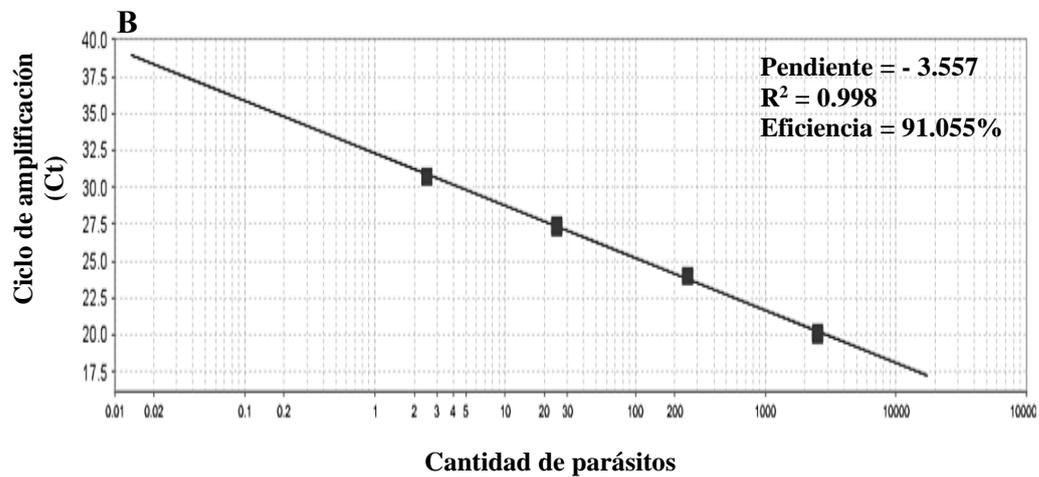
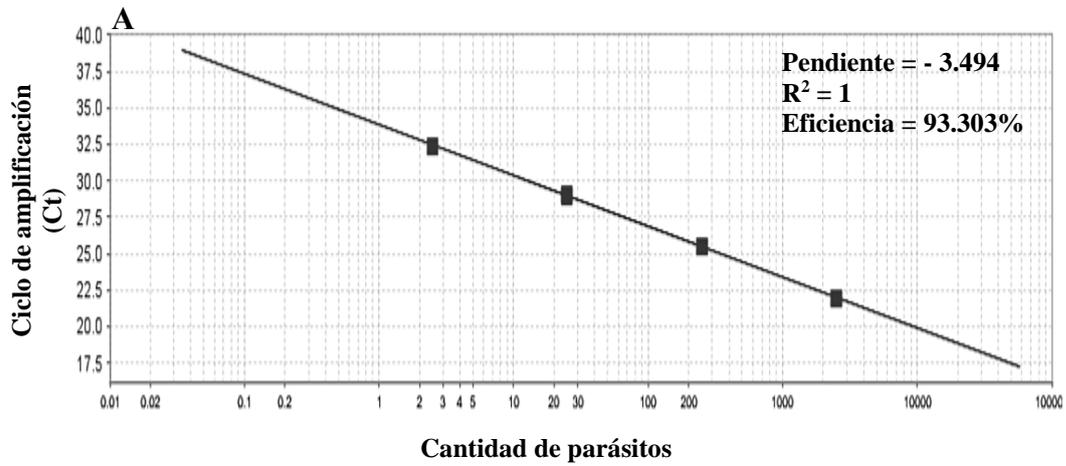
10. Lavar el pellet con 1ml de etanol 75%. Nota: se puede almacenar por 1 año a 20°C o 1 semana a 4°C.
11. Homogenizar brevemente en vortex, centrifugar a 7500g por 5min a 4°C.
12. Desechar sobrenadante. Nota: Evitar que el pellet se seque por completo porque podría perder solubilidad.
13. Resuspender el pellet de ARN en 50uL de agua libre de RNasa o solución de SDS al 0.5%.
Nota: No disolver en SDS al 0.5% si se ha de utilizar en reacciones enzimáticas subsiguientes.
14. Incubar en baño maria o bloque de calor entre 55-60°C por 10-15min. y almacenar a -70°C.

ANEXO 3: Curvas estándares en la PCR tiempo real para cuantificación de *T. cruzi* en coágulo



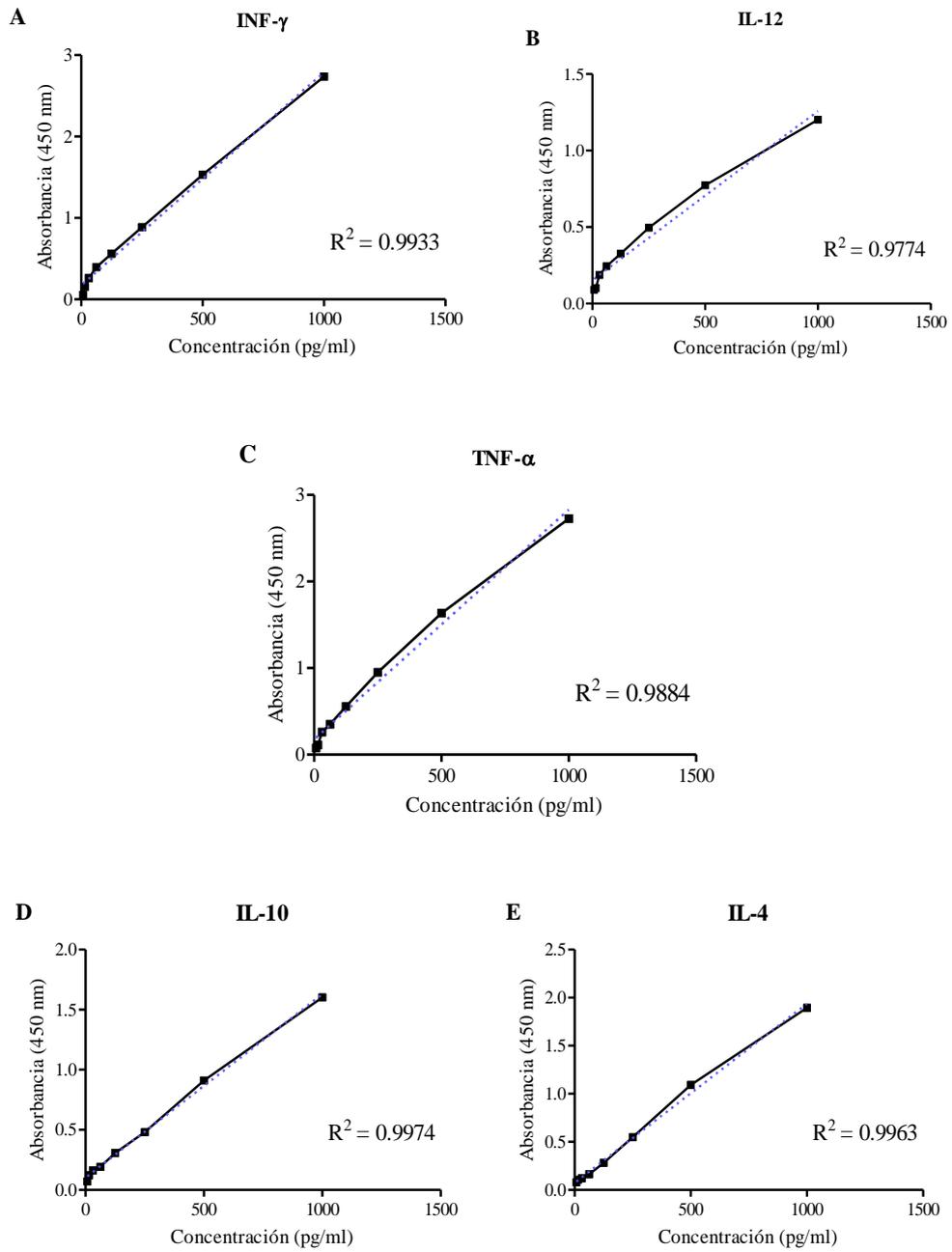
Nota. Los puntos representan las diluciones sucesivas (1 a 10000 Eq. P/ml) detectadas por la PCR en tiempo real para la cepa Arequipa (A) y CL Brener (B), donde se muestran los resultados de linealidad (Pendiente), confiabilidad (R^2) y eficiencia de la amplificación.

ANEXO 4: Curvas estándares en la PCR tiempo real para para cuantificación de *T. cruzi* en tejido cardíaco.



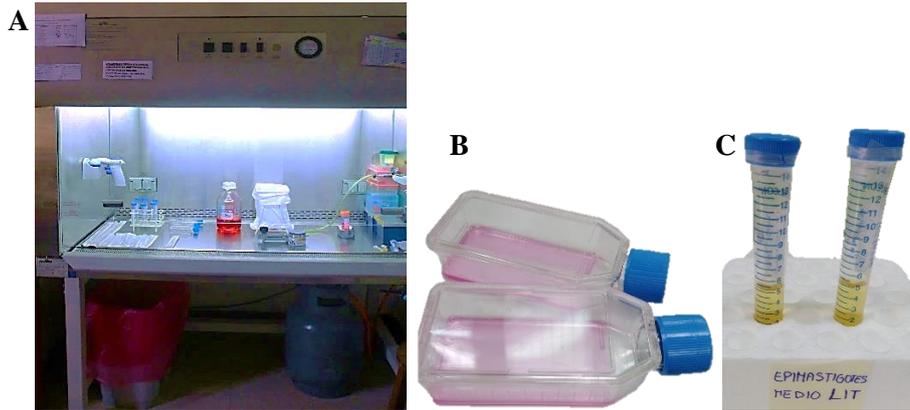
Nota. Los puntos representan las diluciones sucesivas (2.5 a 2500 Eq-P) detectadas por la PCR en tiempo real para la cepa Arequipa (A) y CL Brener (B), donde se muestran los resultados de linealidad (Pendiente), confiabilidad (R²) y eficiencia de la amplificación.

ANEXO 5: Curvas estándares de citocinas en ELISA sándwich.



Nota. Los puntos representan las diluciones sucesivas (15.625 a 1000 pg/ml) detectadas por la prueba de ELISA sándwich para las citocinas proinflamatorias INF- γ (A), IL-12 (B) y TNF- α (B) y, y para las citocinas antiinflamatorias IL-10 (D) e IL-4 (E); donde se muestran los resultados de confiabilidad (R^2).

ANEXO 6: Imágenes del trabajo en cultivo celular.



Materiales estériles de cultivo *in vitro*: A) Cabina de flujo laminar. B) Frascos con medio RPMI para cultivo de células LLC-MK2 y tripomastigotes. C) Tubos con medio LIT para cultivo de epimastigotes.



Línea celular LLC-MK2 en cultivo *in vitro* con medio RPMI observada a 10x en microscopio invertido.



Tripomastigotes de *Trypanosoma cruzi* intracelulares en cultivo *in vitro* con medio RPMI observados a 20x en microscopio invertido.



Epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* en cultivo *in vitro* con medio LIT observados a 20x en microscopio invertido.

ANEXO 7: Fórmula de conversión de fuerza g a rpm y viceversa.

$$\text{Fuerza g (RCF)} = (\text{rpm})^2 \times 1.118 \times 10^{-5} \times r$$

$$\text{rpm} = \sqrt{[\text{RCF}/(r \times 1.118)] \times 1 \times 10^5}$$

Donde:

g = Fuerza centrífuga relativa

r = Radio del rotor (cm)

rpm = Revoluciones por minuto

RCF = Fuerza centrífuga relativa

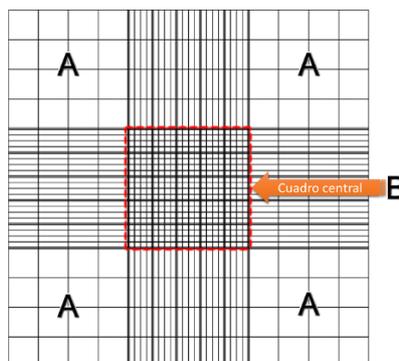
ANEXO 8: Fórmula para el recuento de epimastigotes *T. cruzi* en Cámara de Neubauer.

$$N \times 10^4 \times F \text{ Parásitos/ml}$$

Donde:

N = Número de parásitos en los 25 cuadrados de la parte central de la Cámara Neubauer.

F = Factor de dilución o contracción



ANEXO 9: Recuento de epimastigotes de *T. cruzi* en Cámara de Neubauer.



ANEXO 10: Inoculación de tripomastigotes de *T. cruzi* vía intraperitoneal de ratones C57BL/6.



ANEXO 11: Secuencia del análisis estadístico seguido en el programa GraphPad Prism Instat3.

1. Colocación de datos obtenidos de parasitemia, carga parasitaria, niveles séricos y expresión génica de citocinas según los días posinfección.

The first screenshot shows a 'Table format: Grouped' table with columns for 'A:Y1', 'A:Y2', 'A:Y3', 'B:Y1', 'B:Y2', and 'B:Y3'. The data is as follows:

		A: Arequipa			B: CL Brener		
		A:Y1	A:Y2	A:Y3	B:Y1	B:Y2	B:Y3
1	5	-11.153850	-16.923080	-14.153850	-13.923080	-11.500000	-5.384615
2	15	-11.192310	-1.076923	-8.192307	-13.961540	28.730770	88.076920
3	30	-17.153850	-21.846150	-20.692310	-12.076920	-13.942310	-21.923080
4	60	-19.346150	-32.961540	-32.384620	-26.576920	-23.230770	-21.115390
5	120	-8.923077	-31.846150	-26.153850			
6	Negativo	-17.807690	-22.057690	-20.750000	-19.038460	-21.076920	
7	Title						

The second screenshot shows a table with columns A through H, representing different experimental groups and time points. The data is as follows:

	A: Arequipa	B: CL Brener	C: control	D: Title	E: Title	F: Title	G: Title	H: Title
	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
1	-11.153850	-13.923080	-17.807690					
2	-16.923080	-11.500000	-22.057690					
3	-14.153850	-5.384615	-20.750000					
4			-19.038460					
5			-21.076920					
6								
7								

2. Obtención de medias aritméticas y desviación estándar.

GraphPad Prism - [INF-g ELISA.pzfRow stats of INF-g all]

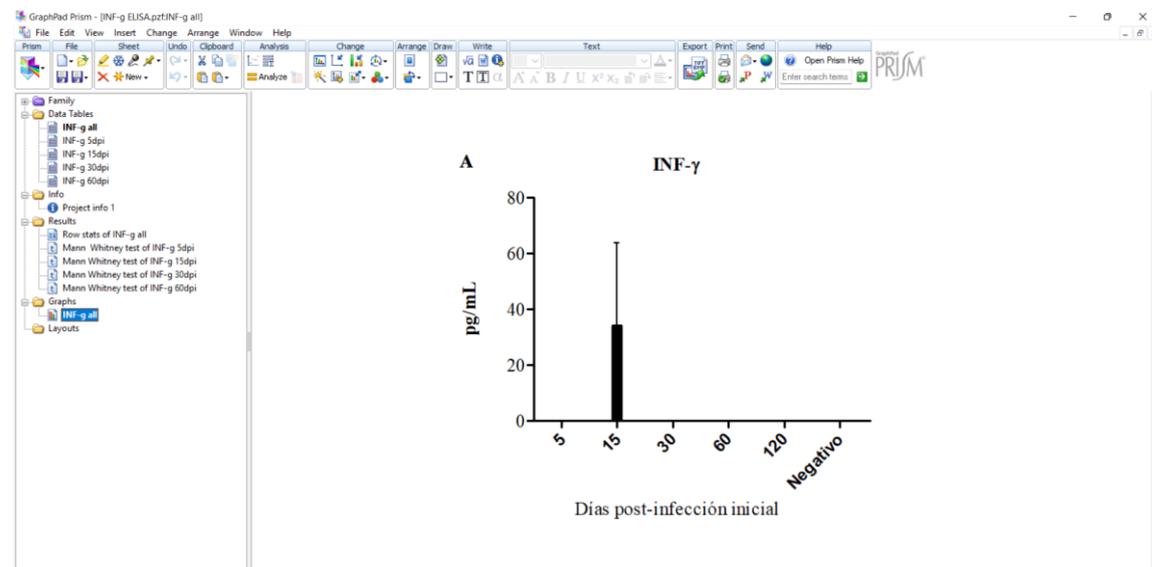
		A			B			C			D		
		Arequipa			CL Brener			Data Set-C			Title		
	x	Mean	SEM	N	Mean	SEM	N	Mean	SEM	N	Mean	SEM	N
1	5	-14.077	1.666	3	-10.269	2.541	3						
2	15	-6.821	3.000	3	34.282	29.586	3						
3	30	-19.897	1.412	3	-15.981	3.020	3						
4	60	-28.231	4.445	3	-23.641	1.590	3						
5	120	-22.308	6.891	3									
6													
7													
8													

3. Selección de la prueba Mann Whitney para determinación de diferencias estadísticas según los días posinfección.

GraphPad Prism - [INF-g ELISA.pzfMann Whitney test of INF-g 5dpi]

		t test	
1	Table Analyzed	INF-g 5dpi	
2	Column A	Arequipa	
3	vs	vs	
4	Column B	CLBrener	
5			
6	Mann Whitney test		
7	P value	0.4000	
8	Exact or approximate P value?	Exact	
9	P value summary	ns	
10	Are medians signif. different? (P < 0.05)	No	
11	One- or two-tailed P value?	Two-tailed	
12	Sum of ranks in column A,B	8 , 13	
13	Mann-Whitney U	2.000	
14			
15			
16			

4. Selección del tipo de gráfico.



ANEXO 12: Resumen del análisis estadístico obtenido en el programa GraphPad Prism Instat3.

RESULTADOS CUANTIFICACION CLOI, TEJIDO, CITOCINAS EXPRESION Y ELISASs (Modo de compatibilidad) - Excel

Inicio ses.

Archivo Inicio Insertar Disposición de página Fórmulas Datos Revisar Vista Ayuda ¿Qué desea hacer?

Cortar Copiar Copiar formato Portapapeles Fuente Alineación Número Formato Dar formato Estilos de condicional como tabla celda Insertar Eliminar Formato Celdas Autosuma Rellenar Ordenar y filtrar Buscar y seleccionar Edición

P23

PARASITEMIA						
COAGULO	Arequipa-RE			CL Brener		
Dpi	Mean	SEM	n	Mean	SEM	n p value (P < 0.05)
5	441.3406	210.8125	3	8511.264	2974.095	3 0.0022
15	58412.77	13354.69	3	99183.46	12736.86	3 0.2000
30	30070.51	7880.054	3	19668.3	12540.84	3 0.7000
60	2240.494	310.1964	3	913.4296	699.1829	3 0.4000
120	11232.1	5534.72	3			

CARGA PARASITARIA EN TEJIDO CARDIACO						
CORAZON	Arequipa-RE			CL Brener		
Dpi	Mean	SEM	n	Mean	SEM	n p value (P < 0.05)
5	2.646719	0.5154286	3	52.82924	16.25981	3 0.0022
15	322.8269	30.85143	3	28037.83	4759.967	3 0.0022
30	829.3071	157.5437	3	8826.734	520.7398	3 0.0022
60	63.49306	9.192983	3	331.4818	48.13557	3 0.0022
120	49.35185	17.38781	3			

RESULTADOS CUANTIFICACION CLOI, TEJIDO, CITOCINAS EXPRESION Y ELISASs (Modo de compatibilidad) - Excel

Inicio ses.

Archivo Inicio Insertar Disposición de página Fórmulas Datos Revisar Vista Ayuda ¿Qué desea hacer?

Cortar Copiar Copiar formato Portapapeles Fuente Alineación Número Formato Dar formato Estilos de condicional como tabla celda Insertar Eliminar Formato Celdas Autosuma Rellenar Ordenar y filtrar Buscar y seleccionar Edición

T49

NIVELES SÉRICOS DE CITOCINAS						
INF-g	Arequipa			CL Brener		
	Mean	SEM	n	Mean	SEM	n p value (P < 0.05)
5	-14.07692	1.665878	3	-10.26923	2.5405	3 0.4000
15	-6.820513	2.999534	3	34.28205	29.58645	3 0.7000
30	-19.89744	1.411654	3	-15.98077	3.019557	3 0.7000
60	-28.23077	4.445429	3	-23.64103	1.589899	3 0.7000
120	-22.30769	6.891094	3			

IL-10	Arequipa			CL Brener		
	Mean	SEM	n	Mean	SEM	n p value (P < 0.05)
5	2.911111	0.3738356	3	4.422222	2.536353	3 0.7000
15	5.222222	2.302119	3	6.422222	3.131757	3 1.0000
30	-7.711111	1.731766	3	5.311111	1.308849	3 0.1000
60	-10.1	5.561907	3	-1.133333	0.7190529	3 0.7000
120	-7.666667	5.323881	3			

IL-12	Arequipa			CL Brener		
	Mean	SEM	n	Mean	SEM	n p value (P < 0.05)
5	10.75758	2.763563	3	1.121212	2.731982	3 0.2000
15	12.51515	6.245954	3	7.931818	2.972527	3 0.7000
30	-1.666667	7.235003	3	-2.30303	1.337459	3 0.7000
60	1.939394	4.427666	3	-7.363636	5.233659	3 0.2000
120	-5.242424	3.723329	3			

IL-4	Arequipa			CL Brener		
	Mean	SEM	n	Mean	SEM	n p value (P < 0.05)
5	3.316667	1.437687	3	-6.716667	1.043733	3 0.1000
15	0.19	0.9819878	3	-4.843333	1.316667	3 0.1000
30	-3.586667	1.17076	3	-3.353333	0.033334	3 0.7000
60	-4.21	2.143463	3	-3.543333	1.365556	3 1.0000
120	-2.753334	3.100561	3			

TNF-a	Arequipa			CL Brener		
	Mean	SEM	n	Mean	SEM	n p value (P < 0.05)
5	1.345679	4.577101	3	-1.506173	1.700525	3 0.7000
15	7.987655	3.580502	3	20.89506	3.868026	3 0.1000
30	6.851851	1.862684	3	6.024691	4.684482	3 0.7000
60	0.1728396	4.150591	3	5.283951	6.114527	3 0.7000
120	-7.08642	3.803852	3			

RESULTADOS CUANTIFICACION CLOI, TEJIDO, CITOCINAS EXPRESION Y ELISASs (Modo de compatibilidad) - Excel

Inicio ses.

Archivo Inicio Insertar Disposición de página Fórmulas Datos Revisar Vista Ayuda ¿Qué desea hacer?

Cortar Copiar Copiar formato Portapapeles Fuente Alineación Número Formato Dar formato Estilos de condicional como tabla celda Insertar Eliminar Formato Celdas Autosuma Rellenar Ordenar y filtrar Buscar y seleccionar Edición

T49

NIVELES DE EXPRESION GÉNICA DE CITOCINAS						
INF-g	Arequipa-RE			CL Brener		
	Mean	SEM	n	Mean	SEM	n p value (P < 0.05)
5	1.434575	0.496794	3	0.3585626	0.1450764	3 0.0152
15	17.21276	2.214783	3	175.1576	29.98909	3 0.0022
30	52.26876	4.950007	3	88.11012	5.353402	3 0.0022
60	25.38477	1.595918	3	50.27004	4.801571	3 0.0022
120	15.77025	1.059791	3			

IL-10	Arequipa-RE			CL Brener		
	Mean	SEM	n	Mean	SEM	n p value (P < 0.05)
5	17.96371	2.487167	3	4.512563	0.8047808	3 0.0022
15	35.83834	2.625568	3	20.15722	2.663036	3 0.0043
30	10.35045	0.725673	3	30.90909	1.46923	3 0.0022
60	8.756568	1.05034	3	63.9814	6.146516	3 0.0022
120	11.50456	1.021259	3			

IL-12	Arequipa-RE			CL Brener		
	Mean	SEM	n	Mean	SEM	n p value (P < 0.05)
5	2.075034	0.4095623	3	0.3240318	0.0863506	3 0.0022
15	0.3568208	0.0964719	3	0.2552094	0.0483268	3 0.3939
30	0.8328999	0.0799927	3	1.406808	0.0595986	3 0.0022
60	0.6285398	0.0748929	3	0.5999353	0.0985327	3 0.9372
120	0.6276678	0.115631	3			

IL-4	Arequipa-RE			CL Brener		
	Mean	SEM	n	Mean	SEM	n p value (P < 0.05)
5	0.3342384	0.1201557	3	0.1319723	0.0283447	3 0.132
15	23.02962	7.333713	3	47.92172	16.73606	3 0.3095
30	51.07485	16.20287	3	15.17746	5.837874	3 0.0411
60	7.622657	3.46977	3	6.299466	1.859026	3 0.8182
120	54.27747	27.85035	3			

TNF-a	Arequipa-RE			CL Brener		
	Mean	SEM	n	Mean	SEM	n p value (P < 0.05)
5	0.4493608	0.1241038	3	0.3807556	0.0877127	3 0.6991
15	0.1814748	0.0304841	3	0.3863553	0.1190042	3 0.3939
30	1.097105	0.1389705	3	2.553684	0.6609101	3 0.0152
60	0.3226544	0.0423632	3	1.215186	0.1826754	3 0.0022
120	0.2567564	0.0479003	3			

ANEXO 13: Definición y operacionalización de variables

Comparación de los niveles séricos y de expresión génica de citocinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias en ratones infectados experimentalmente con dos cepas de <i>Trypanosoma cruzi</i>						
Variable		Definición teórica	Dimensiones	Definición operacional	Indicadores	Índices
VARIABLE INDEPENDIENTE	Cepas de <i>T. cruzi</i>	Protozooario genéticamente variable que ocasiona la Enfermedad de Chagas (Cura, 2014).	Tipo de DTU	<i>T. cruzi</i> cepa Arequipa y CL Brener	Tipo de DTU determinado por genotipificación previa	TcI y TcVI
	Niveles séricos de citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias.	Glicoproteínas de bajo peso molecular (30 kDa) presentes en el suero que se encargan de señalar la respuesta inmune (Gulati et al., 2016).	Cantidad de citocinas detectadas en el suero de ratones infectados con <i>T. cruzi</i>	Glicoproteínas producidas para señalar la respuesta inmune ante la infección por <i>T. cruzi</i> .	Absorbancias obtenidas en la técnica de ELISA para citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias.	Pg/ml
VARIABLES DEPENDIENTES	Niveles de expresión génica de citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias en tejido cardíaco.	Niveles de ARN mensajero transcritos para la posterior formación de citocinas (Cura, 2014; Gulati et al., 2016).	Niveles de ARNm detectadas en el tejido cardíaco de ratones infectados con <i>T. cruzi</i>	ARN mensajero codificante de citocinas que influyen en la respuesta inmune del tejido cardíaco ante la infección por <i>T. cruzi</i> .	Ct obtenidos en la cuantificación relativa por RT-PCR en tiempo real para citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias.	Diferencia de Ct entre ratones sanos e infectados