

**Detección de la presencia de *Trypanosoma cruzi* en un modelo murino de
infección aguda y crónica establecido en el Laboratorio de Parasitología
Molecular**



Paula Andrea Guerrero Jaramillo

Pontificia Universidad Javeriana

Facultad de ciencias

Bogotá D.C

2017

**Detección de la presencia de *Trypanosoma cruzi* en un modelo murino de
infección aguda y crónica establecido en el Laboratorio de Parasitología
Molecular**

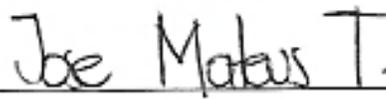
Paula Andrea Guerrero Jaramillo

Trabajo de grado para optar al título de
Bacterióloga



Adriana Cuéllar Ávila; M.Sc; Ph.D.

Directora



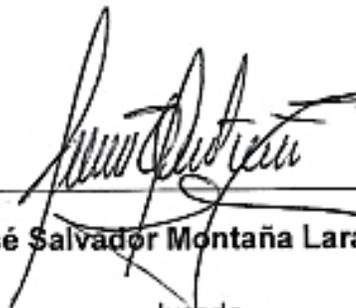
José Yesid Mateus Triviño; M.Sc.

Asesor



Adriana Pulido Villamarín; M.Sc.

Jurado



José Salvador Montaña Lara; Ph.D.

Jurado

NOTA DE ADVERTENCIA

Artículo 23 de la Resolución N° 13 de Julio de 1946.

“La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velará por qué no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y por que las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”

A Dios por llenarme de sabiduría e inteligencia, por darme su mano en cada etapa de mi vida.

A mí familia. especialmente a mi ejemplo de persistencia, mi madre, todo mi cariño y amor para ustedes. Por ser quienes siempre me brindan incondicionalmente su apoyo y por confiar en mí en cada instante.

A mis maestros que han formado parte de mi crecimiento profesional.

A mis amigos incondicionales, mis más profundos agradecimientos por acompañarme, escucharme y motivarme durante este camino.

AGRADECIMIENTOS

Al Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación (Colciencias) por la financiación del presente trabajo.

Quisiera hacer extensiva mi gratitud a la Dr. Adriana Cuéllar y a José Mateus. A la Dra. Adriana Cuéllar por darme la oportunidad de encaminarme en este proyecto de grado lleno de enseñanzas valiosas que perduraran por siempre. A José Mateus por su ayuda incondicional y acompañamiento durante este proceso, pero sobre todo por su enorme paciencia en los momentos más difíciles. A los dos por tener las palabras adecuadas que aportaron a mi formación personal como profesional.

A la Dra. Claudia Cuervo por tener el tiempo para guiarme durante este trabajo. A todos los miembros del Laboratorio de Parasitología Molecular, los cuales llevaré en mi corazón y estaré eternamente agradecida.

A los miembros del Comité Organizador de la Segunda Reunión Leishmaniasis y Enfermedad de Chagas de la Universidad de los Andes por permitirme aprovechar este espacio para enriquecer mi aprendizaje.

RESUMEN

La enfermedad de Chagas es una afección causada por el protozoo flagelado intracelular *Trypanosoma cruzi*. La enfermedad cursa con una fase aguda y una fase crónica. La fase aguda se caracteriza con una parasitemia alta en sangre periférica y en la mayoría de los individuos, suele ser asintomática o con sintomatología inespecífica. En ausencia de tratamiento, los pacientes no logran eliminar el parásito y evolucionan a una fase crónica indeterminada, caracterizada por una parasitemia baja en sangre periférica. Posteriormente, cerca del 20 al 30 % de los individuos pasan a una fase crónica determinada con manifestaciones cardíacas, digestivas o mixtas, las cuales dependen de la zona geográfica, la genética del hospedero o el parásito (1, 2).

T. cruzi es un parásito genéticamente variable. Esta variabilidad ha sido ampliamente estudiada con la intención de correlacionar la biología, la genética y la bioquímica del parásito (3). En modelos animales experimentales de infección y en humanos infectados con *T. cruzi*, se ha demostrado que los parásitos aislados de diferentes órganos en diferentes individuos son genéticamente distintos, lo que sugiere que la variabilidad genética de los aislados del parásito, podría explicar las diversas manifestaciones clínicas de la enfermedad de Chagas y las diferencias en morbilidad y mortalidad observadas en diferentes áreas geográficas (4). Así, múltiples factores relacionados con el hospedero o el parásito juegan un papel importante en el curso y el desenlace de la infección. Teniendo en cuenta hallazgos previos del grupo y la necesidad de estudiar algunos parámetros inmunológicos de la enfermedad de Chagas en un modelo animal, en el presente trabajo se evaluó la presencia de *T. cruzi* en un modelo murino de infección aguda y crónica, a través de la prueba de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) convencional basada en los iniciadores TcH2AF-R y S35-S36. Para desarrollar este objetivo, ratones BALB/c hembras fueron infectadas con el aislado Y de *T. cruzi* y divididos en 4 grupos experimentales, los cuales fueron sometidos a eutanasia a los 10 y 30 días post-infección para evaluar la fase aguda y a los 100 y 260 días post-infección para evaluar la fase crónica.

Bajo las condiciones experimentales establecidas por el grupo, fue posible detectar la presencia del parásito en sangre y en otros tejidos como el corazón, colon, hígado y músculo esquelético de ratones BALB/c con infección aguda y crónica por el aislado Y de *T. cruzi*. En sangre se encontró que en el 100 % de los ratones con infección aguda fue posible detectar la presencia del parásito, en contraste en ratones evaluados en la fase crónica, solo se detectó en el 40 % de las muestras de sangre de los ratones al día 100 y no se detectaron parásitos en sangre en los ratones sometidos a eutanasia al día 260 post-infección. Por otro lado, en los demás tejidos, en la mayoría de los ratones infectados se detectó la presencia del parásito durante la fase aguda a comparación de las muestras de tejidos de ratones sometidos a eutanasia durante la fase crónica, con un mayor porcentaje de detección en muestras de colon y corazón, seguido por músculo esquelético e hígado de ratones infectados con el parásito.

Teniendo en cuenta lo anterior, los resultados del presente trabajo permiten concluir que en el modelo murino de infección aguda y crónica por *T. cruzi* establecido en el Laboratorio de Parasitología Molecular de la Pontificia Universidad Javeriana, se logró detectar el parásito en muestras de corazón, colon, hígado, músculo esquelético y sangre, siendo detectado en un mayor porcentaje de ratones con infección aguda, que ratones con infección crónica.

TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN.....	11
2. MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE	
2.1 Enfermedad de Chagas.....	13
2.2 Agente etiológico	13
2.3 Ciclo de vida de <i>Trypanosoma cruzi</i>	14
2.4 Variabilidad de <i>T. cruzi</i>	15
4.5 Manifestaciones clínicas.....	16
4.6 El modelo murino de infección por <i>T. cruzi</i>	17
6. OBJETIVOS	21
6.1 OBJETIVO GENERAL.....	21
6.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
7. METODOLOGÍA	22
7.1 Modelo de infección estandarizado en el Laboratorio de Parasitología Molecular.	
7.1.1 Ratones y parásitos.....	22
7.2 Metodología realizada durante el desarrollo del presente trabajo de grado.	
7.2.1 Extracción de ADN	23
7.2.2 Detección del parásito mediante PCR convencional	24
7.3 Aspectos éticos	26
7.5 Análisis de los datos	27

8. RESULTADOS

8.1 Evaluación de la presencia de *T. cruzi* en muestras de sangre de ratones con infección aguda y crónica.28

8.2 Evaluación de la presencia de *T. cruzi* en muestras de corazón, colon, hígado y músculo esquelético de ratones con infección aguda y crónica.31

9. DISCUSIÓN.....34

10. CONCLUSIÓN39

11. REFERENCIAS40

12. ANEXOS45

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Cepas de ratones y aislados de *T. cruzi* usados como modelo experimental de infección.

Tabla 2. Grupos experimentales y fecha de eutanasia.

Tabla 3. Iniciadores de las cPCR usados en el presente trabajo.

Tabla 4. Condiciones de reacción de las cPCR usadas en el presente trabajo de grado.

Tabla 5. Programas de cPCR para cada uno de los iniciadores usados en el presente trabajo de grado.

Tabla 6. Proporción de muestras de sangre de ratones con infección aguda y crónica por *T. cruzi* en los que se detectó la presencia del parásito.

Tabla 7. Proporción de muestras de tejidos de ratones con infección aguda y crónica por *T. cruzi* en los que se detectó la presencia del parásito.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida de *T. cruzi*.

Figura 2. Representativo del análisis de la cPCR para una secuencia génica del citocromo de mamíferos pequeños en muestras de ADN de ratones con y sin infección por *T. cruzi*

Figura 3. Representativo del análisis de la cPCR para una secuencia génica de la Histona H2A y el elemento SIRE de *T. cruzi* en muestras de ADN de ratones con y sin infección por *T. cruzi*

Figura 4. Representativo del análisis de la cPCR para una secuencia génica de la región variable del minicírculo del ADN del cinetoplasto de *T. cruzi* en muestras de ADN de ratones con y sin infección por *T. cruzi*.

Figura 5. Porcentaje de muestras de sangre con cPCR positiva obtenidas de ratones con infección aguda y crónica por *T. cruzi*

Figura 6. Porcentaje de muestras de corazón, colon, hígado y músculo esquelético con cPCR positiva obtenidas de ratones con infección aguda y crónica por *T. cruzi*.

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Resultados de las cPCR basada en los iniciadores S35-S36 y TcH2A en muestras de sangre de ratones con infección aguda y crónica por *T. cruzi*.

Anexo 2. Resultados de las cPCR basada en los iniciadores S35-S36 y TcH2A en muestras de corazón, colon, hígado y músculo esquelético de ratones con infección aguda y crónica por *T. cruzi*.

1. INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana, es una parasitosis causada por el protozoo flagelado intracelular *Trypanosoma cruzi*, se encuentra distribuida en 21 países de América Latina y se considera un problema de salud pública global y una enfermedad tropical desatendida. Se estima que cerca de 7 millones de personas se encuentran infectadas con el parásito, más de 25 millones de personas están en riesgo de adquirir la infección y ocurren más de 10 000 a 14 000 muertes cada año a causa de la enfermedad (1,5,6). La enfermedad es endémica en América del Sur, América Central y parte de América del Norte, sin embargo, los constantes flujos migratorios han favorecido la presencia de personas con la enfermedad de Chagas en regiones clásicamente consideradas como no endémicas, como Estados Unidos, Canadá, Europa, Japón y Australia (7,8), convirtiendo esta enfermedad en un problema de salud pública global.

Desde el punto de vista clínico, la enfermedad de Chagas se divide en fase aguda y fase crónica. La fase aguda dura 4 a 8 semanas y suele ser asintomática o con sintomatología inespecífica, las personas que no son tratadas en esta fase evolucionan a una fase crónica, donde aproximadamente el 60 al 70% de estos pacientes tendrán la forma indeterminada de la enfermedad de Chagas y el resto de los individuos infectados, desarrollarán la forma determinada con manifestaciones clínicas cardíacas o gastrointestinales, generalmente 20 a 40 años después de la infección inicial (1,2,9).

Los estudios moleculares y los perfiles genéticos han demostrado que *T. cruzi* presenta una gran variabilidad, compuesta por una amplia población de aislados que circulan entre hospederos mamíferos e insectos vectores. Estas poblaciones se han clasificado en 7 grupos genéticos conocidos como Unidades Discretas de Tipificación (DTU, del inglés *Discrete Typing Units*) y un nuevo grupo conocido como TcBat (3). En modelos experimentales y en humanos infectados con *T. cruzi* se ha demostrado, que los parásitos aislados de diferentes órganos son genéticamente distintos, lo que

sugiere que la variabilidad genética de los aislados del parásito podría explicar las diversas manifestaciones clínicas de la enfermedad de Chagas y las diferencias en morbilidad y mortalidad observadas en diferentes áreas geográficas (4).

Estudiar el curso de la enfermedad Chagas en ratones ha resultado muy útil y ha generado avances importantes en el estudio de la infección por *T. cruzi*, ya que los modelos experimentales controlados permiten analizar parámetros del hospedero y el parásito, lo que por razones prácticas y, en algunos casos, éticas no pueden realizarse en humanos (10). Así, estudios en ratones han mostrado que tanto factores del hospedero como del parásito pueden tener importantes efectos en el desarrollo y evolución de la infección por *T. cruzi*. Por ejemplo, ratones ICR infectados con un aislado del grupo TcI (DA) o TcII (Y) del parásito, mostraron diferentes niveles de parasitemia en sangre y parásitos en tejidos (11). Otro estudio mostró que ratones BALB/c infectados con un aislado TcII (Y) de *T. cruzi*, presentaron altos niveles de parasitemia en sangre y de parásitos en tejidos, comparado con lo encontrado en ratones C57BL/6 (12). Así, es importante establecer modelos animales experimentales que permitan estudiar el curso de la infección por *T. cruzi* bajo condiciones controladas, de tal forma que sean comparables para la evaluación de diferentes parámetros.

Teniendo en cuenta que a la fecha no existe un modelo experimental estandarizado y homogéneo para el estudio de la infección por *T. cruzi* en el Laboratorio de Parasitología Molecular de la Pontificia Universidad Javeriana, en el presente trabajo se responderá a la siguiente pregunta de investigación: ¿En cuáles tejidos provenientes de ratones con infección experimental aguda y crónica por *T. cruzi*, establecido en el Laboratorio de Parasitología Molecular, es posible detectar la presencia del parásito?. Este trabajo permitirá continuar con estudios de otros parámetros que podrían explicar la relación entre la detección del parásito y el desarrollo de la enfermedad.

2. MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE

2.1 Enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas también conocida como tripanosomiasis americana se encuentra distribuida en América del Sur, América Central y parte de América del Norte afectando a una población que, al igual que otras enfermedades tropicales desatendidas, asecha a los más desfavorecidos y con mayor prevalencia en las áreas rurales. La enfermedad de Chagas afecta a un estimado de 7 millones de personas y más de 25 millones de personas están en riesgo de adquirir la infección (1,5,6). De acuerdo con las estimaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS), en Colombia se estima que cerca de 437.960 personas tienen la infección y la población expuesta en áreas endémicas es de 4.813.543 (13). Los constantes flujos migratorios han favorecido la presencia de personas con la enfermedad de Chagas en regiones clásicamente consideradas como no endémicas, como Estados Unidos, Canadá, Europa, Japón y Australia (7,8).

La infección se transmite a los seres humanos, por lo general, por vía vectorial u ocasionalmente por mecanismos no vectoriales como la vía oral, transmisión vertical, transfusión sanguínea, trasplantes de órganos y accidentes de laboratorio (5,8,9).

2.2 Agente etiológico

El agente causal de la enfermedad de Chagas es *Trypanosoma cruzi*, un parásito protozoo flagelado intracelular perteneciente al dominio Eukaryota, reino Protista, phylum Sarcomastigophora, subphylum Mastigophora, clase Zoomastigophora, orden Kinetoplastida, familia Trypanosomatidae y género y especie *Trypanosoma cruzi*. Este parásito presenta cuatro estadios o formas morfológicas diferentes, las formas no replicativas: tripomastigotes sanguíneos y tripomastigotes metacíclicos; y las formas replicativas: amastigotes y epimastigotes (1).

2.3 Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*

En cuanto al ciclo de vida, *T. cruzi* es transmitido al hombre a través de las heces de insectos hematófagos de la familia Reduviidae. Se han identificado cerca de 140 especies de triatomíneos, pero solo unos pocos son competentes para transmitir *T. cruzi*, en donde los géneros de *Triatoma*, *Panstrongylus* y *Rhodnius* constituyen los de mayor importancia epidemiológica (1). En Colombia, las especies de los principales vectores son: *Rhodnius prolixus*, *Triatoma dimidiata*, *Triatoma maculata* y *Triatoma venosa* (14). Además, el parásito infecta a 180 especies de 24 familias de mamíferos domésticos y salvajes pertenecientes a los órdenes: Didelphidomorphia, Lagomorpha, Chiroptera, Rodentia, Pilosa, Cingulata, Carnivora, Primata y Perisodactyla (15).

El insecto vector ingiere los tripomastigotes sanguíneos a partir de un mamífero infectado, diferenciándose en epimastigotes en la región media del intestino donde se multiplican por fisión binaria; después de esto, en la región posterior del intestino, el parásito se diferencia en el estadio infectivo, tripomastigote metacíclico. Este estadio se libera en las heces del insecto vector en el momento de picar al hospedero mamífero ingresando por mucosas o lesiones preexistentes o generadas como resultado de la picadura del insecto. Una vez en el hospedero mamífero, los tripomastigotes invaden células nucleadas, adyacentes al sitio de infección. Dentro de las células, los tripomastigotes se diferencian en amastigotes y luego de multiplicarse por fisión binaria, se diferencian en tripomastigotes, los cuales son liberados al torrente sanguíneo por la ruptura de las células nucleadas. Los tripomastigotes invaden tejidos adyacentes y se transportan a través de los vasos linfáticos y el torrente sanguíneo a sitios distantes. El ciclo de transmisión se completa cuando el insecto vector ingiere tripomastigotes presentes en sangre de mamíferos infectados (Figura 1) (1,2).

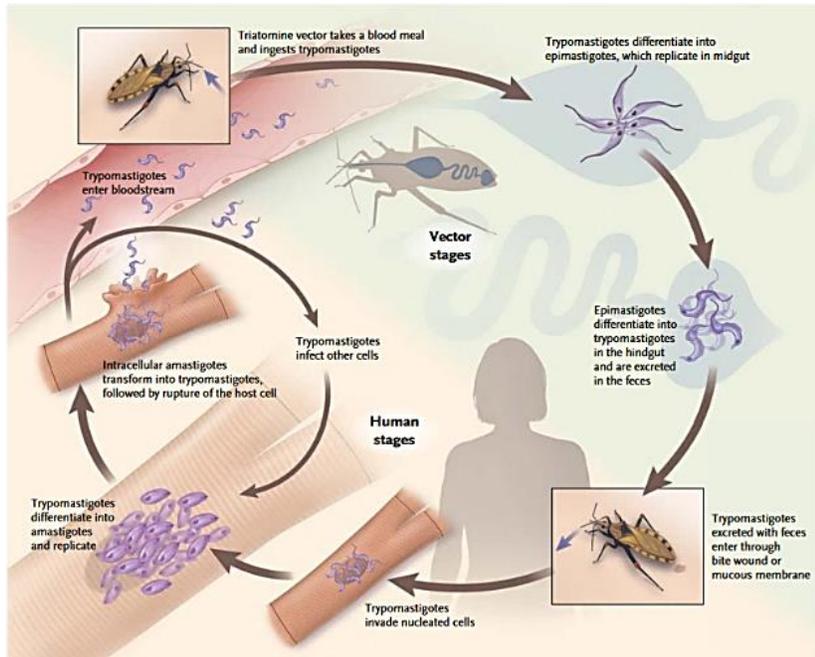


Figura 1. Ciclo de vida de *T. cruzi*. El ciclo de vida de *T. cruzi* empieza cuando el insecto vector ingiere tripomastigotes sanguíneos durante la ingesta de sangre de un hospedero mamífero infectado. Los tripomastigotes se transforman en epimastigotes en la región media del intestino del vector, migran a la región posterior y se diferencian en tripomastigotes metacíclicos, los cuales son excretados en las heces del vector en el momento de la picadura. Estos parásitos metacíclicos ingresan por la herida o a través de mucosas intactas del hospedero mamífero, invadiendo células nucleadas. En el citoplasma, los tripomastigotes se diferencian en amastigotes y tras varias rondas de replicación, se diferencian en tripomastigotes que son liberados al torrente sanguíneo por la ruptura de las células. Estas formas pueden infectar otras células nucleadas e iniciar nuevamente el ciclo de infección. Tomado de: Bern 2015 (2).

2.4 Variabilidad de *T. cruzi*

T. cruzi es una especie heterogénea, compuesta por una amplia población de aislados que circulan entre los hospederos mamíferos e insectos vectores. La heterogeneidad del parásito ha sido ampliamente estudiada con la intención de correlacionar la biología, la genética y la bioquímica de parásito; estas poblaciones se han clasificado en 6 grupos genéticos conocidos como Unidades Discretas de Tipificación (DTU, del inglés Discrete Typing Units): TcI, TcII, TcIII, TcIV, TcV y TcVI.

(3). Además, se ha propuesto un nuevo grupo conocido como TcBat, el cual incluye alrededor de 15 aislados de *T. cruzi* encontrados en murciélagos provenientes de regiones en donde la enfermedad es endémica (16,17).

Las DTU de *T. cruzi* se han asociado a las manifestaciones clínicas que desarrollan los pacientes infectados. Así, TcII, TcV y TcVI se han asociado al desarrollo de megacolon o megaesófago y TcI, TcII, TcV y TcVI al desarrollo de alteraciones cardíacas (3,18). Sin embargo, es posible que pacientes infectados con TcI desarrollen alteraciones digestivas (19).

En Colombia, se ha encontrado circulación de todas las DTU de *T. cruzi* entre mamíferos reservorios, vectores y en pacientes con la enfermedad de Chagas (20,21). Sin embargo, TcI y TcII son los grupos que más se encuentran en los pacientes colombianos y están asociados principalmente a alteraciones cardíacas (22).

4.5 Manifestaciones clínicas

La enfermedad de Chagas presenta dos fases clínicas: aguda y crónica, esta última puede ser indeterminada o determinada. La fase aguda se caracteriza por presentar una parasitemia alta en sangre periférica, donde generalmente los pacientes no son diagnosticados debido a la inespecificidad o ausencia de sintomatología clínica. Sin embargo, en la transmisión vectorial, hay señales de puerta de entrada del parásito, una de ellas es la generación del Chagoma, una zona endurecida caracterizada por eritema e inflamación; o el signo de Romaña, que corresponde a un edema sin dolor unilateral del párpado y los tejidos perioculares, el cual refleja la entrada del parásito a través de las membranas mucosas oculares (9). La muerte en la fase aguda es extremadamente rara y ocurre principalmente por miocarditis o meningoencefalitis, siendo más frecuente en pacientes inmunosuprimidos o en etapas tempranas de la vida (8).

Los pacientes que no logran eliminar el parásito o no son tratados, evolucionan a una fase crónica indeterminada caracterizada por la ausencia de síntomas y una parasitemia baja en sangre periférica. Posteriormente, cerca del 20 al 30% de los individuos, dependiendo de la zona geográfica, de la DTU o de la genética del hospedero, pueden desarrollar manifestaciones cardíacas, digestivas o mixtas, generalmente 20 a 40 años después de la infección (1,9).

La forma cardíaca es la manifestación más frecuente de la enfermedad de Chagas. Los principales hallazgos de la cardiopatía chagásica son los trastornos del electrocardiograma tales como hemibloqueo anterior o posterior, bloqueo de rama derecha, bloqueo de rama izquierda, extrasístoles ventriculares, bloqueos auriculoventriculares, alteraciones del ST, presencia de ondas Q anómalas, bradicardia, bajo voltaje del QRS o arritmias auriculares (8). Otras alteraciones, aunque menos frecuentes son taquiarritmias y bradiarritmias fenómenos tromboembólicos, aneurismas ventriculares y muerte súbita (1).

A nivel gastrointestinal, la enfermedad de Chagas puede afectar cualquier parte del tubo digestivo, siendo más afectado el esófago o el colon. La afección gastrointestinal es menos común que la cardiopatía chagásica y se observa predominantemente en pacientes infectados en el cono sur. Los pacientes con enfermedad de Chagas que presentan alteraciones gastrointestinales presentan pérdida del sistema nervioso entérico (del sistema excitatorio como del inhibitorio), la cual puede llevar al desarrollo de megaesófago o dilatación colónica. Los principales síntomas son disfagia, regurgitación y dolor esofágico. Otros síntomas menos frecuentes son el hipo, pirosis e hipersalivación acompañado de hipertrofia paratiroidea (1,8).

4.6 El modelo murino de infección por *T. cruzi*

Estudiar el curso de la infección por *T. cruzi* en ratones ha generado un avance importante en el estudio de la enfermedad de Chagas, ya que los modelos experimentales controlados permiten imitar aspectos de la enfermedad en humanos (23) permitiendo el estudio de parámetros inmunológicos que expliquen la relación de

parásitos en sangre y en tejidos y el desarrollo de síntomas de la enfermedad de Chagas.

En la Tabla 1, se describen hallazgos de algunos estudios en modelos murinos de infección por el parásito relacionados con los niveles de parasitemia en sangre y la presencia de parásitos en tejidos. El análisis de la presencia de parásitos en sangre y en tejidos, así como los mecanismos que controlan la infección crónica por *T. cruzi* son cruciales para entender y desarrollar nuevas estrategias para combatir la enfermedad. Estudios en humanos y ratones han sugerido que el fondo genético del hospedero y el aislado genético de *T. cruzi*, son importantes para el desenlace de la infección, así como otros factores, los cuales incluyen: el inóculo inicial, el sexo y la edad (24). Por ejemplo, ratones hembras o machos de la cepa ACA fueron infectados intraperitonealmente con 200 o 2.000 tripomastigotes del aislado Dm28c (Tcl) de *T. cruzi*, encontrándose una mayor presencia de parásitos en sangre en los ratones infectados con 2.000 parásitos que los ratones infectados con 200 parásitos, así como una menor tasa de supervivencia en los ratones machos de la cepa ACA frente a la infección por *T. cruzi* comparado con las hembras de la misma cepa de ratón, lo cual sugiere que tanto el número de parásitos y el sexo del hospedero pueden afectar el curso y la susceptibilidad a la infección por *T. cruzi* (24). Así, se destaca que múltiples factores tanto dependientes del hospedero como del parásito, juegan un papel importante en el desenlace de la infección. Por lo anterior, a la fecha no existe un modelo experimental estandarizado y homogéneo para el estudio de la infección por *T. cruzi* en el Laboratorio de Parasitología Molecular de la Pontificia Universidad Javeriana.

Tabla 1. Cepas de ratones y aislados de *T. cruzi* usados como modelo experimental de infección.

Cepa de ratón	Aislado de <i>T. cruzi</i>	Niveles de Parasitemia en sangre		Parásitos en corazón		Parásitos en tejidos	Ref.
		Agudo	Crónico	Agudo	Crónico		
ICR	DA (Tcl)	936,8 parásitos/ μ l	0,89 parásitos/ μ l	+	+	Músculo esquelético y corazón	(11)
	Y (Tcll)	6,27 parásitos/ μ l	ND	+	-	Corazón	
BALB/c [‡]	Y (Tcll)	30 x 10 ⁴ parásitos/ml	NA	++	+++	Corazón	(12)
C57BL/6 [‡]		10 x 10 ⁴ parásitos/ml	NA	+	+		
BALB/c	Y (Tcll)	++	++	+	+	Hígado, riñon, pulmón, corazón	(25)
	JLP (Tcll)	+	+	-	+	Hígado, riñon, pulmón, corazón	
BALB/c	Y (Tcll)	+	NA	+	NA	Hígado, cerebro, vasos sanguíneos, bazo, riñon, médula ósea, timo, intestino delgado, corazón	(26)

ICR-CD-1	DA (Tcl)	7,6 x 10 ³ parásitos/10 µl	ND	+	-	Músculo esquelético, corazón	(27)
	MG (Tcl)	6,2 x 10 ³ parásitos/10 µl	ND	+	-	Músculo esquelético, corazón	
	JDD (Tcl)	7,5 x 10 ² parásitos/10 µl	ND	+	-	Intestino, corazón, músculo esquelético, tejido adiposo	
	GC (Tcl)	7,2 x 10 ² parásitos/10 µl	ND	+	-	Intestino, corazón, músculo esquelético, tejido adiposo, cerebro	

ND: No detectable; +: Resultado positivo por PCR, histopatología o hemocultivo; -: Resultado negativo por PCR, histopatología o hemocultivo; NA: No se analizó en el estudio. ≠ El estudio compara los resultados de los niveles de parasitemia en sangre periférica y parásitos en tejidos entre las dos cepas de ratones usadas.

6. OBJETIVOS

6.1 OBJETIVO GENERAL

Detectar la presencia de *Trypanosoma cruzi* en un modelo murino de infección aguda y crónica establecido en el Laboratorio de Parasitología Molecular.

6.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar la presencia de *T. cruzi* en muestras de sangre de ratones con infección aguda y crónica.
- Evaluar la presencia de *T. cruzi* en muestras de corazón, colon, hígado y músculo esquelético de ratones con infección aguda y crónica.

7. METODOLOGÍA

El presente trabajo de grado hace parte del proyecto “Determinación de la frecuencia de linfocitos T CD8+ multifuncionales como un correlato de protección frente a la infección por *Trypanosoma cruzi*”. A continuación, se muestra la metodología del modelo murino de infección realizado en el Laboratorio de Parasitología Molecular, el cual fue elaborado previo al desarrollo de este trabajo de grado (7.1); y la metodología realizada durante el desarrollo del presente trabajo de grado (7.2).

7.1 Modelo de infección estandarizado en el Laboratorio de Parasitología Molecular.

7.1.1 Ratones y parásitos

El modelo de infección incluyó ratones BALB/c hembras entre 6 y 8 semanas de vida obtenidos de la Unidad de Biología Comparativa (UBC) de la Pontificia Universidad Javeriana. Los ratones fueron infectados con el aislado Y (MHOM/BR/00/Y; TcII) de *T. cruzi*, el cual se mantuvo en pasajes sucesivos en ratones BALB/c para mantener la virulencia.

7.1.2 Grupos experimentales y obtención de los tejidos

Ratones BALB/c fueron infectados con el aislado Y de *T. cruzi* y sometidos a eutanasia al día 10, 30, 100 y 260 post-infección. Teniendo en cuenta previos reportes, se seleccionaron las fechas de eutanasia de los ratones para evaluar al día 10 y 30 la fase aguda temprana y tardía, respectivamente; y al día 100 y 260 la fase crónica temprana y tardía, respectivamente. Brevemente, 20 ratones BALB/c fueron divididos en 4 grupos experimentales (G1 al G4) e inoculados con 1×10^5 tripomastigotes de *T. cruzi* por vía intraperitoneal (ip) en 100 μ l de PBS 1X. Los ratones del G1 y G2 (5 ratones por grupo) fueron sometidos a eutanasia al día 10 y 30 post-infección, respectivamente; y los ratones del G3 y G4 (5 ratones por grupo) fueron sometidos a eutanasia al día 100 y 260 post-infección, respectivamente. Adicionalmente, como control se incluyó un grupo con 4 ratones (G5), los cuales

fueron inoculados con 100 μ l de PBS 1X. Los ratones fueron sometidos a eutanasia por medio de una cámara de CO₂ en un ambiente aséptico y de cada uno de los ratones se obtuvieron los siguientes tejidos: corazón, músculo esquelético de la rodilla, colon, hígado (almacenados en etanol al 70%) y sangre (almacenada en clorhidrato de guanidina, v/v 1:1). En la tabla 2, se describen los grupos experimentales y las fechas en las que se sometieron a eutanasia los ratones de cada grupo experimental.

Tabla 2: Grupos experimentales y fecha de eutanasia

Grupos	Fecha de Eutanasia				Total, ratones/Grupo
	10 dpi	30 dpi	100 dpi	260 dpi	
G1: Y	5				5
G2: Y		5			5
G3: Y			5		5
G4: Y				5	5
G5: PBS 1X	1	1	1	1	4

Grupos experimentales: G1, G2, G3, G4 y G5; dpi: días post infección

7.2 Metodología realizada durante el desarrollo del presente trabajo de grado.

7.2.1 Extracción de ADN

La extracción de ADN genómico de corazón, músculo esquelético de la rodilla, colon, hígado y sangre, se realizó de acuerdo a las instrucciones del estuche comercial "*High pure PCR template preparation kit*" (Roche). Brevemente, se cortaron y trituraron 25 a 50 mg para una muestra de tejido o se tomaron 200 μ l de una muestra de sangre, se le adicionó la solución amortiguadora de lisis, proteinasa K y se incubó a 55°C por 1 hora para una muestra de tejido sólido y a 70°C por 20 minutos para una muestra de sangre. Luego, se añadió la solución amortiguadora de unión (para los tejidos) o

isopropanol (para ambos). Posteriormente, se realizaron lavados en presencia de la solución amortiguadora para la remoción de inhibidores o con la solución amortiguadora de lavado. Finalmente, el ADN fue lavado con la solución de elución, se alicuotó y cuantificó mediante el NanoDrop 2000 (Thermo Scientific).

7.2.2 Detección del parásito mediante PCR convencional

Para detectar la presencia del parásito, a partir de ADN genómico obtenido de los tejidos sólidos (corazón, músculo esquelético, colon, hígado) y sangre, se realizó la prueba de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Inicialmente, con el propósito de comprobar la integridad del ADN y descartar la presencia de inhibidores en las muestras, se realizó una PCR convencional (cPCR) para la detección de una secuencia génica del citocromo B para mamíferos pequeños (28). Posteriormente, en las muestras con resultados positivos, se realizaron dos cPCR para la detección del ADN de *T. cruzi* mediante los iniciadores TcH2AF-R o S35-S36 que tienen como blanco de amplificación: la histona H2A y el elemento SIRE de *T. cruzi* o la región variable del minicírculo del ADN del cinetoplasto, respectivamente (29,30). En la tabla 3, se describen los iniciadores para las cPCR usadas en el presente trabajo.

Tabla 3. Iniciadores de las cPCR usados en el presente trabajo.

Iniciadores	Secuencia (5'-3')	Producto esperado	Ref.
CytB Uni fw	TCATCMTGATGAAAYTTYGG	940 pb	(28)
CytB Uni rev	ACTGGYTGDCCBCCRATTCA		
TcH2AF	GAGAGTGATCGTGGGAGAGC	230 pb	(29)
TcH2AR	AGTGGCAGACTTTGGGGTC		
S35	AAATAATGTACGGGKGAGATGCATGA	330 pb	(30)
S36	GGGTTTCGATTGGGGTTGGTGT		

Teniendo en cuenta que se está trabajando con un modelo animal controlado y que previos reportes del grupo de investigación muestran que es posible detectar la

presencia del parásito en muestras de ADN de tejidos de ratones infectados por *T. cruzi* con una concentración final de ADN entre 50 y 200 ng (31), cada muestra de ADN se ajustó a una concentración final de 125 ng para evaluar la presencia del parásito mediante el uso de cPCR a un volumen final de reacción de 25 µl. En la tabla 4 y 5, se describen las condiciones de reacción que se usaron para cada cPCR y los programas de PCR usados, respectivamente.

Tabla 4. Condiciones de reacción de las cPCR usadas en el presente trabajo de grado.

cPCR	Reactivo	Concentración final
Citocromo B (CytB Uni rev-Uni fw)	Solución amortiguadora (<i>Buffer</i>)	1 X
	MgCl ₂	1,5 mM
	dNTP	200 µM
	Oligonucleótido <i>Forward</i>	10 pM
	Oligonucleótido <i>Reverse</i>	10 pM
	Taq ADN polimerasa	0,06 U/µl
Histona H2A y el elemento SIRE de <i>T. cruzi</i> (TcH2AF-R)	Solución amortiguadora (<i>Buffer</i>)	1 X
	MgCl ₂	1,5 mM
	dNTP	200 µM
	Oligonucleótido <i>Forward</i>	0,8 µM
	Oligonucleótido <i>Reverse</i>	0,8 µM
	Taq ADN polimerasa	0,05 U/µl
Región variable del minicírculo del ADN del cinetoplasto (S35-S36)	Solución amortiguadora (<i>Buffer</i>)	1 X
	MgCl ₂	2,8 mM
	dNTP	200 µM
	Oligonucleótido <i>Forward</i>	1 µM
	Oligonucleótido <i>Reverse</i>	1 µM
	Taq ADN polimerasa	0,02 U/µl

Tabla 5. Programas de cPCR para cada uno de los iniciadores usados en el presente trabajo de grado.

cPCR	Número de ciclos	Programa	Temperatura (°C)	Tiempo
Citocromo B (CytB Uni rev-Uni fw)	1	Denaturación inicial	94	3 min
	30	Denaturación	94	1 min
		Anillaje	63	1 min
		Extensión	72	2 min
1	Extensión final	72	10 min	
Histona H2A y el elemento SIRE de <i>T. cruzi</i> (TcH2AF-R)	1	Denaturación inicial	95	5 min
	45	Denaturación	95	30 s
		Anillaje	65	1 min
		Extensión	72	30 s
1	Extensión final	72	5 min	
Región variable del minicírculo del ADN del cinetoplasto (S35-S36)	1	Denaturación inicial	95	5 min
	30	Denaturación	95	1 min
		Anillaje	60	1 min
		Extensión	72	1 min
1	Extensión final	72	5 min	

min: minutos; s: segundos

De cada cPCR se realizó una réplica biológica y en cada ensayo se incluyeron los siguientes controles: reacción (agua en el cuarto de preparación de la mezcla de reacción), gris (agua en el cuarto de adición de las muestras a la reacción), negativo (ADN de un ratón del G5) y positivo (ADN genómico de TcII). Los productos de la amplificación se evaluaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,3% teñidos con SYBR green (Invitrogen).

7.3 Aspectos éticos

Este proyecto fue avalado por el Comité de Investigación de la Facultad de Ciencias y el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) bajo el FUA-007-14 de la UBC. La disposición de los cadáveres se llevó a cabo de acuerdo

con los protocolos de la UBC. Así mismo, este trabajo no presentó un impacto ambiental negativo, puesto que no se realizó ninguna intervención en los recursos naturales biológicos o físicos del país. Los desechos generados durante el desarrollo de la investigación fueron tratados de acuerdo a lo establecido en el Manual de Bioseguridad del Laboratorio de Parasitología Molecular.

7.5 Análisis de los datos

Para describir el comportamiento de la presencia de *T. cruzi* en los grupos experimentales de ratones, los resultados de positivo o negativo se digitaron en una base de datos del programa Microsoft Office Excel para Windows y se graficaron mediante el programa GraphPad Prism.

8. RESULTADOS

8.1 Evaluación de la presencia de *T. cruzi* en muestras de sangre de ratones con infección aguda y crónica.

Con el propósito de detectar la presencia de ADN genómico de *T. cruzi* en muestras de sangre obtenidas por punción cardiaca de ratones con y sin infección por el parásito, se procesaron 24 muestras obtenidas de ratones de cada uno de los grupos experimentales descritos en la metodología (Tabla 2). Para evaluar la presencia de inhibidores y la calidad del ADN obtenido de muestras de sangre, se realizó una cPCR para la detección de una secuencia génica del citocromo B de mamíferos pequeños, encontrándose que para los G1, G2, G3 y G5 el 100 % de las muestras fueron positivas por esta cPCR y en el G4 solo 3 de 5 muestras mostraron resultados positivos para esta cPCR, obteniendo el fragmento esperado de 940 pb (Figura 2). Estos resultados sugirieron que el método de extracción permitió obtener un ADN de buena calidad para su utilización en cPCR.

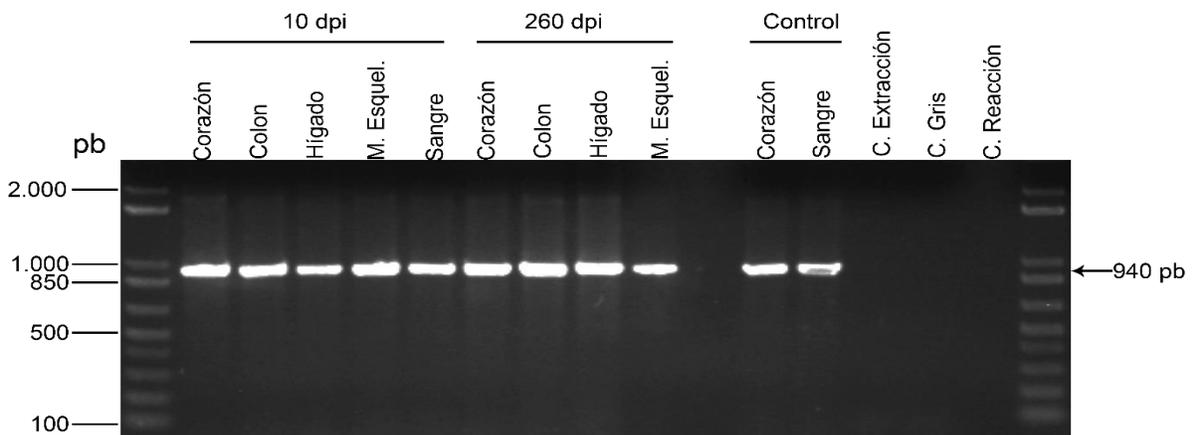


Figura 2. Representativo del análisis de la cPCR para una secuencia génica del citocromo de mamíferos pequeños en muestras de ADN de ratones con y sin infección por *T. cruzi*. A la izquierda se indican las bandas del marcador de peso molecular en pares de bases (pb) y a la derecha se indica el tamaño de la banda esperada. En la parte superior se describe el origen de las muestras de ADN (tejido y grupo experimental), así como los

controles usados durante la preparación de la mezcla de cPCR, los cuales fueron descritos en la metodología.

Posteriormente, mediante dos cPCR basadas en los iniciadores TcH2AF-R y S35-S36, se evaluó la presencia del parásito en el ADN de muestras de sangre de ratones infectados en los días 10, 30 100 y 260 pi, como se describió en la metodología. En las Figura 3 y 4 se muestran los representativos de la electroforesis para las cPCR basadas en los iniciadores TcH2AF-R y S35-S36, respectivamente. En el Anexo 1 se describe la proporción de ratones en los que se detectó la presencia de ADN del parásito en las muestras de sangre mediante las cPCR basados en los iniciadores TcH2AF-R y S35-S36. Al analizar la proporción de muestras de sangre de ratones infectados en los que se detectó la presencia del parásito, se encontró que en el total de las muestras de sangre de los ratones sometidos a eutanasia al día 10 o 30 post-infección fue posible detectar la presencia del ADN del parásito. En el grupo de ratones sometidos a eutanasia al día 100 post-infección solo se detectó en 2 ratones y en el grupo de ratones sometidos a eutanasia al día 260 post-infección no se encontró la presencia del parásito en ninguna de las muestras de sangre analizadas (Tabla 6).

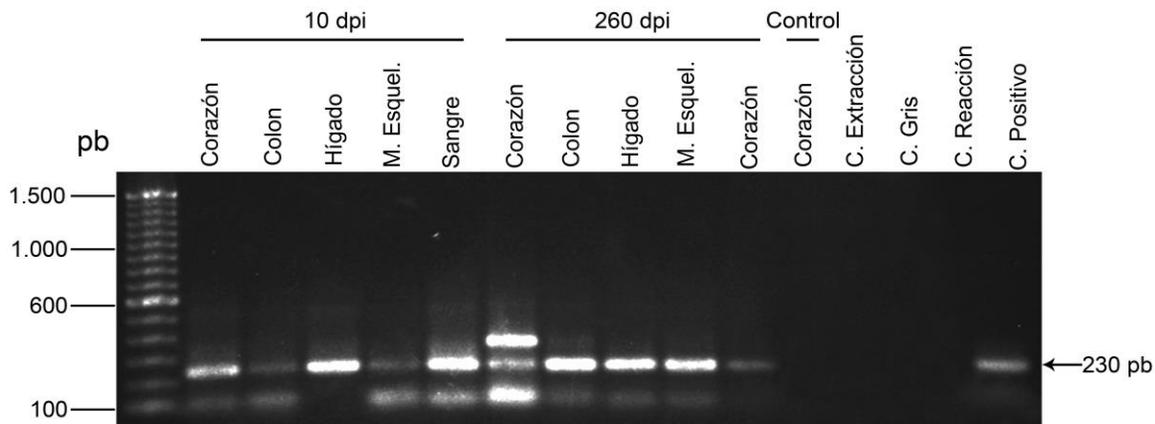


Figura 3. Representativo del análisis de la cPCR para una secuencia génica de la Histona H2A y el elemento SIRE de *T. cruzi* en muestras de ADN de ratones con y sin infección por *T. cruzi*. A la izquierda se indican las bandas del marcador de peso molecular en pares de bases (pb) y a la derecha se indica el tamaño de la banda esperada. En la parte superior se

describe el origen de las muestras de ADN (tejido y grupo experimental), así como los controles usados durante la preparación de la mezcla de cPCR, los cuales fueron descritos en la metodología.

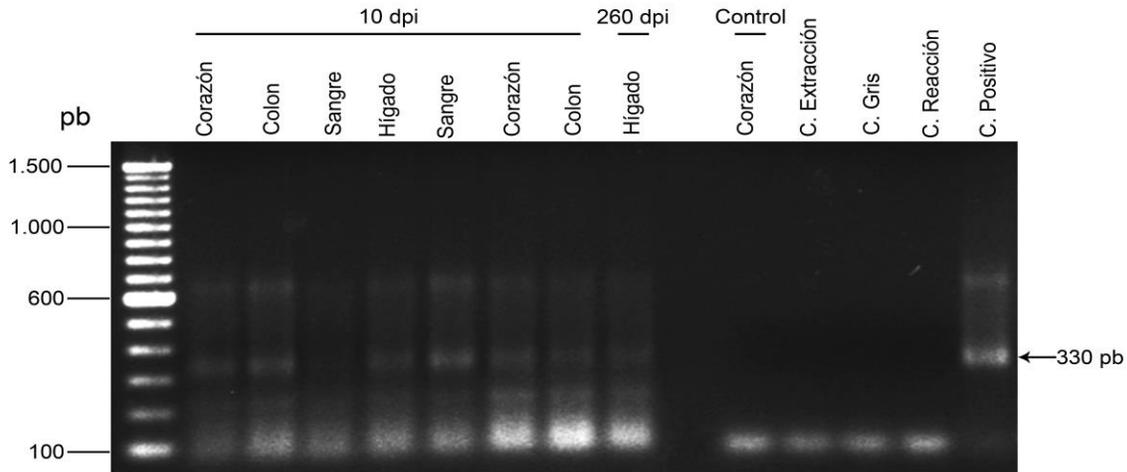


Figura 4. Representativo del análisis de la cPCR para una secuencia génica de la región variable del minicírculo del ADN del cinetoplasto de *T. cruzi* en muestras de ADN de ratones con y sin infección por *T. cruzi*. A la izquierda se indican las bandas del marcador de peso molecular en pares de bases (pb) y a la derecha se indica el tamaño de la banda esperada. En la parte superior se describe el origen de las muestras de ADN (tejido y grupo experimental), así como los controles usados durante la preparación de la mezcla de cPCR, los cuales fueron descritos en la metodología.

Tabla 6. Proporción de muestras de sangre de ratones con infección aguda y crónica por *T. cruzi* en los que se detectó la presencia del parásito.

Tejido	Días post-infección [‡]			
	10	30	100	260
Sangre	5/5	5/5	2/5	0/3

[‡] Proporción de muestras de sangre de ratones sometidos a eutanasia al día 10, 30, 100 o 260 post-infección en los que se detectó la presencia del parásito mediante cPCR basadas en los iniciadores TcH2AF-R y S35-S36.

Al analizar el porcentaje de muestras de sangre de ratones infectados en los que se detectó la presencia del parásito, se encontró que al utilizar ambas cPCR fue posible detectar el parásito en el 100 % de las muestras de sangre de los ratones sometidos

a eutanasia al día 10 y 30 post-infección y en el 40 % de los ratones sometidos a eutanasia al día 100 pi (Figura 5).

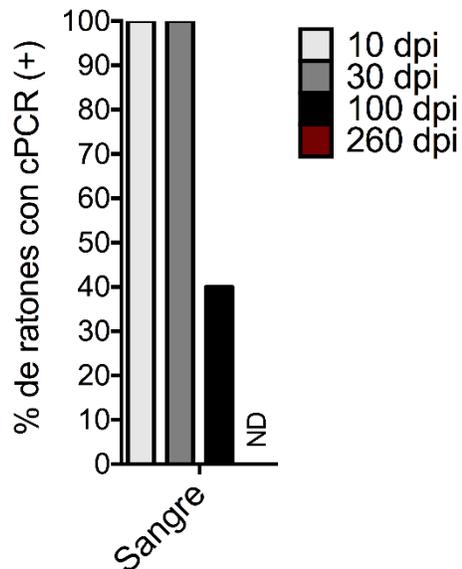


Figura 5. Porcentaje de muestras de sangre con cPCR positiva obtenidas de ratones con infección aguda y crónica por *T. cruzi*. Cada barra representa el porcentaje total de ratones sometidos a eutanasia al día 10, 30, 100 y 260 post-infección en los que se detectó la presencia del parásito. ND: No detectable o ratones con PCR negativa.

8.2 Evaluación de la presencia de *T. cruzi* en muestras de corazón, colon, hígado y músculo esquelético de ratones con infección aguda y crónica.

Previo a la detección de la presencia del ADN del parásito en las muestras obtenidas de los tejidos sólidos (corazón, colon, hígado y músculo esquelético) de ratones con y sin infección por *T. cruzi*, se evaluó la integridad del ADN obtenido a partir de los tejidos sólidos de todos los grupos experimentales de ratones, encontrándose que en el 100 % de las muestras evaluadas se obtuvo un resultado positivo por esta cPCR, obteniendo el fragmento esperado de 940 pb (Figura 2). Así, estos resultados sugirieron que el método de extracción permitió obtener ADN a partir de muestras de tejidos sólidos de buena calidad para su utilización en cPCR.

Posteriormente, se evaluó la presencia del parásito en el ADN de muestras de tejidos sólidos de ratones con y sin infección por *T. cruzi* como se describió en la metodología.

En el Anexo 2 se describe la proporción de ratones en los que se detectó la presencia de ADN del parásito en las muestras de los tejidos sólidos mediante las cPCR basados en los iniciadores TcH2AF-R y S35-S36. Al analizar la proporción de muestras de ADN de tejidos sólidos de ratones infectados con el parásito con cPCR positiva, se encontró que fue posible detectar la presencia del parásito en los tejidos de los ratones sometidos a eutanasia al día 10 o 30 post-infección en mayor proporción que en los ratones sometidos a eutanasia al día 100 o 260 post-infección (Tabla 7). Sin embargo, en los ratones sometidos a eutanasia al día 100 post-infección, solo se encontró la presencia del parásito en 1 muestra de ADN de colon.

Tabla 7. Proporción de muestras de tejidos de ratones con infección aguda y crónica por *T. cruzi* en los que se detectó la presencia del parásito.

Tejido	Días post-infección*			
	10	30	100	260
Corazón	5/5	3/5	0/5	2/5
Colon	5/5	4/5	1/5	1/5
Hígado	2/5	1/5	0/5	1/5
Músculo esquelético	4/5	2/5	0/5	1/5

* Proporción de muestras de tejidos sólidos de ratones sometidos a eutanasia al día 10, 30, 100 o 260 post-infección en los que se detectó la presencia del parásito mediante cPCR basadas en los iniciadores TcH2AF-R y S35-S36.

Teniendo en cuenta el anterior resultado, se analizó el porcentaje de muestras de tejidos sólidos de ratones infectados en los que se detectó la presencia del parásito. De las muestras de corazón de los ratones sometidos a eutanasia al día 10, 30 y 260 post-infección, se encontró presencia del parásito en el 100 %, 60 % y 40 % de los ratones, respectivamente. De las muestras de colon de los ratones sometidos a eutanasia al día 10, 30, 100 y 260 post-infección, se encontró presencia del parásito en el 100 %, 80 %, 20 % y 20 % de los ratones, respectivamente. De las muestras de hígado de los ratones sometidos a eutanasia al día 10, 30 y 260 post-infección, se encontró presencia del parásito en el 40 %, 20 % y 20 % de los ratones,

respectivamente. Por último, de las muestras de músculo esquelético de los ratones sometidos a eutanasia al día 10, 30 y 260 post-infección, se encontró presencia del parásito en el 80 %, 40 % y 20 % de los ratones, respectivamente. De manera interesante, bajo las condiciones experimentales evaluadas, no fue posible detectar la presencia del parásito en muestras de corazón, hígado y músculo esquelético en los ratones sometidos a eutanasia al día 100 post-infección (Figura 6). Así, estos resultados muestran que durante la fase aguda es posible detectar un mayor porcentaje de tejidos sólidos con el parásito que lo que se encontró durante la fase crónica y sugieren que el principal tropismo del aislado Y de *T. cruzi* en los ratones BALB/c durante la fase aguda es el corazón, colon y músculo esquelético.

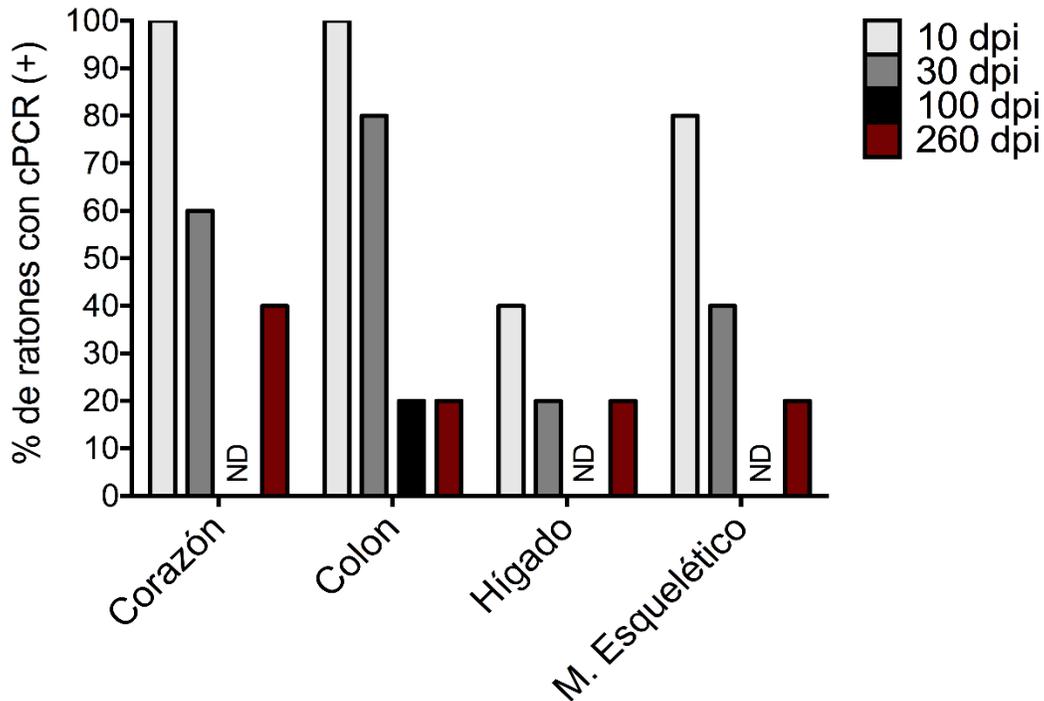


Figura 6. Porcentaje de muestras de corazón, colon, hígado y músculo esquelético con cPCR positiva obtenidas de ratones con infección aguda y crónica por *T. cruzi*. Cada barra representa el porcentaje total de ratones sometidos a eutanasia al día 10, 30, 100 y 260 post-infección en los que se detectó la presencia del parásito a partir de tejidos sólidos. ND: No detectable o ratones con PCR negativa

9. DISCUSIÓN

Los estudios moleculares y los perfiles genéticos han demostrado que *T. cruzi* presenta una gran variabilidad, compuesta por una amplia población de aislados que circulan entre hospederos mamíferos e insectos vectores. Estas poblaciones se han clasificado en 7 grupos genéticos conocidos como Unidades Discretas de Tipificación (DTU): TcI, TcII, TcIII, TcIV, TcV, TcVI y TcBat (3). En modelos experimentales y en humanos infectados con *T. cruzi*, se ha demostrado que los parásitos aislados de diferentes órganos son genéticamente distintos, lo que sugiere que la variabilidad genética de los aislados del parásito, podría explicar las diversas manifestaciones clínicas de la enfermedad de Chagas y las diferencias en morbilidad y mortalidad observadas en diferentes áreas geográficas (4). Por otro lado, el estudio del curso de la infección por *T. cruzi* en ratones ha resultado muy útil y ha generado avances importantes en el estudio de esta parasitosis, ya que los modelos experimentales controlados permiten analizar parámetros del hospedero y el parásito, lo que por razones prácticas y éticas no pueden realizarse en humanos (10). Así, teniendo en cuenta que a la fecha no existe un modelo experimental estandarizado y homogéneo para el estudio de la infección por *T. cruzi* en el Laboratorio de Parasitología Molecular de la Pontificia Universidad Javeriana, en el presente trabajo se buscó detectar la presencia de *Trypanosoma cruzi* en un modelo murino de infección aguda y crónica establecido en el Laboratorio de Parasitología Molecular, el cual permitirá continuar con el análisis de otros parámetros que podrían explicar la relación entre la detección del parásito y el desarrollo de la patología.

En el modelo murino evaluado, en sangre fue posible detectar la presencia del parásito en todos los ratones infectados y sometidos a eutanasia en fase aguda, en contraste con las muestras de sangre de ratones sometidos a eutanasia durante la fase crónica. Por otro lado, en los tejidos sólidos, en la mayoría de los ratones infectados se detectó la presencia del parásito durante la fase aguda que en muestras de tejidos de ratones sometidos a eutanasia durante la fase crónica, con un mayor porcentaje de detección en muestras de colon y corazón, seguido por músculo esquelético e hígado de ratones infectados con el parásito.

Reportes en la literatura muestran que tanto en humanos como en modelos murinos, la transición de la fase aguda a la fase crónica de la infección va acompañada de una disminución en el número de parásitos en sangre como consecuencia de la inducción de una respuesta inmune relativamente eficiente, que logra controlar la infección pero no eliminarla (32). De hecho, se ha descrito que la respuesta inmune innata y adaptativa juegan un papel crucial en el control de la infección por el parásito (33,34). Además, aunque en este estudio no se evaluó la virulencia del aislado Y de *T. cruzi* en comparación con otros aislados del parásito, se ha reportado que el aislado Y de *T. cruzi* muestra un cuadro más agresivo y agudo que aislados de *T. cruzi* (Tcl), los cuales presentan menor virulencia (11). En el modelo murino evaluado, en un mayor porcentaje de ratones con infección aguda (10 o 30 días post-infección) fue posible detectar la presencia del parásito en sangre y tejidos sólidos que el porcentaje en el que se detectó la presencia del parásito en ratones con infección crónica (100 o 260 días post-infección), lo cual podría sugerir que en ratones inmunocompetentes, se genera una respuesta inmune que podría controlar la infección pero no eliminarla, ya que se encontró la presencia del parásito en tejidos sólidos de ratones con infección crónica por *T. cruzi* (hasta 260 días post-infección).

En humanos, el diagnóstico de la infección por *T. cruzi* en fase aguda se realiza a través de examen microscópico de sangre anticoagulada o el método de microhematocrito para observar las formas móviles o tripomastigotes (2). Sin embargo, las pruebas serológicas no son útiles para el diagnóstico de la infección en esta fase de la enfermedad. En contraste, en la fase crónica de la enfermedad, debido a la parasitemia baja en sangre observada en individuos infectados, el diagnóstico se basa en la detección serológica de anticuerpos de tipo inmunoglobulina G (IgG) específica para antígenos de *T. cruzi*, ya que los métodos directos (parasitológicos) que se realizan en la fase crónica, suelen ser negativos en un 30 a 60 % de los pacientes (8). Así, durante la fase crónica, las técnicas serológicas más empleadas son la inmunofluorescencia indirecta (IFI), la hemoaglutinación indirecta (HAI) o el ensayo de inmunoenzimología (ELISA), las cuales utilizan antígenos del parásito completo o extractos purificados, como proteínas recombinantes (6). Sin embargo, dado que

ninguna de las pruebas alcanza un 100% de sensibilidad y especificidad, la OMS recomienda que para el diagnóstico de individuos con infección crónica por *T. cruzi*, se realicen 2 pruebas serológicas por métodos diferentes (5). No obstante, algunos estudios en humanos con enfermedad de Chagas y ratones experimentalmente infectados con el parásito (11,35,36), han utilizado técnicas basadas en biología molecular como la cPCR o la PCR cuantitativa (qPCR), las cuales presentan mayor sensibilidad analítica que los otros métodos mencionados anteriormente.

En humanos, el diagnóstico de la enfermedad de Chagas, basado en la detección del parásito, es complejo por la variabilidad genética del parásito, la variabilidad de la parasitemia en sangre y la historia natural de la enfermedad, que dificulta la obtención de muestras de tejidos de pacientes infectados para evaluar la presencia del parásito. Sin embargo, en humanos solo hay un estudio, desde lo que conocemos, que analice la carga parasitaria en un gran número de pacientes con infección aguda y crónica por *T. cruzi*, en el que se muestra que pacientes con infección aguda presentan una alta carga parasitaria comparado con individuos en fase crónica y que individuos con fase crónica indeterminada presentan mayor carga parasitaria que individuos en fase crónica determinada (37). De manera interesante, en el modelo murino evaluado, no se detectó la presencia del parásito en muestras de sangre de ratones sometidos a eutanasia al día 260, donde la infección es más crónica. Sin embargo, fue posible detectar la presencia del parásito en muestras de tejidos sólidos de ratones sometidos a eutanasia al día 260 post-infección. Así, aunque en el presente trabajo no se cuantificó la parasitemia en sangre o tejidos, estos hallazgos sugieren que posiblemente el parásito migre de sangre periférica a tejidos sólidos y la presencia del parásito podría estar relacionada con la patología de la enfermedad de Chagas o la infección crónica por *T. cruzi*.

Por otro lado, *T. cruzi* es un parásito genéticamente diverso en el que se han propuesto diferentes eventos de hibridación que han permitido al parásito ampliar su diversidad genética (3,38). A la fecha se han propuesto 7 grupos genéticamente distintos, en los que se han demostrado que dentro de cada grupo existen diferencias genéticas que podrían estar relacionadas con el ciclo de transmisión de la infección, las

formas clínicas de la enfermedad o el curso y desenlace de la infección (39). Por ejemplo, un estudio en ratones BALB/c infectados con 1×10^2 tripomastigotes de cultivo de una variante del aislado Y de Brasil sucumben rápidamente ante la infección comparado con lo observado en ratones BALB/c infectados con 1×10^6 tripomastigotes de cultivo de una variante del aislado Y de Estados Unidos (40). Además, otro aspecto importante que puede afectar el modelo de infección por *T. cruzi* es la dosis de infección. Un estudio con ratones BALB/c infectados con 50 tripomastigotes, mostró que a los 100 días post-infección es posible detectar mediante una PCR en tiempo real la presencia del parásito en muestras de ADN de corazón (12). Al comparar estos hallazgos con el modelo murino evaluado y entendiendo que muchos aspectos metodológicos o técnicos podrían explicar las diferencias de la detección del parásito en muestras de corazón, según lo observado, la diferencia más importante, es que aunque los ratones evaluados fueron infectados con una mayor cantidad de parásitos (1×10^5), no fue posible detectar la presencia del parásito bajo las condiciones experimentales utilizadas, en muestras de corazón de ratones infectados y sometidos a eutanasia a los 100 días post-infección. Por lo anterior, aunque estos hallazgos dificultan el estudio de la infección por *T. cruzi* en modelos animales, así como la interpretación de los resultados, elucidan la importancia de validar y estandarizar los modelos animales para microorganismos patógenos.

En este trabajo, al evaluar la presencia del parásito en muestras de ADN de corazón, colon, hígado y músculo esquelético de ratones con infección aguda y crónica, se evidenció tropismo del aislado Y por todos estos tejidos, siendo detectado en un mayor porcentaje de ratones, durante la fase aguda (10 o 30 días post-infección) que durante la fase crónica (100 o 260 días post-infección). Existen reportes en la literatura que, aunque no muestran el comportamiento en la totalidad de los tejidos evaluados en el presente trabajo, si muestran la presencia del parásito en otros tejidos sólidos de ratones infectados con el parásito durante las etapas tempranas. Por ejemplo, en ratones BALB/c infectados con el aislado Y durante los primeros 7 días post-infección, mediante un análisis histopatológico, se observó la presencia del parásito en hígado, cerebro, bazo, riñón, médula ósea, timo, intestino delgado y corazón (26). En cuanto

a etapas crónicas de la infección, otros estudios han mostrado que es posible detectar la presencia del parásito en corazón e hígado, así como en otros tejidos que no fueron considerados en este trabajo, como el pulmón y el riñón (12,25).

Previos hallazgos del grupo, muestran que la cPCR basada en los iniciadores S35-S36 (región variable del minicírculo del ADN del cinetoplasto), tiene una mayor sensibilidad analítica, ya que presenta un mayor número de moléculas blanco, es decir un mayor número de moléculas de ADN a las cuales se pueden anillar los cebadores en el genoma de *T. cruzi* al comparar con la cPCR basada en TcH2AF-R (Histona H2A y el elemento SIRE de *T. cruzi*) (11,31). Aunque en el presente trabajo no se determinó la sensibilidad analítica de ambas cPCR y teniendo en cuenta que con la cPCR basada en los iniciadores TcH2AF-R se detectó un mayor porcentaje de tejidos infectados comparado con el porcentaje de tejidos en los que se detectó la presencia del parásito con la cPCR basada en los iniciadores S35-S36, estos hallazgos sugieren que, bajo las condiciones experimentales evaluadas, la cPCR (TcH2AF-R) presentó una mayor sensibilidad analítica. No obstante, es importante mencionar que una de las principales limitaciones de este trabajo, es que no se realizaron diluciones de las muestras de ADN de cada uno de los tejidos, como se realizó en el estudio de Barrera y colaboradores (11), puesto que es un modelo animal controlado en el que no solo se pretende evaluar la presencia del parásito, si no que se cuantificará la carga parasitaria y necesariamente la concentración de las muestras de ADN, deben estar homogenizadas para realizar comparaciones. Además, aunque se detectó la presencia del parásito en el tejido en los ratones sometidos a eutanasia al día 260 post-infección, un bajo número de ratones fueron positivos por ambas cPCR, posiblemente esto se deba a la baja capacidad de detección o sensibilidad analítica que se encontró en el presente trabajo. Así, se espera que al realizar el análisis de la parasitemia en sangre y tejido por qPCR, se aumente la capacidad de detección de la presencia del parásito en estas muestras.

10. CONCLUSIÓN

En el modelo murino de infección aguda y crónica por *T. cruzi* establecido en el Laboratorio de Parasitología Molecular de la Pontificia Universidad Javeriana, se logró detectar el parásito en muestras de corazón, colon, hígado, músculo esquelético y sangre, siendo detectado en un mayor porcentaje de ratones con infección aguda, que ratones con infección crónica.

11. REFERENCIAS

1. Rassi A, Rassi A, Marcondes de Rezende J. American Trypanosomiasis (Chagas Disease). *Infect Dis Clin North Am.* 2012;26:275–91.
2. Bern C. Chagas' Disease. *N Engl J Med.* 2015;373:456–66.
3. Zingales B, Miles M, Campbell D, Tibayrenc M, Macedo A, Teixeira M, et al. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: Rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infect, Genet, Evol.* 2012;12:240-253.
4. Andrade L, Machado C, Chiari E, Pena S, Macedo A. Differential tissue distribution of diverse clones of *Trypanosoma cruzi* in infected mice. *Mol Biochem Parasitol.* 1999;100:163–72..
5. WHO. Chagas Disease (American Trypanosomiasis) (revised in Apr 24). WHO [Internet]. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/es/>
6. World Health Organization. Chagas Disease (American Trypanosomiasis) - factsheet (revised in August 2012). *Wkly Epidemiol Rec* [Internet]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23311009>
7. Navarro M, Navaza B, Guionnet A, López-Vélez R. Chagas Disease in Spain: Need for Further Public Health Measures. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012;6:1–5.
8. Molina I, Salvador F, Sánchez-Montalvá A. Actualización en enfermedad de Chagas. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2016;34:132–138.
9. Rassi A, Rassi A, Marin-Neto JA. Chagas disease. *Lancet.* 2010;375:1388–402.
10. Zuñiga C, Parra MAd, Vela H, Courceles MT, Vargas R, Vergara U. Estudio histopatológico en ratones infectados experimentalmente con *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol al día.* 1998;22:23–28.
11. Barrera Y, Guevara J, Pavía P, Montilla M, Nicholls R, Parra E, et al. Evaluation of TcH2AF-R and S35-S36 primers in PCR tests for the detection of

Trypanosoma cruzi in mouse cardiac tissue. Biomedica. 2008;28:616-626.

12. Sanoja C, Carbajosa S, Fresno M, Gironès N. Analysis of the Dynamics of Infiltrating CD4+ T Cell Subsets in the Heart during Experimental *Trypanosoma cruzi* Infection. PLoS ONE. 2013;8:e65820.
13. World Health Organization. Chagas disease in Latin America: an epidemiological update based on 2010 estimates. Wkly Epidemiol Rec. 2015;90:33–44.
14. Guhl F, Aguilera G, Pinto N, Vergara D. Actualización de la distribución geográfica y ecoepidemiología de la fauna de triatomíneos (Reduviidae : Triatominae) en Colombia. Biomédica. 2007;27: 143-162.
15. Herrera L. A review of reservoirs of *Trypanosoma* (Schizotrypanum) *cruzi* (Chagas , 1909), the etiologic agent of Chagas Disease. Boletín Malariol y salud Ambient. 2010;1:3–15.
16. Marcili A, Lima L, Cavazzana M, Junqueira A, Veludo H, Maia Da Silva F, et al. A new genotype of *Trypanosoma cruzi* associated with bats evidenced by phylogenetic analyses using SSU rDNA, cytochrome b and Histone H2B genes and genotyping based on ITS1 rDNA. Parasitol. 2009;136:641–655.
17. Pinto C, Kalko E, Cottontail I, Wellinghausen N, Cottontail V. TcBat a bat-exclusive lineage of *Trypanosoma cruzi* in the Panama Canal Zone, with comments on its classification and the use of the 18S rRNA gene for lineage identification. Infect Genet Evol. 2012;12: 1328-1332.
18. Del Puerto R, Nishizawa J, Kikuchi M, Iihoshi N, Roca Y, Avilas C, et al. Lineage analysis of circulating *Trypanosoma cruzi* parasites and their association with clinical forms of chagas disease in Bolivia. PLoS Negl Trop Dis. 2010;4:e687.
19. Flórez O, Esper J, Higuera S, Barraza M, Cabrera H, Mantilla J, et al. Chagasic megacolon associated with *Trypanosoma cruzi* i in a Colombian patient. Parasitol Res. 2010;107:439-442.
20. Guhl F, Ramírez J. Retrospective molecular integrated epidemiology of Chagas

- disease in Colombia. *Infect Genet Evol.* 2013;20:148–54.
21. Sánchez L, Bautista D, Corredor A, Herrera V, Martínez L, Villar J, et al. Temporal variation of *Trypanosoma cruzi* discrete typing units in asymptomatic Chagas disease patients. *Microbes Infect.* 2013;15:745–748.
 22. Brenière S, Waleckx E, Barnabé C. Over Six Thousand *Trypanosoma cruzi* Strains Classified into Discrete Typing Units (DTUs): Attempt at an Inventory. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016;10:1–19.
 23. Zuñiga C, Vargas R, Courcelles T, Vergara U. Infección experimental con *Trypanosoma cruzi* en machos y hembras de tres cepas de ratones. *Parasitol al día* .1997;21:85–91.
 24. Urzúa C, Morales M, Vergara U, Palau M, Zúñiga C. Sexo del hospedero y dosis infectante de parásitos como factores en el desarrollo de la infección con *Trypanosoma cruzi* en un modelo murino. *Parasitol Latinoam.*2004;59:104–119.
 25. Oliveira C, Picka M, Nicolette V, Calvi S, Marcondes J. Organ tropism during the acute and chronic phases of *Trypanosoma cruzi* infection in BALB / c mice. *J. venom anim toxins incl trop dis.*2012;18:34-43.
 26. Pinto P, Takami R, Nunes E, Guilherme C, Oliveira O, Gama J, et al. Life cycle of *Trypanosoma cruzi* (Y strain) in mice. *Rev. Hosp. Clín.*1999;54:141-146.
 27. Cruz L, Vivas A, Montilla M, Hernandez C, Florez C, Parra E, et al. Comparative study of the biological properties of *Trypanosoma cruzi* I genotypes in a murine experimental model. *Infect, Genet, Evol.* 2015;29:110-117.
 28. Schlegel M, Ali H, Stieger N, Groschup M, Wolf R, Ulrich R. Molecular identification of small mammal species using novel cytochrome b gene-derived degenerated primers. *Biochem Genet.* 2012;50:440–447.
 29. Pavía P, Cuervo C, Montilla M, Nicholls R, Puerta C. Diseño y estandarización de una prueba de PCR para la detección específica de *Trypanosoma cruzi*. *Rev Colomb Infect.* 2003; 7:129–136.

30. Sturm N, Degraeve W, Morel C, Simpson L. Sensitive Detection and Schizodeme Classification of *Trypanosoma Cruzi* Cells by Amplification of Kinetoplast Minicircle DNA-Sequences - Use in Diagnosis of Chagas-Disease. *Mol Biochem Parasitol.* 1989;33:205–214.
31. Pavia P. Caracterización molecular del elemento repetido disperso pequeño, SIRE, en las seis Unidades Discretas de Tipificación (DTU) de *Trypanosoma cruzi* y su aplicación en una prueba de PCR [Tesis doctoral]. Bogotá D.C: Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias, 2011.
32. Zúñiga C, Binder N, Paláu M, Larenas, J, Vergara, U. Edad del hospedero en la evolución de la infección experimental con *Trypanosoma cruzi* en un modelo murino. *Rev Ibero-Latinoamericana Parasitol.* 2012;71:23–33.
33. Bastos K, Barboza R, Sardinha L, Russo M, Alvarez J, Lima M. Role of Endogenous IFN- γ in Macrophage Programming Induced by IL-12 and IL-18. *J Interf Cytokine Res.* 2007;27:399–410.
34. Laucella S, Postan M, Martin D, Bolyn F, Albareda M, Alvarez M, et al. Frequency of Interferon- γ -Producing T Cells Specific for *Trypanosoma cruzi* Inversely Correlates with Disease Severity in Chronic Human Chagas Disease. *J Infect Dis.* 2004;189:909-918.
35. Duffy T, Cura C, Ramirez J, Abate T, Cayo N, Parrado R, et al. Analytical Performance of a Multiplex Real-Time PCR Assay Using TaqMan Probes for Quantification of *Trypanosoma cruzi* Satellite DNA in Blood Samples. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013;7:e2000.
36. Piron M, Fisa R, Casamitjana N, López P, Puig L, Vergés M, et al. Development of a real-time PCR assay for *Trypanosoma cruzi* detection in blood samples. *Acta Tropica.*2007;103:195-200.
37. Hernandez C, Cucunuba Z, Florez C, Olivera M, Valencia C, Zambrano P, et al. Molecular Diagnosis of Chagas Disease in Colombia: Parasitic Loads and Discrete Typing Units in Patients from Acute and Chronic Phases. *PLoS Negl*

Trop Dis. 2016;10:1–20.

38. De Freitas J, Augusto L, Pimenta J, Bastos L, Gonçalves V, Teixeira S, et al. Ancestral genomes, sex, and the population structure of *Trypanosoma cruzi*. PLoS Pathog. 2006;2: 226-235
39. Messenger L, Miles M, Bern C. Between a bug and a hard place: *Trypanosoma cruzi* genetic diversity and the clinical outcomes of Chagas disease. Expert Rev Anti Infect Ther. 2015;13:995–1029.
40. Bryan M, Guyach S, Norris K. Specific humoral immunity versus polyclonal B Cell activation in *Trypanosoma cruzi* infection of susceptible and resistant mice. PLoS Negl Trop Dis. 2010;4:e733.

12. Anexos

Anexo 1. Resultados de las cPCR basada en los iniciadores S35-36 y TcH2AF-R en muestras de sangre de ratones con infección aguda y crónica por *T. cruzi*.

Tejido	10 dpi		30 dpi		100 dpi		260 dpi	
	S35-S36	TcH2AF-R	S35-S36	TcH2AF-R	S35-S36	TcH2AF-R	S35-S36	TcH2AF-R
Sangre	4/5	5/5	5/5	2/5	0/5	2/5	0/3	0/3
Total	80 %	100 %	100 %	20 %	0 %	40 %	0 %	0 %

Anexo 2. Resultados de las cPCR basada en los iniciadores S35-36 y TcH2AF-R en muestras de corazón, colon, hígado y músculo esquelético de ratones con infección aguda y crónica por *T. cruzi*.

Tejidos	10 dpi		30 dpi		100 dpi		260 dpi	
	S35-S36	TcH2AF-R	S35-S36	TcH2AF-R	S35-S36	TcH2AF-R	S35-S36	TcH2AF-R
Corazón	5/5	5/5	0/5	3/5	0/5	0/5	0/3	2/5
Total	100 %	100 %	0 %	60 %	0 %	0 %	0 %	40 %
Colon	5/5	5/5	0/5	4/5	0/5	1/5	0/5	1/5
Total	100 %	100 %	0 %	80 %	0 %	20 %	0 %	20 %
Hígado	1/5	1/5	0/5	1/5	0/5	0/5	1/5	1/5
Total	20 %	20 %	0 %	20 %	0 %	0 %	20 %	20 %
Músculo esquelético	0/5	4/5	0/5	2/5	0/5	0/5	0/5	1/5
Total	0 %	80 %	0 %	40 %	0 %	0 %	0 %	20 %