



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

“METILACIÓN GLOBAL EN LA
INFECCIÓN EXPERIMENTAL AGUDA
IN VIVO DE *Trypanosoma cruzi*”

TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE
MAESTRO EN BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA
MOLECULAR

EDGAR ALEJANDRO FLORENTINI

CARRANZA

LIMA – PERÚ

2019

ASESOR

Dr. Holger Maita Malpartida

JURADO DE TESIS

Dra. Manuela Verástegui Pimentel

PRESIDENTE

Dra Maritza Calderón Sánchez

VOCAL

M.Sc. Teresa Barreto Gaviria

SECRETARIA

DEDICATORIA

Este trabajo se lo dedico a mis padres, por su inmenso apoyo en los momentos
más difíciles.

A Biankita, quien nunca le hizo daño a nadie en este mundo.

AGRADECIMIENTOS

- A Noelia Angulo, por su invaluable apoyo, observaciones críticas y ayuda científica en la elaboración de este trabajo.
- A los Investigadores Principales del LID, por ser permeables a muchas ideas, dar consejos racionales y siempre estar disponibles.
- A mis amigos de la UPCH: Romeo, Gerardo, Edith, por tantos momentos valiosos.

FUENTES DE FINANCIAMIENTO

Proyecto 5R01AI087776-05 (NIH) concedido al Dr. Robert Gilman, investigador principal del Laboratorio de Enfermedades Infecciosas.

METILACIÓN GLOBAL EN LA INFECCIÓN EXPERIMENTAL AGUDA IN VIVO DE *Trypanosoma cruzi*

INFORME DE ORIGINALIDAD



FUENTES PRIMARIAS

1	core.ac.uk Fuente de Internet	<1%
2	microbialcell.com Fuente de Internet	<1%
3	Submitted to University of Leeds Trabajo del estudiante	<1%
4	digital.library.adelaide.edu.au Fuente de Internet	<1%
5	edoc.ub.uni-muenchen.de Fuente de Internet	<1%
6	academic.oup.com Fuente de Internet	<1%
7	www.frontiersin.org Fuente de Internet	<1%
8	scmm.utmb.edu Fuente de Internet	<1%
9	Submitted to University of Edinburgh Trabajo del estudiante	<1%

TABLA DE CONTENIDOS

RESUMEN

ABSTRACT

I.	INTRODUCCIÓN	1
II.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	3
III.	MARCO TEÓRICO	4
a.	La Enfermedad de Chagas: historia, presentación y distribución	4
b.	Biología del parásito <i>Trypanosoma cruzi</i>	7
c.	Determinantes de la fase crónica.....	9
d.	La infección sistémica	10
e.	Respuesta inmune e inflamación.....	11
f.	Daño oxidativo	14
g.	La epigenética.....	15
h.	La metilación del DNA	19
i.	Aspectos epigenéticos de las infecciones	22
j.	Infecciones bacterianas, virales y protozoarias	23
IV.	JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO	30
V.	OBJETIVOS	31
a.	Objetivo General	31
b.	Objetivos Específicos	31

VI. HIPÓTESIS	32
VII. METODOLOGÍA	32
a. Diseño experimental	32
b. Infección experimental	34
c. Evaluación de la parasitemia pre-necropsia	34
d. Necropsia	35
d. Microconcentración	36
e. PCR	36
f. Histopatología	36
g. Análisis de la metilación global	37
h. Inmunohistoquímica para la visualización de 5-mC	39
h. Cuantificación de la señal inmunohistoquímica	40
i. Análisis estadístico	41
j. Variables del estudio y operacionalización	42
VIII. RESULTADOS	43
a. Muestras analizadas	43
b. Confirmación de la infección en el modelo animal mediante microconcentración.	44
c. Confirmación de la infección en el modelo animal mediante qPCR	46
d. Metilación Global	48
e. Histopatología	49

f. Inmunohistoquímica comparativa de 5-metilcitosina (5-mC).....	51
IX. DISCUSIÓN	58
X. CONCLUSIONES	68
XI. RECOMENDACIONES.....	69
XII. BIBLIOGRAFÍA	70
XIII. ANEXOS	

RESUMEN

La enfermedad de Chagas, causada por el protozooario kinetoplástico *Trypanosoma cruzi*, representa un problema mayor de salud pública, ya que afecta a aproximadamente 10 millones de individuos y reviste una carga significativa de morbilidad y mortalidad debido a que en un tercio de pacientes infectados se desarrollan cardiopatías agresivas y a veces fatales. Se han reportado en distintas enfermedades infecciosas y no infecciosas modificaciones del nivel normal de metilación total del DNA genómico; muchas de éstas están vinculadas a patologías graves como fibrosis, cáncer e inflamación, y su estudio se enmarca dentro de la epigenética. El propósito de este estudio fue investigar si existen modificaciones del estatus de metilación global en tejido cardíaco de ratas de experimentación infectados con *Trypanosoma cruzi*, durante la fase aguda. Se infectaron experimentalmente ratas con la cepa Y (TcII) o la cepa C300 (TcI) más un grupo control (no infectado). Sólo la cepa C300 causó hipometilación significativa en el tejido cardíaco, detectado por inmunohistoquímica cuantitativa. La cuantificación de metilación global basada en ELISA no fue sin embargo, capaz de detectar cambios globales, probablemente debido al patrón multifocal tisular de la enfermedad de Chagas, y tampoco hubo correlación significativa con la carga parasitaria (medida por qPCR). Los resultados sugieren que *T. cruzi* podría, directa o indirectamente, alterar el estado de metilación global del hospedero, añadiendo un mecanismo más al arsenal patofisiológico de la enfermedad.

Palabras clave: 5mC, Chagas, *Trypanosoma cruzi*, metilación global, epigenética

ABSTRACT

Chagas disease, caused by the kinetoplastid protozoan *Trypanosoma cruzi*, represents a major public health problem, since it affects approximately 10 million individuals and carries a significant burden of morbidity and mortality due mainly to the fact that it causes in a third of infected patients aggressive heart disease, sometimes with fatal outcomes. Modifications of the normal level of total methylation of genomic DNA have been reported in different infectious and non-infectious diseases pathologies; many of these are linked to serious pathologies such as fibrosis, cancer and inflammation, and its study is framed within epigenetics. The purpose of this study was to investigate if there are modifications of the global methylation status in cardiac tissue of experimental rats infected with *Trypanosoma cruzi*, during the acute phase. - Two groups of rats were experimentally infected with either the *T. cruzi* Y strain (TcII) or C300 strain (TcI) and together with a noninfected control group. Of the two strains, only the C300 caused significant hypomethylation in cardiac tissue, detected by immunohistochemistry. The quantification of global methylation based on ELISA was not, however, able to detect global changes, probably due to the multifocal tissue pattern of Chagas, and there was no significant correlation with parasitic load (measured by qPCR). The results suggest that *T. cruzi* can, directly or indirectly, alter the state of global host methylation, adding one more mechanism to the pathophysiological arsenal of the disease.

Key words: 5mC, Chagas, *Trypanosoma cruzi*, global methylation, epigenetics

I. INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas, principal causante de cardiopatía crónica en Latinoamérica, es considerada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) una enfermedad desatendida, y no es considerada como prioridad ni siquiera en los países endémicos. A más de 100 años de la descripción de la enfermedad junto a la de su agente etiológico, el protozooario *Trypanosoma cruzi* (Chagas 1909), y a pesar de esfuerzos puntuales a lo largo de 20 años por diferentes grupos para desarrollar vacunas (Quijano-Hernandez y Dumonteil 2011) hasta el momento no existe ninguna vacuna disponible comercialmente. El tratamiento de los pacientes se basa en farmacoterapia desarrollada en los años 1960's, con Nifurtimox (Bayer) y Benznidazole (Roche), ambos con efectos secundarios potencialmente serios. El tratamiento es sólo efectivo en la fase aguda, que es muchas veces asintomática, lo que ha limitado el control clínico de la enfermedad (Bern 2011). La mayor reducción de casos se debe al control por insecticidas de los vectores, principalmente triatomíneos sinantrópicos. En el desarrollo moderno de terapias, la secuencia convencional de trabajo inicia por el entendimiento de los mecanismos de la patología (lo cual permite también tecnificar una diagnosis) y el planteamiento de dianas para el tratamiento y diagnóstico (Kim *et al* 2011). En el caso de la enfermedad de Chagas, los esfuerzos han estado limitados por el bajo influjo de fondos característico de las enfermedades desatendidas, y los logros en el entendimiento de su intrincada patogénesis son moderados e insatisfactorios (Marin-Neto *et al* 2007; Ba *et al* 2010).

El presente estudio pretende aportar al entendimiento de la enfermedad, mediante un diseño de tipo experimental, cuantitativo, transversal, que empleará un modelo animal (*Rattus norvegicus*) y explorará si existen alteraciones de la metilación global de DNA nuclear (un biomarcador reciente de diversas patologías), en el tejido cardiaco (principal tejido afectado) de los animales infectados experimentalmente.

Los resultados potenciales generan la posibilidad de describir nuevas rutas no antes descritas en la patogénesis, y aportar a los actuales correlatos de pronóstico (biomarcadores predictivos) de esta enfermedad olvidada, así como plantear estudios adicionales y más detallados de mecanismos patoepigenéticos.

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El mal de Chagas afecta a toda Latinoamérica, y en el caso de Perú, ésta se presenta en las poblaciones rurales, principalmente en las regiones sudoccidental, norte, y nororiental, específicamente Piura, Cajamarca, Amazonas, Arequipa, llegando a posiblemente unos 665 mil infectados a nivel nacional (Náquira y Cabrera 2009). Siendo una enfermedad desatendida, urgen iniciativas en todas las áreas biomédicas: investigación clínica, epidemiológica y experimental. *T. cruzi*, al poder infectar a más de 100 mamíferos, es virtualmente inextinguible. Las estrategias deben entonces basarse en preparar a las poblaciones humanas para minimizar la exposición al parásito: mediante el control de los vectores (insectos hematófagos), y reservorios domésticos (perros, cuyes), diseño de vacunas, elaboración de nuevos fármacos antiparasitarios, así como el descubrimiento de nuevos aspectos de la patogénesis. Este estudio pretende aportar en este último rubro, y sus potenciales repercusiones no serían necesariamente a largo plazo como el descubrimiento de nuevos fármacos para dianas moleculares (que podría llegar a más de una década) (Johnston 2009) sino por ejemplo a través de vías rápidas y accesibles a poblaciones desfavorecidas, como el reposicionamiento de drogas ya usadas y aprobadas para otras enfermedades (Gloeckner *et al* 2010). En ese sentido, no se conocen estudios referentes a anomalías epigenéticas en el hospedero durante la infección y este estudio pretende iniciar esa línea de investigación.

III. MARCO TEÓRICO

a. La Enfermedad de Chagas: historia, presentación y distribución

La enfermedad de Chagas es una infección debilitante y de por vida que es causada por el parásito kinetoplástido *Trypanosoma cruzi*. Este parásito probablemente ya infectaba mamíferos salvajes antes de la llegada de las primeras migraciones humanas a América del Sur hace al menos 9 mil años (Aufderheide *et al* 2004). El parásito, que es transmitido por insectos hematófagos de la familia Reduviidae, comenzó a infectar mamíferos domésticos y poblaciones humanas cuando estos insectos se adaptaron al entorno domiciliario, que fue cada vez más accesible a medida que la deforestación avanzó, especialmente en los últimos trescientos años (Coura y Vinas 2010). Después de un periodo de incubación que puede durar de una semana a un mes, un tercio de los pacientes mostrarán síntomas inespecíficos de la infección, como dolor abdominal, anorexia, fiebre, adenopatía linfática, malestar general, e hinchazón en el lugar de la picadura (Engman y Leon 2002). Esta etapa de la enfermedad se denomina aguda y tiene una mortalidad de hasta 10%, generalmente por miocarditis aguda o meningoencefalitis especialmente en infantes (Coura 2007). Sin embargo, la mayoría de individuos infectados con *T. cruzi* se volverán portadores asintomáticos de la enfermedad con parasitemia mínima o indetectable, aun cuando hayan anticuerpos contra *T. cruzi* y DNA del parásito detectables y circulando. Tras varias décadas en el estadio indeterminado de la enfermedad, durante el cual no habrán signos evidentes de daño orgánico o resultados electrocardiográficos obviamente anormales, entre un 25 y 30% de los pacientes desarrollarán la fase crónica de la enfermedad, caracterizada por una

cardiomiopatía dilatada, así como el desarrollo de desórdenes gastrointestinales, siendo los más prominentes megacolon y megaesófago (Fig. 1) (Matsuda *et al* 2009). Esta enfermedad afecta aproximadamente a 10 millones de individuos (2% de Latinoamérica)(Fig. 2), con cerca de 80 millones de personas en riesgo, 41 mil nuevos casos al año y una mortalidad anual de 50 mil (Strosberg *et al* 2007; WHO 2007). Asimismo, la migración humana ha causado infecciones en países no endémicos (Fig. 3), con un estimado de 300 mil pacientes con enfermedad de Chagas viviendo solo en Estados Unidos (Schmunis y Yadon 2010). Gracias a iniciativas regionales, que han incluido interrumpir los ciclos de transmisión peridomésticos y domésticos mediante el control químico de vectores (principalmente triatómíneos), control de reservorios animales, educación en salud, mejoramiento en condiciones de vivienda y manejo de pacientes infectados, la prevalencia ha disminuido hasta en un 50% desde 1990 (WHO 2007).

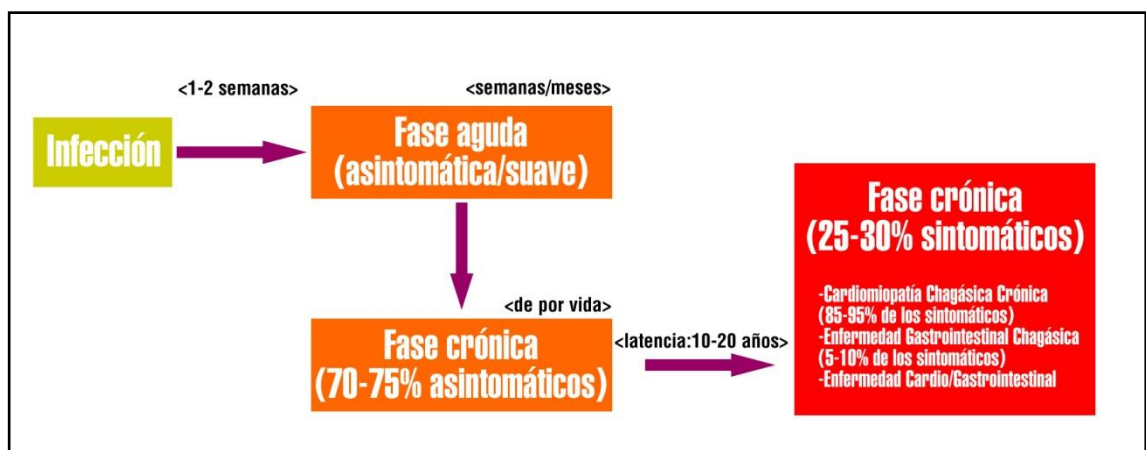


Figura 1 . Evolución temporal de la infección de *T. cruzi* desde la infección hasta la fase crónica sintomática (Adaptado de (Munoz-Saravia *et al* 2012)).

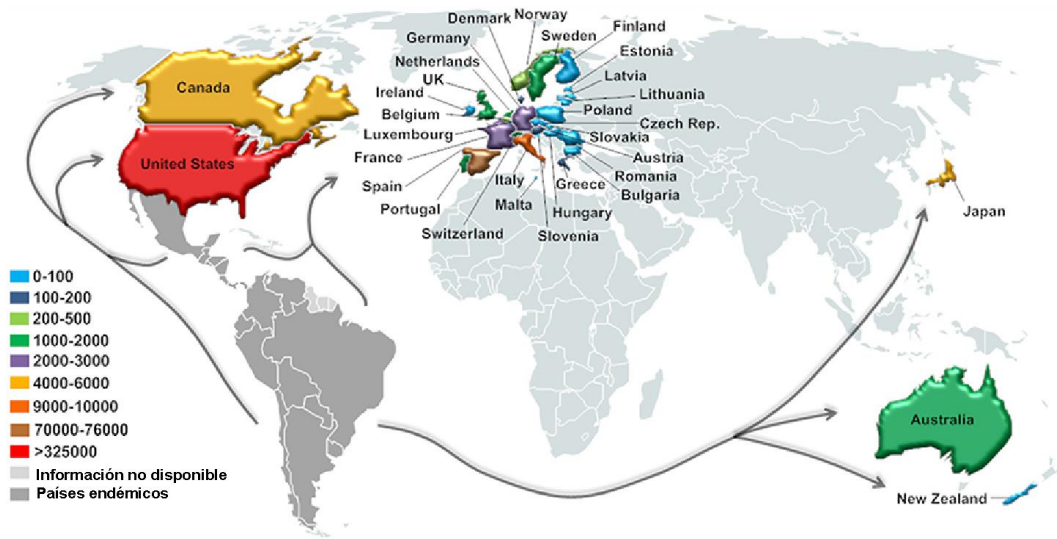


Figura 2. Estimado actual de inmigrantes infectados con *T. cruzi* en países no endémicos. (Adaptado de (Lidani *et al* 2019)).

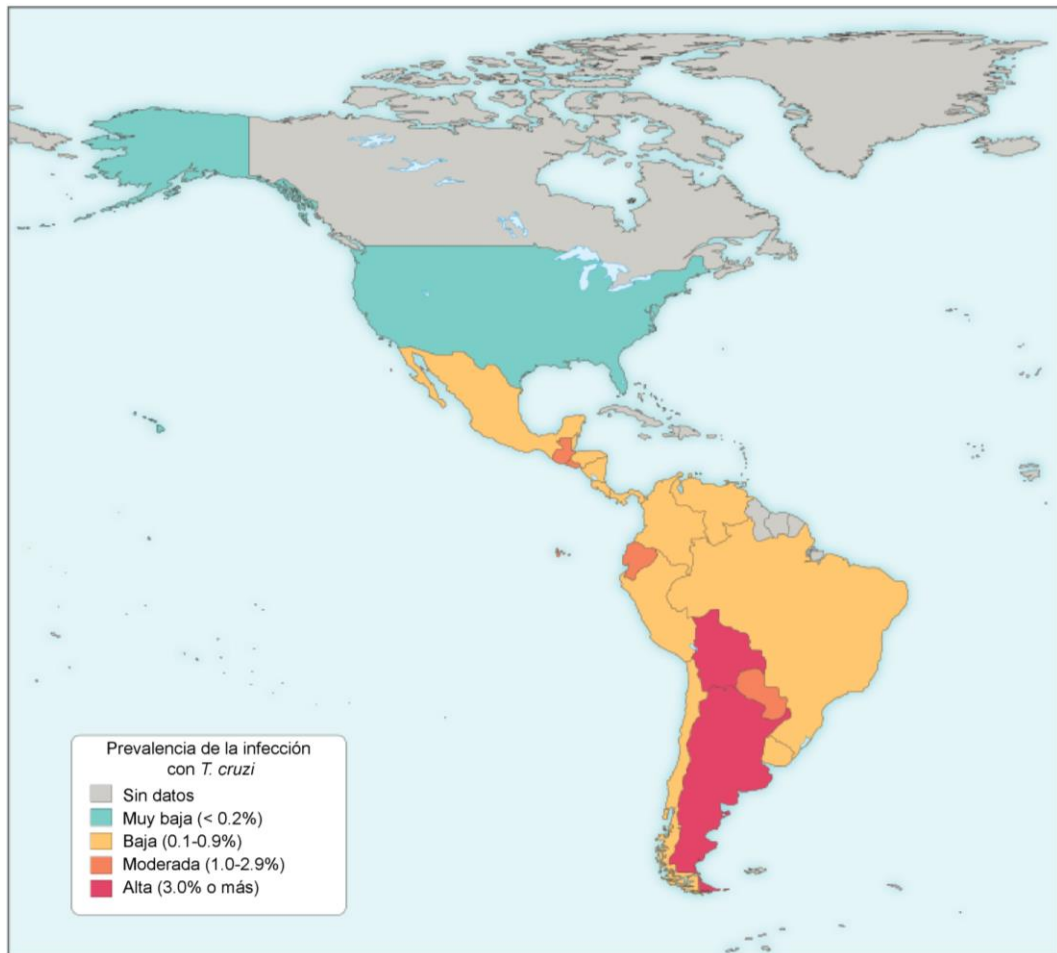


Figura 3. Prevalencias estimadas de la infección con *T. cruzi* (Adaptado de (Bern 2015)).

b. Biología del parásito *Trypanosoma cruzi*

El parásito flagelado *T. cruzi* posee un ciclo de vida digenético, es decir, se desarrolla tanto en dos hospederos: vertebrados e invertebrados, dentro de los cuales diferentes estadios surgen (Fig. 4). En el hospedero vertebrado es un parásito intracelular obligado, por lo cual ocupar esta localización se vuelve crítico para la manutención de la infección. El estadio del ciclo de vida del parásito que tiene la capacidad de invadir células de vertebrados (especialmente mamíferos) es el tripomastigote, el cual puede ser tripomastigote metacíclico (del griego μετά “en medio” del ciclo) al ser transmitido al hospedero tras la picadura del insecto vector, o tripomastigote sanguíneo, que proviene de infectar otras células del hospedero mamífero y circula en su torrente sanguíneo. Este estadio tripomastigote (“*taladro-látigo*”) no tiene capacidades replicativas, y es capaz de infectar virtualmente cualquier tipo celular mamífero nucleado. Una vez dentro de la célula, el parásito queda inicialmente albergado en una vacuola parasitófora, pero luego escapa al citosol y se diferencia en múltiples amastigotes que pueden llegar a ocuparlo por completo (Fig. 4-G).

Ç

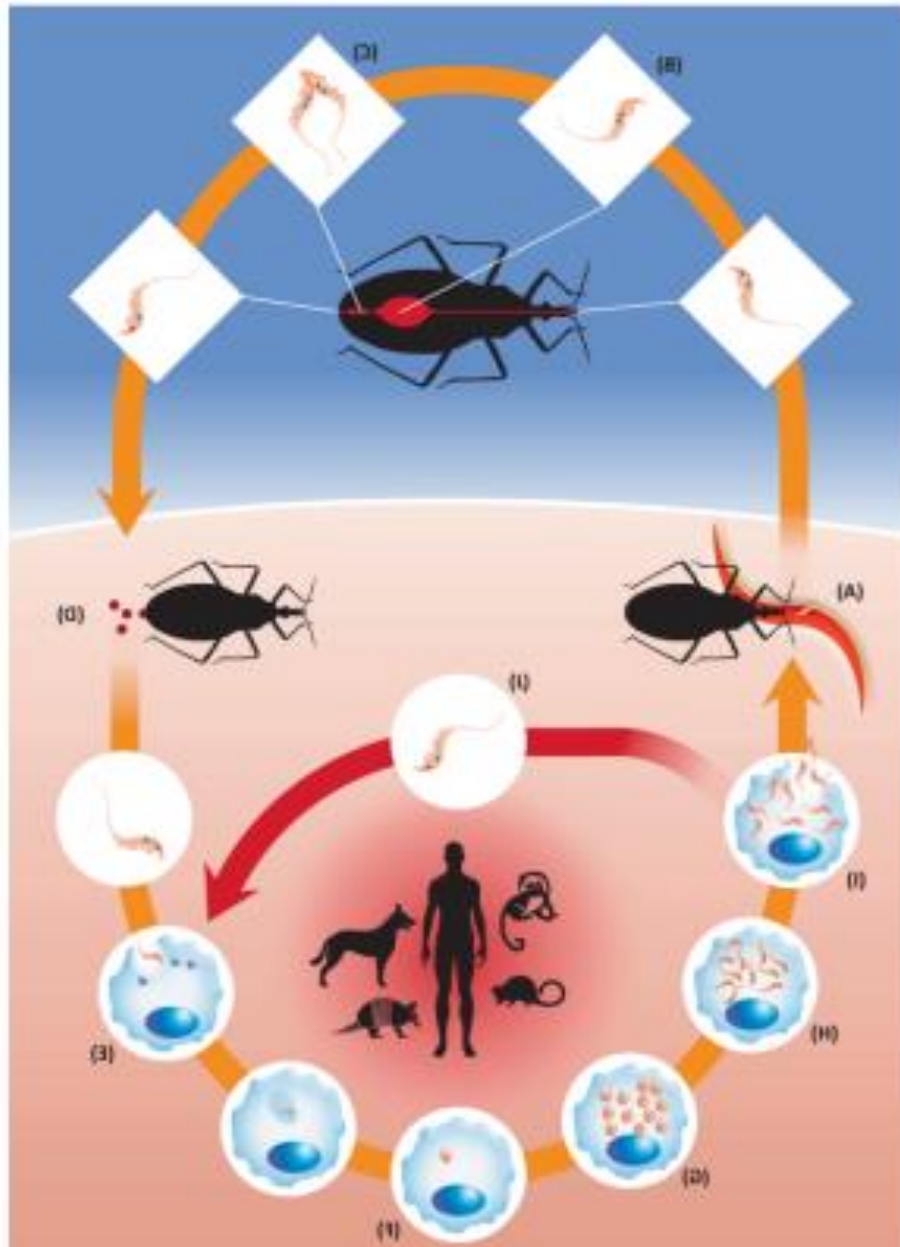


Figura 4. El ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*: (A) insecto triatomíneo consumiéndose sangre contaminada de un hospedero mamífero infectado, (B) diferenciación de tripomastigotes sanguíneos en epimastigotes, (C) replicación en el tracto digestivo del insecto vector, (D) diferenciación hacia tripomastigotes metacíclicos que son defecados al momento de picar a un hospedero mamífero, (E) los cuales infectan células del hospedero, (F) donde se diferencian hacia amastigotes, (G) los cuales se replican por fisión binaria, (H) se diferencian hacia tripomastigotes sanguíneos, (I) y lisan la célula que los contiene, (J) para seguir infectando células del hospedero, o ser transferidos al insecto vector mediante picadura (A). Tomado de (Perez et al 2014)

En este punto comienza la diferenciación, por razones desconocidas, hacia tripomastigotes sanguíneos (no metacíclicos) que ocupan mayor volumen, tienen elevada motilidad y terminan lisando las células desde adentro (Fig. 4 - I) para escapar al torrente sanguíneo y reinfectar a otras células vecinas, (Fig. 4 - J) o, al estar distribuido sistémicamente, ser absorbidos por insectos vectores hematófagos y perpetúen la transmisión a nuevos hospederos. En el estómago de estos insectos vectores estos tripomastigotes sanguíneos se diferencian hacia epimastigotes, los cuales sí pueden replicarse. Si bien la mayoría de epimastigotes muere por los ácidos digestivos del insecto, los parásitos sobrevivientes llegan a la parte final del tracto digestivo (el recto) donde se diferencian hacia tripomastigotes nuevamente pero esta vez, metacíclicos, que están presentes en sus heces (Kollien *et al* 2001). El insecto reduvio vector, principalmente de los géneros *Triatoma*, *Pastrongylus* y *Rhodnius* en el Perú (INS 2005), es hematófago y se ha adaptado a alimentarse de vertebrados, adoptando vida nocturna y con una picadura por lo general indolora. Tras la picadura, el insecto defeca muy cerca de la herida y la persona puede inadvertidamente inocularse al rascarse. De esta manera, el ciclo de vida del parásito queda completo.

c. Determinantes de la fase crónica

La cardiomiopatía chagásica, representativa de la fase crónica, es muy agresiva, dilatada (hinchamiento de las cámaras del órgano y adelgazamiento de sus paredes), de naturaleza inflamatoria, acompañada de una fibrosis progresiva, con eventos trombo-embólicos, autoinmune y con pronóstico pobre (alrededor de la mitad de supervivencia a 2 años, comparada con cardiomiopatías de etiología no inflamatoria)

(Bestetti y Muccillo 1997), que daña tanto el sistema cardioeléctrico como el miocardio en su totalidad (aurículas y ventrículos) (Marin-Neto *et al* 2007). Las causas exactas determinantes de este desenlace siguen siendo elusivas. La enfermedad es muy compleja en su patogénesis y solo se entiende parcialmente; el consenso actual es que la enfermedad es compleja y multifactorial, con muchas vías que interactúan entre ellas. La evidencia indica que el cuadro crónico es el resultado de una combinación de daño neurológico y celular causado directamente por el parásito (Prata 2001), así como daño secundario debido a la respuesta inmune inflamatoria crónica, daño oxidativo (Vyatkina *et al* 2004) y autoinmunidad causada tanto por la continua exposición (modelo inmunológico del “peligro”) a autoantígenos que normalmente están escondidos (Tveita 2010; Nagajyothi *et al* 2012), el grado de similaridad (mimetismo molecular) que existe entre las moléculas del parásito y del hospedero (Cunha-Neto *et al* 2006); como a la persistencia prolongada del parásito aun cuando sea en condiciones de muy baja parasitemia tisular (Nagajyothi *et al* 2012). Factores como la dosis infectiva, la ruta de transmisión, el número de reinfecciones, la respuesta inmune inicial (Sanchez *et al* 2014), el genotipo del parásito y el hospedero (Andersson *et al* 2003) tendrían una influencia significativa en la evolución de la enfermedad.

d. La infección sistémica

Una vez que el parásito entra en las células del hospedero, la primera barrera de detención será conformada, probablemente, por células epiteliales (Chiribao *et al* 2014). Secuencialmente, el parásito inicia rápidos programas de adhesión y penetración en las células circundantes. Eventualmente, llega a vasos sanguíneos,

donde se inicia el proceso de transmigración endotelial (Coates *et al* 2013). Siendo la transmigración celular tan altamente regulada, se deduce que *T. cruzi* es capaz de subyugar y modular las vías de señalización correspondientes. Coates *et al* (2013) confirmaron esta suposición al ver que bradiquinina, quinínógeno y cruzipaína eran necesarios para la transmigración en un modelo in vitro de endotelio. Una vez que atraviesa esta zona, el parásito atraviesa la matriz extracelular con proteasas propias (por ejemplo, cruzipaína) (Santana *et al* 1997). Además de esto, el proceso reactivo de inflamación también estimula la degradación de la matriz extracelular, a cargo de metaloproteinasas (MMPs, *matrix metalloproteinases*) (Geurts *et al* 2012). Este último evento, cuya función normal es facilitar el acceso a los leucocitos y también atraerlos, contribuye con el tiempo al daño tisular y también facilita la invasión parasitaria (Marino *et al* 2003). Al acceder al torrente sanguíneo, *T. cruzi* consigue acceso a, virtualmente, todos los tejidos del hospedero, y proliferará especialmente en aquellos hacia los que presenta tropismo significativo.

e. Respuesta inmune e inflamación

La mayoría de infecciones agudas de patógenos intracelulares despierta el perfil Th1 en el hospedero (Berger 2000) y la infección con *T. cruzi* no es la excepción. El perfil Th1, definido por la predominancia de linfocitos CD4+ CD8- que expresan citoquinas tipo Th1, es decir proinflamatorias, inductoras de respuestas autoinmunes, y con interferón gamma como la citoquina representativa, puede producir, si es mantenido a lo largo del tiempo, serio daño tisular (a diferencia del perfil de expresión Th2, que es inmunotolerante). Es posible, pues, que la

persistencia del parásito estimule de manera continua el sistema inmune innato y lo oriente hacia un perfil Th1 permanente. Este equilibrio puede durar por el resto de la vida. Al ser un proceso activo por parte del hospedero, si ocurriera inmunosupresión, se observará rápido retorno de la parasitemia y nuevamente presentación de la fase aguda.

Las primeras líneas celulares en enfrentar activamente al parásito son probablemente células residentes tisulares de la línea monocítica, las cuales, junto con otras (neutrófilos, mastocitos, células NK) poseen receptores tipo *Toll* (Kawai y Akira 2011) (*Toll-like receptors*, TLRs) que son capaces de reconocer elementos distintivos del patógeno. Estas vías, iniciadas por distintas moléculas del patógeno, convergen río abajo en la activación de, principalmente la vía NF- κ B, la cual dirige la liberación de citoquinas y quimioquinas proinflamatorias, y moléculas adhesivas que permiten a los linfocitos y monocitos infiltrarse hacia los tejidos y ejercer su rol defensivo *in situ*. Otros linfocitos, como las células T regulatorias, caracterizadas como CD25⁺CD4⁺FOXP3⁺, que normalmente suprimen eventos inflamatorios modulando a otros linfocitos, ocurren en mayor frecuencia en los tejidos de infectados asintomáticos que en infectados cardiacos (de Araujo *et al* 2011), sumándose a las evidencias de que la enfermedad de Chagas, al menos en gran parte, se explica por un perfil Th1, encabezado por IFN- γ , que comienza a dañar los tejidos hasta la pérdida de función y muerte del individuo. Pero ¿Qué es lo que ocasiona que algunos pacientes “sobrerreaccionen” a la infección? Probablemente, entre otros arriba señalados, sean los polimorfismos genéticos, especialmente en genes vinculados a la respuesta inmune innata. Lamentablemente, asumiendo que esto sea cierto, caracterizar todos los polimorfismos y asociarlos a

una probabilidad de fenotipo de la enfermedad (asintomático, cardíaco, gastrointestinal) es una tarea monumental dada la gran cantidad de variables (Drigo *et al* 2006; Frade *et al* 2013).

La inflamación aguda puede considerarse fisiológicamente correcta, mientras que la inflamación crónica es *necesariamente* anormal y patológica. En la enfermedad de Chagas, esta inflamación es medular, ya que es protagonista en los dos signos más severos del mal: el compromiso cardíaco y gastrointestinal. Durante el proceso inflamatorio, se liberan grandes cantidades de mediadores solubles, como aminas, lípidos mediadores, complemento, derivados reactivos de oxígeno y nitrógeno, moléculas de adhesión, citoquinas y quimioquinas (Golgher y Gazzinelli 2004). Este proceso tendrá un balance positivo y beneficioso para el individuo si es corto en duración; sin embargo, en la enfermedad de Chagas, existe una respuesta inflamatoria muy intensa (aunque probablemente necesaria para erradicar la mayoría de la infección) y sostenida. El hospedero debe regular finamente esta respuesta hasta alcanzar un equilibrio, y en el proceso de hacerlo, el parásito nunca es completamente eliminado, refugiándose intracelularmente en ciertos órganos además del tejido cardíaco, como por ejemplo el tejido adiposo (Nagajyothi *et al* 2009). La infección, salvo en casos extremadamente raros (Dias *et al* 2008) no se cura de manera espontánea y es de por vida. La autoinmunidad, otro de los signos clásicos de la enfermedad, probablemente es consecuencia de esta sobrereactividad así como de la similitud (mimetismo molecular) entre moléculas del parásito y del hospedero (Cunha-Neto *et al* 2006).

f. Daño oxidativo

A medida que el daño producido por la enfermedad se sostiene en el tiempo (durante la fase crónica), la sobreliberación crónica de agentes prooxidantes termina por afectar la función cardíaca. Diversos estudios en modelos experimentales y pacientes infectados demuestran que un hospedero infectado sufre estrés oxidativo debido a que la respuesta a la infección estimula la actividad de oxigenasas como la NADPH oxidasa y producción de radicales libres de oxígeno (ROS, *reactive oxygen species*). La depresión de estos eventos, inducida experimentalmente por bloqueadores, incrementa la susceptibilidad a la infección, demostrando su importancia. Nuevamente, el problema radica en que los tejidos del hospedero también se dañarán, con el tiempo, por este entorno pro-oxidativo. El sistema de defensa antioxidante clásico en mamíferos, constituido por GPX (glutación peroxidasa), GSR (Glutación disulfitoreductasa), y GSH (Glutación reducido), permite ciertos niveles de protección al hospedero en la fase aguda, pero en la fase crónica la constante liberación de ROS y otros factores pro-oxidantes sobrepasa este sistema de defensa (Wen y Garg 2004). De esta manera, individuos seropositivos con el tiempo comienzan a mostrar un perfil pro-oxidante sistémico y con actividad GPX disminuida y baja concentración de GSH (de Oliveira *et al* 2007) así como incapacitamiento del complejo III de la cadena transportadora de electrones mitocondrial (Wen *et al* 2006).

¿Significaría esto que elevar la actividad antioxidante podría paliar los signos de la enfermedad cardíaca? Dhiman *et al* (2013) (Dhiman *et al* 2013) infectaron ratones transgénicos que sobreexpresaban la enzima superóxidodismutasa de manganeso

(MnSOD) con resultados impactantes: una prevención significativa del daño oxidativo e incluso una evidente disminución del remodelamiento tisular característico de la cardiopatía. Estos resultados superaron a los de un estudio anterior donde se administró oralmente el antioxidante alfa-fenil-tert-butilnitrona y si bien se observó preservación de la integridad mitocondrial y la eficiencia de su cadena transportadora de electrones, aún se observó la presencia de perjudiciales ROS citoplasmáticos (Wen *et al* 2006). Es posible asumir, por tanto, que el daño oxidativo es un componente muy importante de la patogénesis, cumpliendo las biomoléculas del hospedero que están oxidadas en forma de aductos el rol de alarminas (Bianchi 2007) que estimulan la llegada de fagocitos al sitio del daño. Sin embargo, no se puede dejar de lado que la masiva administración de antioxidantes también podría beneficiar al parásito, ya que es necesario un entorno pro-oxidante para ser eliminado (Cardoni 1997) y el propio parásito tiene en su proteoma enzimas antioxidantes que le ayudan a tolerar el embate inmunológico del hospedero y sobrevivir (Piacenza *et al* 2013).

g. La epigenética

La epigenética puede definirse como el estudio de alteraciones estables en la expresión potencial de genes, surgiendo estas alteraciones durante el desarrollo y la proliferación celular, o también como alteraciones en la función del DNA pero sin modificaciones en la secuencia en sí. Dentro del estudio de la expresión de genes y sus repercusiones en los organismos, el nivel epigenético es sin duda el aspecto más inexplorado y reciente. Aunque el concepto general de epigenética se intuía desde mucho antes (Waddington 1942), la demostración concreta de su participación

como un componente modulador de muchos procesos fisiológicos normales y patológicos es reciente.

Los mecanismos exactos de los cambios epigenéticos giran alrededor de la modificación química del DNA (principalmente metilación del DNA, ver más abajo) y sus proteínas asociadas (siempre sin alterar la secuencia nucleotídica) por el organismo: esto sirve como una estrategia de reprogramación útil para modular procesos esenciales de su desarrollo y funcionamiento. Debido a que el epigenoma es afectado por el medio ambiente, sufre alteraciones como consecuencia de envejecimiento, enfermedad, y exposición a agentes tóxicos. Al parecer, estas alteraciones pueden ser transmitidas de una división celular a la siguiente y esto repetirse por varias generaciones celulares (Feinberg 2008; Meeran *et al* 2010).

Un ejemplo concreto está representado por el estudio de los efectos transgeneracionales de la dieta: mujeres embarazadas afectadas por el denominado periodo de hambruna holandés (1944-1945) en su primer trimestre, tuvieron una descendencia cuyo nivel de metilación del gen factor 2 de crecimiento similar a insulina (IGF-2), era menor en adultos (estos descendientes fueron evaluados a aproximadamente 60 años de edad) (Heijmans *et al* 2008). Otro estudio reciente muestra que ratones machos expuestos deliberadamente a un aroma y que al mismo tiempo reciben un choque eléctrico, se acondicionan a sentir miedo al percibir el aroma, y de alguna manera transmiten una elevada reactividad neurológica hacia ese específico aroma cuando, más adelante, se reproducen, aun cuando las crías nunca han estado expuestas (Dias y Ressler 2014). La epigenética, es pues, un área

de estudio que explica muchos fenómenos y formas de influencia antes no entendidos, así como brinda un nivel adicional de control en la génesis del fenotipo. Se la considera una disciplina aún en su infancia.

A nivel molecular, las modificaciones epigenéticas tienen un efecto final en la configuración de la cromatina: esta configuración modula la accesibilidad de los distintos genes a la maquinaria de transcripción. La cromatina puede entonces ser remodelada entre eucromatina (accesible) y heterocromatina (compactada) en sitios específicos, permitiendo un control fino de expresión de los genes. Las principales modificaciones químicas ejercidas sobre el material genético y sus proteínas asociadas son: metilación y desmetilación del DNA, modificaciones reversibles postraduccionales de las proteínas histonas, tales como acetilación, metilación, fosforilación y ubiquitinización, incorporación de variantes de histonas y regulación de genes por RNAs no codificantes, tales como los miRNAs. Todas estas alteraciones cumplen en mayor o menor medida el requerimiento de heredabilidad para ser consideradas epigenéticas. El control del ciclo celular, la renovación de células madre, la diferenciación celular, la proliferación, el control de las respuestas inmunes, requieren delicado control fisiológico e incorporan mecanismos epigenéticos para que el mensaje necesario de expresión de acuerdo a las circunstancias sea transmitido con precisión.

El nivel principal de control epigenético que será explorado en el presente trabajo es la metilación de DNA (ver más abajo). Las modificaciones de histonas, que se hallan envueltas por el DNA formando los nucleosomas (Fig. 5), son técnicamente

modificaciones postraduccionales, e incluyen acetilación, metilación, fosforilación, ubiquitinación y sumoilación.

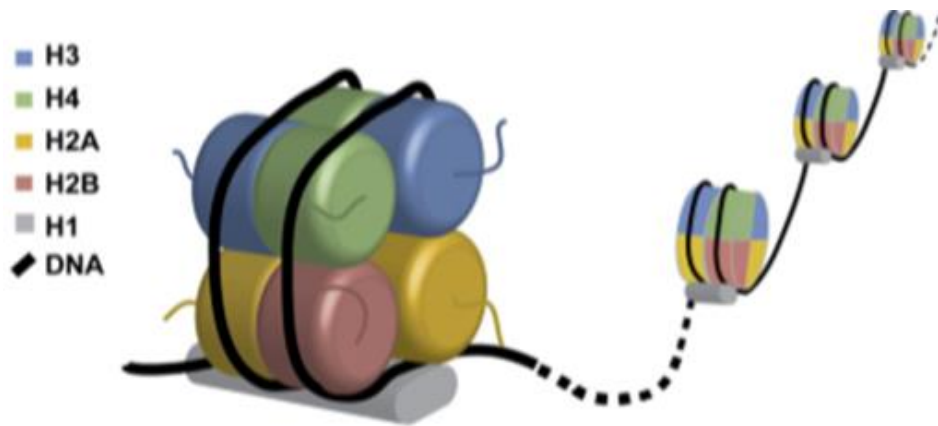


Figura 5. Arreglo de las 8 histonas de manera esquemática. 147 pares de bases de DNA envuelven un núcleo de histonas. La histona H1 (gris) cierra el arreglo nucleosomal aislando al DNA de los otros nucleosomas. Adaptado de Hamon y Cossart 2008.

Estas modificaciones se llevan a cabo por complejos modificadores, los cuales forman parte de lo que se denomina “código de histonas” (Bartova *et al* 2008), el cual presenta varios niveles adicionales de complejidad, siendo relevante para la expresión la combinación de modificaciones que ocurren en una sola molécula de histona, así como la combinaciones que resultan tras la modificación de varias de ellas. La acetilación de histonas es hasta ahora la modificación de histonas más estudiada: cuando las histonas están acetiladas, se produce una relajación de la cromatina, permitiendo la accesibilidad y la expresión de genes. De manera opuesta, enzimas como la HDAC1/2 remueven el grupo acetyl, lo que ocasiona una contracción de la cromatina y represión de la expresión de genes (Eberharter y Becker 2002).

Adicionalmente, los RNAs no codificantes (ncRNAs) y micro RNAs (miRNAs) han sido añadidos al repertorio de reguladores epigenéticos. Los ncRNAs participarían en el silenciamiento de genes, la regulación postranscripcional, y la manutención genómica. De especial interés, un tipo de ncRNAs, los microRNAs (menos de 30 nucleótidos) regulan la metilación de DNA, la modificación postraduccional de histonas, y la unión de complejos remodeladores de cromatina. Fueron descritos por primera vez en 1993 en el gusano *Caenorhabditis elegans* (Lee *et al* 1993). Cumplen con el requisito epigenético de ser heredables (Geeleher *et al* 2012). Sus roles exactos y como influyen la expresión de genes no está tan entendido como la metilación de DNA o la modificación de histonas. Se va comprendiendo que los procesos epigenéticos no existen aislados sino que están intensamente interregulados.

h. La metilación del DNA

La metilación de DNA es la adición covalente de grupos metil en los residuos de citosina en la secuencia de DNA (Fig. 6). En el genoma humano, esta modificación ocurre principalmente cuando los residuos de citosina están adyacentes a los residuos de guanina (“CpG”). Estos sitios CpG se agrupan formando motivos en algunas partes del genoma, tomando la denominación de “islas CpG”.

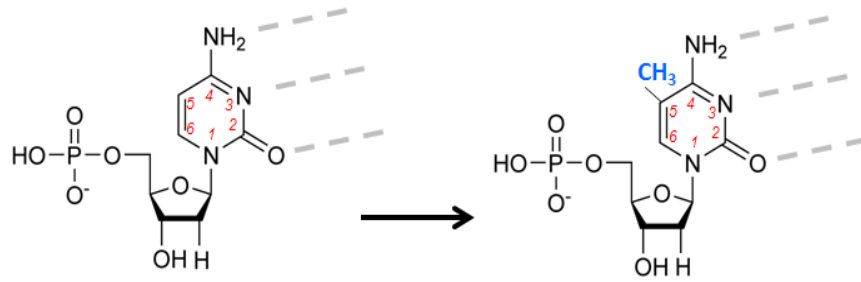


Figura 6. Metilación de Nucleótidos.- La adición de un grupo metil (en azul) al DNA ocurre casi exclusivamente en la citosina (y no en las otras tres bases nitrogenadas), específicamente en el carbono 5 del anillo, generando la base modificada 5-metil-citosina (5mC). Se aprecia el enlace triple CG en líneas grises (nucleótido: 5-metil-desoxicitidina monofosfato) Elaboración propia.

Una isla CpG puede ser definida como una región de menos de 200 pb donde >50% son CpG. Estas islas CpG pueden ocupar hasta el 2% de todo el genoma, donde el 80% aproximadamente se halla metilado (Law y Jacobsen 2010). En aproximadamente la mitad de todos los promotores génicos ocurren islas CpG y suelen estar no metiladas. Cuando ocurre la metilación de islas CpG en promotores, se asocia a la represión de la expresión del gen respectivo (Fig. 7). Puede ocurrir represión del gen incluso si un solo sitio CpG, que es relevante para el acople de proteínas moduladoras, es metilado (Weaver *et al* 2004).

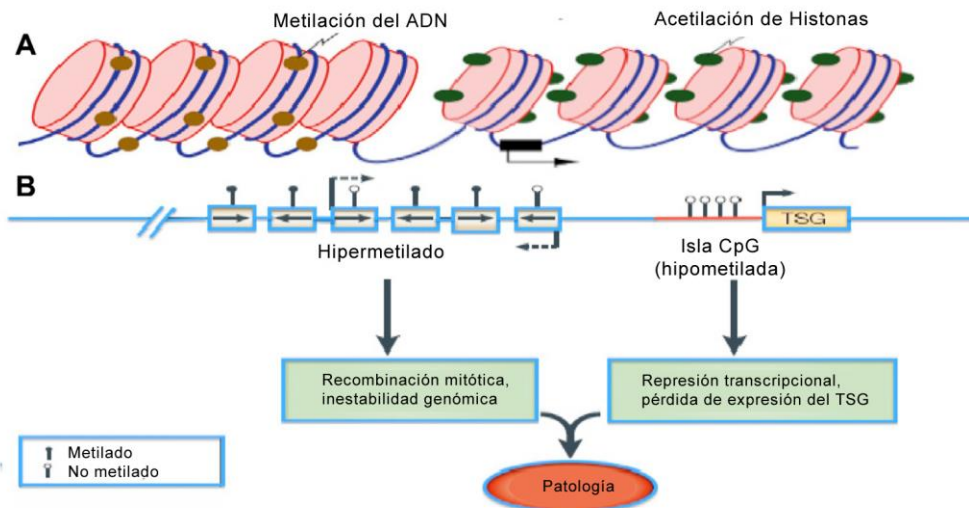


Figura 7. Región representativa de metilación del DNA. La metilación de residuos de citosina está asociada con el silenciamiento génico. La metilación de ciertas regiones genómicas es heredada (*imprinting*) y está involucrada en el silenciamiento. Las alteraciones en la metilación pueden ser adquiridas (por ejemplo en células cancerígenas). La región contiene heterocromatina rica en repeticiones e hipermetilada y un gen TSG (supresor de tumores) activamente transcrito asociado a una isla CpG (en rojo). Adaptado de (Al Akeel 2013).

A nivel global, es decir a nivel de todo el epigenoma, se puede analizar el estado de metilación de los denominados transposones, y las secuencias repetitivas esparcidas tales como Alu o LINE-1 (*Long Interspersed Nucleotide Element 1*). LINE-1 es una secuencia de DNA clasificada como elemento retrotransposón, es decir que puede copiarse a sí mismo, al producir DNA a partir de su RNA por medio de una transcriptasa reversa incluida en su secuencia, consiguiendo un mecanismo de “copiado y pegado”, dando como resultado que actualmente el 17% del genoma humano está compuesto de LINE-1. LINE-1 es probablemente el vestigio de un retrovirus que infectó a los mamíferos eras atrás. Posiblemente como un mecanismo de protección (técnicamente, represión), en células sanas, LINE-1 está usualmente severamente metilado. La metilación de DNA es ejecutada por las metiltransferasas

(DNMTs, DNA methyltransferases). La metilación *de novo* ocurre durante la embriogénesis y es llevada a cabo por DNMT3a y 3b, mientras que la manutención de la metilación ocurre durante la división de las células somáticas y es llevada a cabo por DNMT1 (Bestor 2000).

Se entiende entonces que la metilación de una región promotora ocasiona la inhibición de la expresión del respectivo gen. Los niveles de metilación global del DNA disminuyen en cáncer (Cui *et al* 1998), a lo cual acompaña una hipermetilación local, especialmente en regiones promotoras de genes supresores de tumores (Herman y Baylin 2003), lo cual desencadena expresión de oncogenes, y finalmente cáncer.

i. Aspectos epigenéticos de las infecciones

La relación entre patógeno y hospedero es intensamente dinámica. Por ejemplo, cuando *Plasmodium* spp. infecta células hepáticas, se pueden detectar cambios de expresión en 1000 genes (Albuquerque *et al* 2009), ocurriendo algunos cambios a tan solo minutos de la infección. Similares resultados se han obtenido con otros patógenos, ayudando a conceptualizar el proceso de infección no como una desregulación aleatoria de vías y genes sino como un proceso secuencial y ordenado, y que abarca diferentes familias de genes en diferentes estadios temporales que pueden durar horas e incluso minutos.

Un patógeno puede aumentar sus posibilidades de supervivencia si es capaz de modular el epigenoma del hospedero de tal manera que se silencien las vías de respuesta inmune en las células infectadas. Los virus, con sus proteomas de poco

tamaño, mostraron las primeras evidencias detectables de estos eventos (Jahner y Jaenisch 1985). Los factores de transcripción del hospedero, necesarios para el adecuado despliegue de la respuesta inmune, se vuelven entonces un obvio blanco para la intervención del patógeno. Efectores clásicos como NF- κ B, AP-1, IRF/STATs y otros pueden ser secuestrados, degradados directa o indirectamente, o reemplazados competitivamente por proteínas del patógeno.

j. Infecciones bacterianas, virales y protozoarias

En el cuerpo humano hay, en número, 10 veces más células bacterianas que células humanas (Morgan y Huttenhower 2012). La co-evolución por espacios enormes de tiempo invariablemente ha permitido la aparición de interacciones epigenéticas entre todo el repertorio de modulaciones entre las especies. Un patógeno que logre causar una alteración epigenética heredable a la siguiente generación celular o individual del hospedero tiene la ventaja que este acondicionamiento será mantenido en el tiempo (Virgin *et al* 2009). Los primeros puntos de estudio en el área de infecciones bacterianas han sido la metilación de genes e histonas. El conocimiento de los efectos epigenéticos de las infección bacteriana aún es rudimentario y se estima que dos grandes eventos, por un lado el efecto de factores bacterianos en el estatus epigenético del hospedero, y por el otro, modulaciones epigenéticas producidas por propio hospedero en sí mismo con el fin de responder adecuadamente a la infección, son los que definen el resultado final. En el caso de infecciones bacterianas, las infecciones crónicas son las más estudiadas hasta el momento y muchas de ellas están asociadas a inducción de neoplasias. La tabla 1

enlista diversos factores bacterianos conocidos y sus efectos epigenéticos en el hospedero.

Los virus, que no están clasificados en ningún reino biológico, tienen la propiedad de ser parásitos intracelulares obligatorios de todos los reinos conocidos. Especialmente en los virus que presentan infecciones crónicas y persistentes, un cambio epigenético inducido por el patógeno tendría la ventaja de, como se mencionó líneas arriba, solo consumiría energía durante la infección inicial, para luego perpetuarse por acción de la maquinaria epigenética del hospedero. Genes del hospedero involucrados en el ciclo celular, senescencia (envejecimiento celular), sobrevivencia, inflamación e inmunidad son candidatos ideales para recibir esta influencia viral. La tabla 2 muestra una relación de alteraciones epigenéticas producidas por factores virales determinados en varias especies patogénicas a humanos.

Tabla 1: Efectos epigenéticos en el hospedero como consecuencia de la infección por algunas bacterias

Especie bacteriana	Factor bacteriano	Efecto
<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	?	Deacetilación de histonas y silenciamiento de genes del hospedero
	AnkA	Se une a cromatina en secuencias ricas en ATs; silenciamiento de <i>CYBB</i>
<i>Bacillus anthracis</i>	LT	Inhibición de MAPK y H310p y regulación negativa de genes <i>IL-8</i> y <i>KC</i>
<i>Campylobacter rectus</i>	?	Hipermetilación de la región promotora P0 del gen <i>IGF2</i> en la placenta infectada de ratón
<i>Chlamydia trachomatis</i>	NUE	Metilación de histonas mamíferas
<i>Escherichia coli</i> (uropatogénica)	?	Metilación de DNA y regulación negativa de <i>CDKN2A</i>

<i>Ehrlichia chaffeensis</i>	?	Unión a cromatina en los elementos Alu-Sx
<i>Helicobacter pylori</i>	?	Inducción de metilación de ADN en la mucosa Inducción de modificación de histona H3 Inducción de expresión de miRNA Inducción de factores de splicing de RNA
<i>Legionella pneumophila</i>	Flagelina	Acetilación de histonas en células epiteliales infectadas
<i>Listeria</i>	?	Acetilación de H4 y fosforilación/acetilación de H3, en particular en el promotor de <i>IL-8</i> y unión reducida de HDAC1 en el promotor <i>IL-8</i> en células endoteliales infectadas con <i>Listeria</i>
	LLO	Modificaciones de histona y modulación de genes de defensa del hospedero mediante una vía de señalización que involucra eflujo de iones K ⁺
	?	Regulación negativa de ISG mediante complejos
	LntA	Regulación positiva de ISG mediante inhibición de complejo asociado a BAHD1 mediado por LntA
	?	Cambio en la expresión de un subgrupo de miRNAs del hospedero
<i>Moraxella catarrhalis</i>	?	Reducción en la expresión global y actividad de HDAC1/2 en las células epiteliales de las vías aéreas
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	?	Control del complejo de cromatina en ISG aguas abajo desde IFN- γ
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	?	Reactivación de virus latentes mediante modificación de cromatina inducida por ácido butírico
<i>Salmonella</i>	?	Cambio en la expresión de un subgrupo de miRNAs del hospedero
<i>Shigella flexneri</i>	OspF	Regulación negativa de MAP quinasa en el núcleo por “eliminación”; inhibición de la fosforilación de

		H3S10; regulación negativa de genes de respuesta inmune, inhibición del acceso de NF-κB a la cromatina, lo cual finalmente lleva a la inactivación de <i>IL-8</i> y otros genes esenciales para las respuestas inmunes innatas
	OspB	Unión a Rb (proteína del retinoblastoma)
	IPA9.3	Ubiquitina ligasa, la cual induce a un factor de splicing a degradación y perjudica el correcto splicing
Producto bacteriano	LPS (lipopolisacárido)	Inductor de inmunidad innata vía activación de respuestas mediadas por TLR4 y la producción de citoquinas proinflamatorias; induce inmunosupresión mediante modificaciones en cromatina tras exposiciones sucesivas
	Butirato	Inhibición de la actividad HDAC

Adaptado de Bierne *et al* 2012.

El género de protozoarios *Theileria* pertenece al phylum Apicomplexa, el mismo que contiene a los géneros *Toxoplasma* y *Plasmodium*. Estos parásitos causan morbimortalidad significativa en ganado bovino de Asia y África y son transmitidos por garrapatas. Este parásito es el único patógeno conocido, hasta la fecha, con la capacidad de inducir la proliferación continua de las células que infecta, y las vuelve resistentes a apoptosis (Heussler *et al* 1999). Las células infectadas luego se diseminan a un gran rango de tejidos, resultando progresivamente en la destrucción del sistema linfático, y edema pulmonar. Se ha observado que las células leucocitarias después de ser infectadas *in vitro* y ser liberadas de parasitemia por tratamiento farmacológico, siguen proliferando anormalmente, sugiriendo que la infección causa cambios heredables, representados por drásticas alteraciones

transcripcionales y posibles mecanismos epigenéticos (Durrani *et al* 2012). Activaciones en genes clave que regulan la proliferación, tales como NF- κ B, son persistentes, suprimiendo la apoptosis y estimulando el avance del ciclo celular, incluso perdiéndose la capacidad de respuesta a agentes clásicos de inducción de apoptosis, tales como LPS (Durrani *et al* 2012). Una de las vías moduladas, es la del regulador del ciclo celular p53, el cual de alguna manera -aún no determinada- es secuestrado en el citoplasma por el parásito, y al no poder ingresar p53 al núcleo, la señal de división celular no se detiene (Haller *et al* 2010). La gran mayoría de células infectadas no resiste esta agresiva modificación epigenética y muere (Rocchi *et al* 2006).

La influencia del protozooario *Toxoplasma* sobre el epigenoma ha sido confirmada muy recientemente. La proteína GRA16 del parásito, es liberada desde unas estructuras denominadas gránulos densos, que escapan de la vacuola parasitófora, el compartimiento donde los taquizoitos se reproducen tras la invasión. GRA16 es capaz de alcanzar el núcleo del hospedero, donde puede alterar la expresión de genes implicados en el ciclo celular. GRA16 puede modular el transcriptoma del hospedero (Bougdour *et al* 2013) y es crítico para la virulencia del parásito. Entre las proteínas del hospedero con las que interactúa se encuentra la HAUSP (Herpes virus-associated ubiquitin-specific protease), que es una proteasa capaz de ubiquitinar histonas del hospedero, y regular proteínas clave del ciclo celular

Tabla 2: Efectos epigenéticos en el hospedero tras la infección por algunos virus

Especie viral	Factor viral	Efecto
HBV (Virus hepatitis B)	HBx	Metilación del genoma del hospedero; inhibición de senescencia y proteínas apoptóticas
HPV (Virus del papiloma humano)	E6/E7	Metilación de islas CpG que causa inhibición de la expresión de IFN- κ en la transducción de señales de tipo I.
SV40 (Virus del simio 40)	Antígeno T grande	Activa DNMT3A y sirve como sustrato de HDAC1, con una acción dual inhibiendo la inmunidad innata, y al mismo tiempo estimulando la expresión génica viral
HSV (Virus herpes simple)	U _s 3	Tiene actividad quinasa en sitios diana Ser/Thr, inhibiendo la inhibición normal de las HDACs del hospedero
VZV (Virus varicela-zóster)	ORF66p	Tiene actividad quinasa, inhibiendo la inhibición normal de las HDACs del hospedero.
HCV (Virus hepatitis C)	Proteína Core	Desmetilación de genes del hospedero; inducción de células Treg inmunosupresoras

Adaptado de (Adhya y Basu 2010).

como p53. GRA16 se une con gran afinidad (Bougdour *et al* 2013) a HAUSP, que

además del rol epigenético ya mencionado, tiene roles de control del ciclo celular, que podría ser así manipulado por *Toxoplasma* para extender la supervivencia de la célula parasitada.

Por todo lo expuesto, es plausible que existan alteraciones epigenéticas durante la infección por *Trypanosoma cruzi*. Es posible que los componentes mecánicos del cuadro se exacerban entre sí empleando procesos epigenéticos al menos en ciertos pasos (Fig. 8).

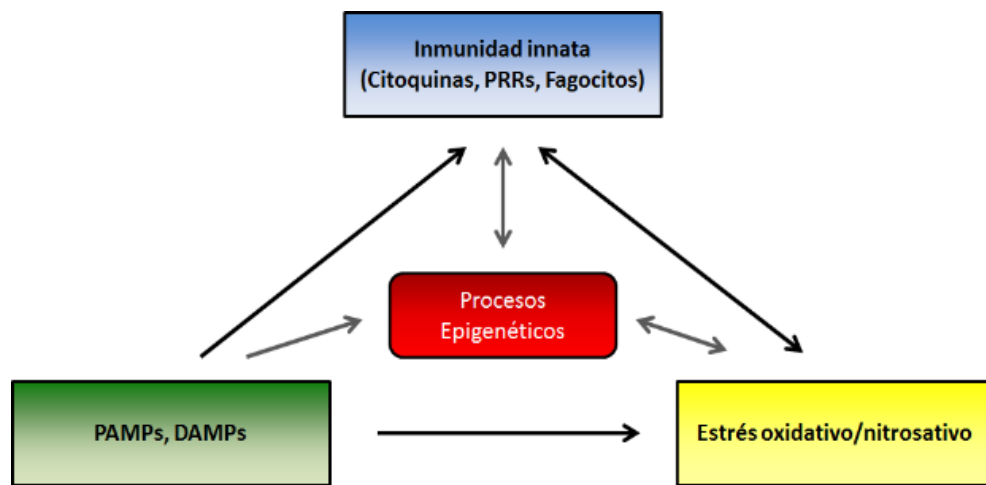


Figura 8. Epigenética en el mal de Chagas. Tras el inicio de la interacción entre hospedero y *T. cruzi*, diversos mediadores interactuarán con el propósito de erradicar al parásito. Se puede asumir que intervienen procesos epigenéticos en estas interacciones.

IV. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

El tema planteado resulta de trascendencia cuando se pone en contexto lo que es la enfermedad de Chagas, y su relativa baja relevancia para las políticas de salud pública (esto es, el por qué es denominada una enfermedad desatendida). Ante todo lo expuesto anteriormente, los esfuerzos para profundizar en el entendimiento de la enfermedad son ciertamente útiles. Hasta nuestro conocimiento, éste sería el primer estudio sobre alteraciones epigenéticas en el hospedero durante la infección con *T. cruzi*. Los beneficios potenciales de este estudio podrían llegar a ser significativos no sólo debido a la descripción de nuevos detalles en la hasta ahora poco entendida patogénesis, sino también contribuir a la salud pública, brindando la posibilidad de nuevos signos patológicos que atacar con fármacos, y finalmente, nuevos biomarcadores que permitan mejorar los actuales criterios de pronóstico.

V. OBJETIVOS

a. Objetivo General

Determinar la existencia o no de alteraciones epigenéticas, específicamente, metilación de ADN genómico, como consecuencia de la infección aguda en un modelo animal del mal de Chagas.

b. Objetivos Específicos

- Desarrollar un modelo agudo con evidencia de signos patológicos de Chagas, concordantes con la literatura.
- Evaluar los patrones globales de metilación en la infección experimental aguda empleando un modelo en rata.
- Determinar si existen diferencias significativas entre estos patrones globales.

VI. HIPÓTESIS

La infección aguda por *T. cruzi* causa alteraciones en los niveles de metilación global en tejido cardíaco en el modelo experimental de la enfermedad de Chagas.

VII. METODOLOGÍA

a. Diseño experimental

El presente estudio se basó en infecciones experimentales, empleando un modelo animal murino (*Rattus norvegicus*, línea Holtzman, hembras) con tres brazos experimentales: un grupo control al cual se le administró vehículo (salina fisiológica), un grupo infectado con tripomastigotes de la cepa Y (DTU II), y otro con tripomastigotes de la cepa Arequipa denominada “C300” en el presente estudio (DTU I - comunicación personal de Louisa Messenger). Los animales fueron sacrificados a los 25-30 días de infección. Cada grupo fue homogéneo en peso y edad. Como confirmación de la infección experimental, se realizó el diagnóstico por la técnica del microhematocrito, hemocultivo, PCR, y confirmación histológica de inflamación y parasitemia (nidios de amastigotes) (Fig. 9).

El tamaño muestral requerido fue estimado basado en análisis previos realizados en metilación genómica (Hur *et al* 2011), donde se analizó cambios en la metilación global (variable principal del presente estudio) causados por la infección por *H.pylori*, y además computado con el software G*Power (Faul *et al* 2007) y con valores de análisis estandarizados (valor $\alpha = 0.05$, valor $(1-\beta) = 0.8$, valor $d \geq 2$), obteniéndose un mínimo de 6 individuos por grupo para tener análisis válidos estadísticamente.

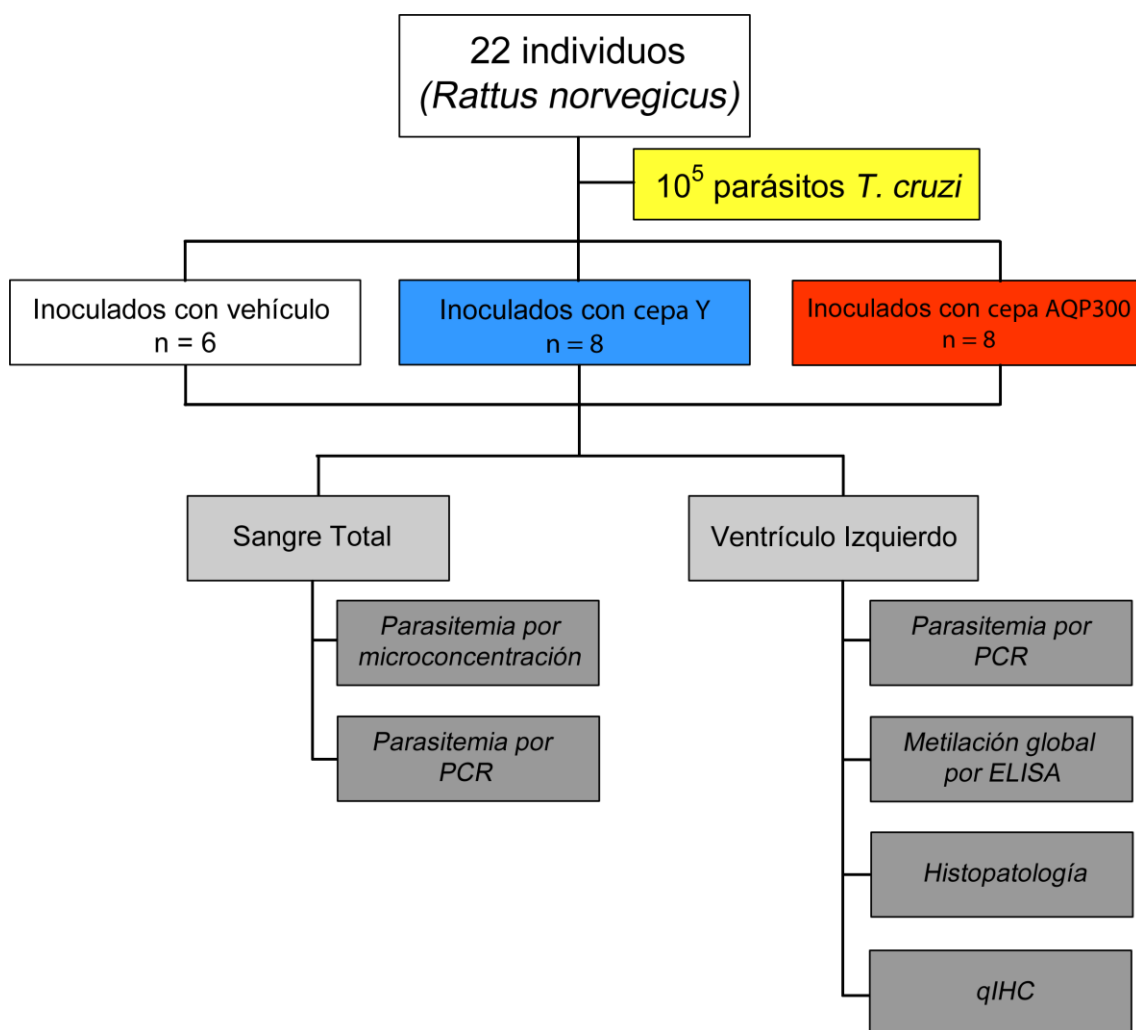


Figura 9. Flujo de trabajo para las muestras analizadas en el presente estudio.

b. Infección experimental

Cada individuo recibió intraperitonealmente un inóculo de 10^5 tripomastigotes (establecido empíricamente previamente) provenientes de ratones previamente infectados experimentalmente (*Mus musculus*, línea BALB/c, infectados con 10^4 tripomastigotes), empleados para el pasaje rutinario *in vivo* de los parásitos. Los individuos designados como controles fueron inoculados con un volumen equivalente de solución salina fisiológica.

$$\text{Número de parásitos por mL} = \frac{5 \times \text{número de parásitos totales} \times 6400}{\text{Hematocrito equivalente en } \mu\text{L}}$$

c. Evaluación de la parasitemia pre-necropsia

Con el fin de monitorizar la parasitemia y confirmar la infección experimental, los animales infectados fueron sangrados cada 7 días, mediante punción de la vena caudal. La sangre se extrajo por goteo, la cual fue colectada en capilares heparinizados y en microtubos. Los capilares heparinizados fueron centrifugados a $3000 \times g$ por 5 min. Posteriormente, estos capilares fueron seccionados en la interfase suero - paquete celular y una gota de esta interfase depositada sobre una lámina portaobjeto, y observada al microscopio a 400 x. La cantidad de parásitos por ml de sangre se estimó por conteo del número total de parásitos en 50 campos de observación y la aplicación de la siguiente fórmula (considerando el hematocrito equivalente a partir de la tabla suplementaria S1) :

d. Necropsia

Cada individuo en el día 25-30 post infección fue sometido a necropsia. Previo a la necropsia el animal fue sedado mediante inyección intramuscular de ketamina (Ket-a-100[®], Agrovvetmarket SA Peru, 20mg/Kg) y clorhidrato de xylacina (Dormi-Xyl[®]2, Agrovvetmarket SA Peru, 2mg/Kg) por personal veterinario. Se realizó sangrado total mediante punción cardiaca, empleando el sistema Vacutainer (Beckton-Dickinson) y tubos con EDTA (Vacutainer, *purple top*). Adicionalmente se recolectó sangre en capilares heparinizados y en tubos sin anticoagulante (Vacutainer, *red top*) del cual el coágulo fue usado para extracción de ADN para diagnóstico por PCR (2008 Fitzwater). Seguidamente, se procedió a efectuar la eutanasia con pentobarbital sódico (Halatal[®], Montana SA Peru, 70 mg/Kg) vía intraperitoneal. Durante la necropsia, se extrajo el corazón, se seccionó con hoja de bisturí y se almacenó de acuerdo al siguiente criterio: una porción en PBS formolado (PBS: KCl 2.67 mM, KH₂PO₄ 1.47 mM, NaCl 137.93 mM, Na₂HPO₄ 8.01 mM, formaldehído 4%) en una proporción volumétrica de 1:10 (tejido:fijador) empleando un tubo de 5 ml, una porción en RNAlater[®] (Ambion) en una proporción aproximada de 100 mg en 1 mL en un microtubo de 1.5 mL, y una porción en etanol en un microtubo de 1.5 mL, en proporción tejido:fijador de 1:10. De acuerdo a las instrucciones del fabricante, la porción en RNAlater fue almacenada durante una noche a 4 °C y al día siguiente almacenada definitivamente a -20 °C. La porción en etanol fue guardada directamente a -70 °C. Finalmente, la porción en PBS formolado fue almacenada a temperatura ambiente durante 3 días para favorecer la infiltración en el tejido y recambiada con solución de etanol al 70% y guardada a temperatura ambiente hasta su procesamiento histológico-inmunohistoquímico.

d. Microconcentración

Los capilares heparinizados llenados durante la necropsia fueron procesados de la misma manera que las evaluaciones previas a la necropsia (ver más arriba).

e. PCR

El coágulo fue procesado por el método de fenol-cloroformo (Sambrook *et al* 1982) y la detección por PCR en tiempo real fue realizada empleando los iniciadores Cruzi 1 (5'-ASTCGGCTGATCGTTTTTCGA-3') y Cruzi 2 (5'-AATTCCTCCAAGCAGCGGATA-3') (Piron *et al* 2007) y la sonda Taqman Cruzi 3 etiquetada con el fluoroforo 6-Carboxifluoresceína (FAM) y el *quencher* no fluorescente *Minor Groove Binder* (NFQ-MGB) (FAM-CACACACTGGACACCAA-NFQ-MGB) para amplificar DNA satelital en el termociclador StepOnePlus (Life technologies).

f. Histopatología

Los órganos conservados en PBS formolado, fueron incluidos en parafina, y se realizaron cortes de 4 µm con micrótopo, los que fueron teñidos con hematoxilina – eosina, y observados en un microscopio de luz óptica a magnificación 200 x y 400 x para el diagnóstico y conteo de nidos de amastigotes respectivamente, así como evaluación descriptiva del daño tisular. Los siguientes parámetros fueron considerados para la evaluación del daño tisular: inflamación, edema, desorganización celular, deposición de colágeno (fibrosis). La inflamación fue cuantificada como infiltración leucocitaria, la cual fue clasificada como ausente (no

infiltración), leve (ocupando el 2% a 15% de la sección), moderada (ocupando 20% a 60% de la sección) y severa (mayor a 70% de la sección). Cada muestra solo podía ocupar una categoría. El edema tisular fue definido como la presencia de espacios intersticiales y fue clasificada como ausente o presente en la sección. La desorganización tisular, fue definida como pérdida de alineación de las células del tejido, fue igualmente clasificada como presente o ausente. La deposición de colágeno (fibrosis) fue cuantificada como presente o ausente en cualquier parte de la sección. Secciones adicionales de estos tejidos incluidos en parafina fueron tomadas para análisis de inmunohistoquímica cuantitativa.

g. Análisis de la metilación global

Las muestras de tejido aisladas durante la necropsia fueron procesadas para extraer ADN total, mediante el método de fenol-cloroformo (Sambrook *et al* 1982). Se tuvo como fuente de preferencia el tejido almacenado en etanol; si fuera insatisfactoria la calidad de la muestra, se hizo uso del tejido almacenado en RNAlater. Para la extracción 25 mg de biopsia de ventrículo izquierdo fueron colocados en 500 μ L de buffer de lisis (Tris-HCl 100 mM, EDTA 100 mM, pH 8, SDS 0.5%) en microtubos con tapa rosca, y se añadió proteinasa K (Invitrogen) a una concentración final de 400 μ g/ml, para finalmente incubación por al menos 24 horas a 37°C, en baño María. Seguidamente, se sometió a ebullición los tubos por 10 min para lograr el clivaje de las redes del kinetoplastido. Se añadió 300 μ L de Fenol/Cloroformo/Alcohol Isoamílico (respectivamente en proporciones (25:24:1)) y tras múltiples mezclas por inversión, se centrifugó a 16 000 *g* por 5 min. Se formaron 2 fases, y la fase superior, acuosa, que contenía ADN, fue transferida a un nuevo microtubo. A continuación, se agregó 600 μ L de Cloroformo/ Alcohol

Isoamílico (24:1), se mezcló por inversión, se centrifugó a 13000 x g por 5 min. El nuevo sobrenadante (se formaron nuevamente dos fases, con fenol residual en la fase inferior) fue transferido finalmente a un microtubo., añadiéndose acetato de sodio (concentración final 0.3 M) y 2 volúmenes de etanol absoluto. Tras homogenizar manualmente, las muestras fueron dejadas por toda la noche a – 20 °C para precipitar el ADN. Posteriormente, se dejaron descongelar a temperatura ambiente y se centrifugaron a 16 000 g por 30 min. Se descartó el sobrenadante y se lavó el pellet 2 veces con etanol 70% seguido de centrifugación a 16 000 g por 5 min. El pellet final fue secado a temperatura ambiente y resuspendido en 100 µL buffer AE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8.0, Qiagen USA), calentado a 55 °C por 15 min para asegurar la disolución y congelado a – 20 °C. La concentración del ADN extraído fue estimada por espectrofotometría, usando 2 µL de muestra en un NanoDrop 2000c (Nanodrop Technologies, Inc). De acuerdo a esto, se ajustaron las concentraciones de ADN de las muestras a un rango de 15-200 ng/µl, para llegar a una masa final absoluta de ADN depositada por pocillo en la placa de ~100-150 ng en un volumen de 100 µL. Se empleó el kit MDQ1 (Sigma-Aldrich) el cual emplea un anticuerpo contra citosina metilada (5-metil-citosina, o 5-mC), además de los estándares provistos por el kit (5-metil-citosina metilada generada a partir de ADN aislado de células Jurkat y metilado enzimáticamente *in vitro* por el fabricante), en un ensayo basado en placas, similar a ELISA. La lectura final fue calculada como la absorbancia a 450nm, de la cual se sustrajo el blanco (buffer de dilución). Esta lectura fue proporcional al grado de metilación y a la masa de ADN depositada en el pocillo. Los controles permitieron establecer una curva estándar que permitió calcular el porcentaje de metilación respecto al control, ajustado a la

misma masa de ADN (ver ecuación abajo). Se emplearon triplicados técnicos promediados.

$$\text{Valor de muestra} = \frac{A_{450 \text{ promedio Muestra}} - A_{450 \text{ promedio Blanco}}}{A_{450 \text{ promedio Control}} - A_{450 \text{ promedio Blanco}}}$$

h. Inmunohistoquímica para la visualización de 5-mC

De las muestras de tejido cardiaco preservadas en formol e incluidas en parafina, secciones adicionales de 4 μm fueron tomadas y analizadas con un anticuerpo monoclonal anti 5-metilcitosina (Epigentek), denominado 33d3 (Reynaud *et al* 1992). Estas secciones fueron teñidas inmunohistoquímicamente de la siguiente manera: tras un desenmascaramiento de antígenos por tratamiento con calor (en autoclave a 15 psi, 121 °C, 5 min), seguido de incubación con tripsina (Sigma) 0.02% y HCl 3.5N, se incubaron con anticuerpo primario a concentración 1:2000 (Gao *et al* 2011) toda la noche a 4 °C y posteriormente se reveló con un conjugado peroxidasa de rábano - anti IgG de ratón y el sustrato cromogénico 3-3' diaminobenzedina (DAB). Las contraindicaciones se realizaron con el colorante citoplasmático Cyto-Blue (Innovex, USA). Asimismo, se incluyó un control referencial empleando un cultivo en monocapa de células LLC-MK2 (ATCC® CCL-7™, 37 °C, 5% CO₂), las cuales fueron expuestas a una concentración estándar de 1 μM 5-azacitidina (Cayman Chemical, USA) en cámaras acopladas a láminas (*chamber slides*, Thermo Fisher) por 72 h, para luego ser sometidas a fijación (1:1 metanol / acetona) a -20 °C, 3 lavados con PBS (5 min) y luego

proceder con la incubación con tripsina, HCL, y anticuerpo primario tal como se describió para el tejido.

h. Cuantificación de la señal inmunohistoquímica

Las secciones teñidas y contrateñidas fueron analizadas de la siguiente manera: se tomaron fotos de las regiones pericárdica, miocárdica y endocárdica. En estas secciones se buscaron específicamente evaluar los núcleos de cardiomiocitos, que deben, teóricamente, expresar una mayor o menor intensidad de tinción de manera proporcional al contenido de DNA metilado (Gao *et al* 2011); Karouzakis *et al.* 2009; Piyathilake *et al.* 2001). Cada una de las tres regiones del tejido cardiaco fue analizada independientemente; se evaluaron 10 campos de cada región a 400 aumentos, sumando un estimado de 100 núcleos por región por individuo. Cada fotografía digital, capturada mediante una cámara acoplada al microscopio en uso, fue filtrada empleando la herramienta Selección de Rango de Color del programa Photoshop CS5 (Adobe Systems, California, USA), la cual permitió extraer selectivamente todos los rangos de coloración marrón (representando el cromógeno DAB) de la imagen analizada, y eliminando todo el resto de la imagen. Este procesamiento permite virtualmente un ruido nulo de fondo y fue post-procesado con el programa ImageJ v. 1.48 (NIH, EUA) donde se desactivaron los canales de color, dejando la imagen en modo escala de grises. Seguidamente, se usó la herramienta Medir (*Measure*), para cuantificar una región circular de 15 píxeles de diámetro. El valor promedio de grises (*mean gray value*) fue usado para el presente estudio, y consiste en el promedio aritmético de las intensidades de grises dentro de la región circular evaluada (por ejemplo 0 significa que el 100% de los píxeles son

totalmente blancos, 255 significa que el 100% de los píxeles son totalmente negros, etc).

i. Análisis estadístico

Las variables cuantitativas fueron comparadas entre grupos con pruebas no paramétricas (que son menos tolerantes a errores del tipo I, es decir, tienen menor chance de afirmar significancia cuando no la hay) al no poder establecer normalidad en grupos de tamaño muestral reducido. Ante valores de significancia inferiores de 0.05 la hipótesis nula (igualdad de niveles de metilación) fue rechazada. Para gráficas se usó el programa Prism (GraphPad, USA).

j. Variables del estudio y operacionalización

Variable	Definición	Tipo	Escala de medición	Notas
Metilación Global: gDNA	Niveles de absorbancia	Cuantitativa Continua	Racional	Variable dependiente
Metilación Global: IHQ	Niveles de intensidad de pixel	Cuantitativa Continua	Racional	Variable dependiente
Histología: Número de nidos	Frecuencia de nidos de amastigotes en secciones	Cuantitativa Discreta	Racional	Covariable
Histología: Inflamación	Gravedad de inflamación	Cuantitativa discreta	Ordinal	Variable independiente
Diagnóstico global	Presencia o ausencia de parásitos por cualquier método	Categórica Dicotómica	Nominal (Positivo, Negativo)	Variable independiente
Diagnóstico por PCR	Parásitos por ml	Cuantitativa Discreta	Racional	Variable independiente
Diagnóstico por microconcentración	Parásitos por ml	Cuantitativa Discreta	Racional	Variable independiente

VIII. RESULTADOS

a. Muestras analizadas

Se analizaron muestras de tejido de corazón (ventrículo izquierdo) de 22 animales, los que se distribuyeron en 3 grupos: 2 brazos experimentales y 1 brazo control (no infectado) como se muestran en la tabla 3. Solo una muestra no pudo ser analizada en el grupo C300 mediante histopatología e inmunohistoquímica. Todos los individuos analizados fueron ratas (*Rattus norvegicus*, línea Holtzman), mientras que ratones (*Mus musculus*) fueron usados para la preparación del inóculo, sin propósitos analíticos.

Tabla 3. Pruebas empleadas y muestras analizadas

Grupo	n	Cuantificación de parasitemia por microconcentración	qPCR	Histopatología	Metilación Global	Inmunohistoquímica
Y	8	8/8	8/8	8/8	8/8	8/8
C300	8	8/8	8/8	7/8	8/8	7/8
Control	6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6

n= número de ratas por tratamiento; Grupos de tratamiento: Y = ratas inoculadas con cepa Y; C300 = ratas inoculadas con cepa "C300". Control = ratas no inoculadas con *T. cruzi*, solo inyectadas con solución salina fisiológica. qPCR = PCR en tiempo real teniendo como blanco DNA satelital y sonda Taqman (Piron *et al* 2007). Metilación Global = Medida con el kit MDQ1 (Sigma).

b. Confirmación de la infección en el modelo animal mediante microconcentración.

A los 7 días post infección, la carga parasitémica fue detectable en el 14.3% (1/7) de muestras para la cepa C300, mientras que para la cepa Y, se observó positividad en el 25% (2/8) de las muestras (Tabla 4, Figura 10). A los 14 días, se detectaron parásitos en 50% (4/8) de las muestras de sangre en el grupo de ratas inoculadas con la cepa Y y en el 87.5% (7/8) de las muestras de sangre del grupo de ratas inoculadas con la cepa C300. Las medias globales de parasitemia a los 7 días fueron 597 parásitos/ml para el grupo Y (n=8) y 597.16 para el grupo C300 (n=8) (Tabla 4, Figura 10).

Tomando en cuenta solo a los individuos positivos a los 7 días post infección la media fue 2388.67 parásitos/ml para el grupo Y, y 4777.33 parásitos/ml para el grupo C300; mientras que a los 14 días la media fue 2357.65 parásitos/ml para el grupo Y, y 7708.8 parásitos/ml para el grupo C300 (Figura 11). La parasitemia por microconcentración en el grupo control fue 0 parásitos/ml para todos los individuos durante todos los puntos de tiempo.

Tabla 4. Parasitemia por Microconcentración

Días post infección	Grupo Y			Grupo C300		
	Media de solo individuos positivos (parásitos/ml)	Media de todo el grupo (parásitos/ml)	% positividad	Media de solo individuos positivos (parásitos/ml)	Media de todo el grupo (parásitos/ml)	% positividad
7	2388.67	597	25% (2/8)	4777.33	597.16	14.3%(1/7)
14	2357.65	1178	50%(4/8)	7708.8	6745.2	87.5%(7/8)

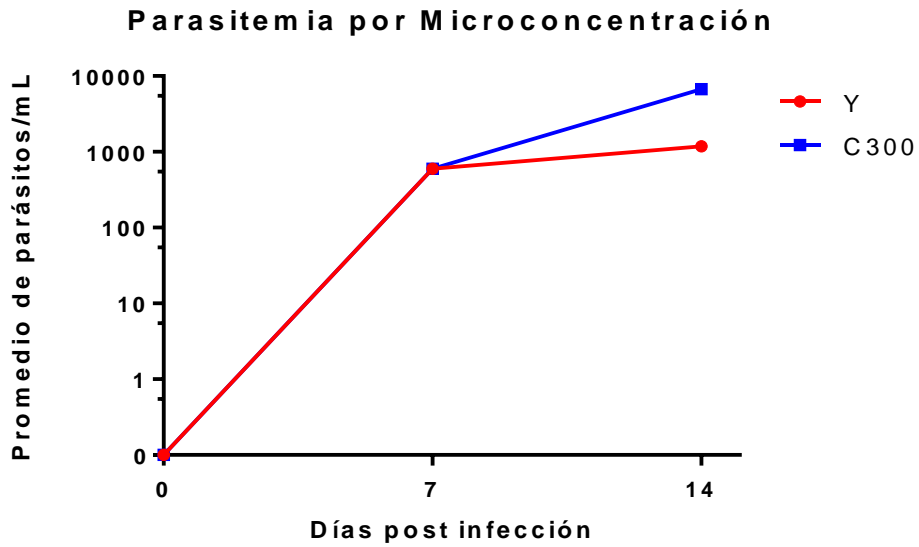


Figura 10. Parasitemia por microconcentración en grupos infectados. La curva representa la media aritmética de parasitemia de todos los individuos de los dos grupos experimentalmente infectados (Y, C300) cuantificado por el método de microhematocrito en sangre.

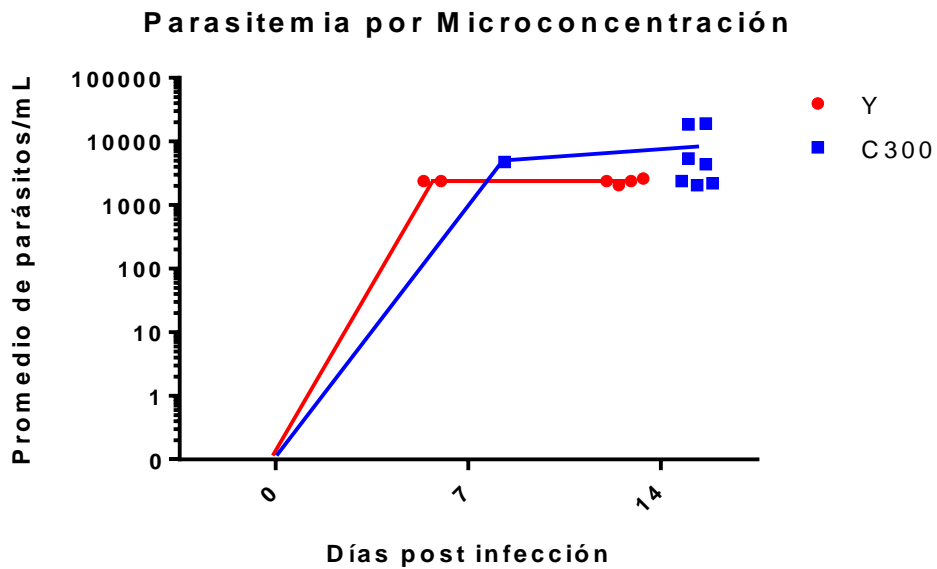


Figura 11. Parasitemia por microconcentración en solo individuos positivos. La curva representa la media aritmética de parasitemia de solo los individuos positivos de los dos grupos experimentalmente infectados (Y, C300), cuantificado y declarado positivo o negativo por el método de microhematocrito en sangre.

c. Confirmación de la infección en el modelo animal mediante qPCR

Mediante qPCR, el 100% de animales presentó carga detectable de parásitos en tejido cardiaco. En el grupo Y, todos los individuos (100%) fueron positivos a *T. cruzi* en tejido cardiaco mediante la prueba de qPCR, mientras que en el coágulo solo el 75% de muestras fueron positivas mediante esta prueba. En el grupo C300, se observó 100% de positividad en tejido cardiaco y 87.5% de positividad en muestras de coágulo. Ningún animal del grupo control presentó carga parasitaria detectable en tejido o coágulo (Tabla 5). Asimismo, no se evidenció correlación significativa entre los valores Ct de qPCR y los niveles de metilación para los dos grupos experimentales. (Fig.12)

Tabla 5. Parasitemia mediante qPCR

Grupo	Muestra	Ct promedio ^a	Día (dpi)	Porcentaje de positividad (%) (n/total)
Y	Tejido	23.06	30	100(8/8)
	Coágulo	22.94	30	75(6/8)
C300	Tejido	30.17	30	100(8/8)
	Coágulo	23.85	30	87.5(7/8)
Control	Tejido	- ^b	30	0 (0/6)
	Coágulo	- ^b	30	0 (0/6)

^aLa muestra se consideró positiva si $Ct \leq 36$. ^bLas muestras del grupo control no presentaron amplificación. $Ct = Threshold\ cycle$ (ciclo umbral) dpi= días post infección. dpi: días post infección. (n/total): individuos positivos/total de individuos por grupo.

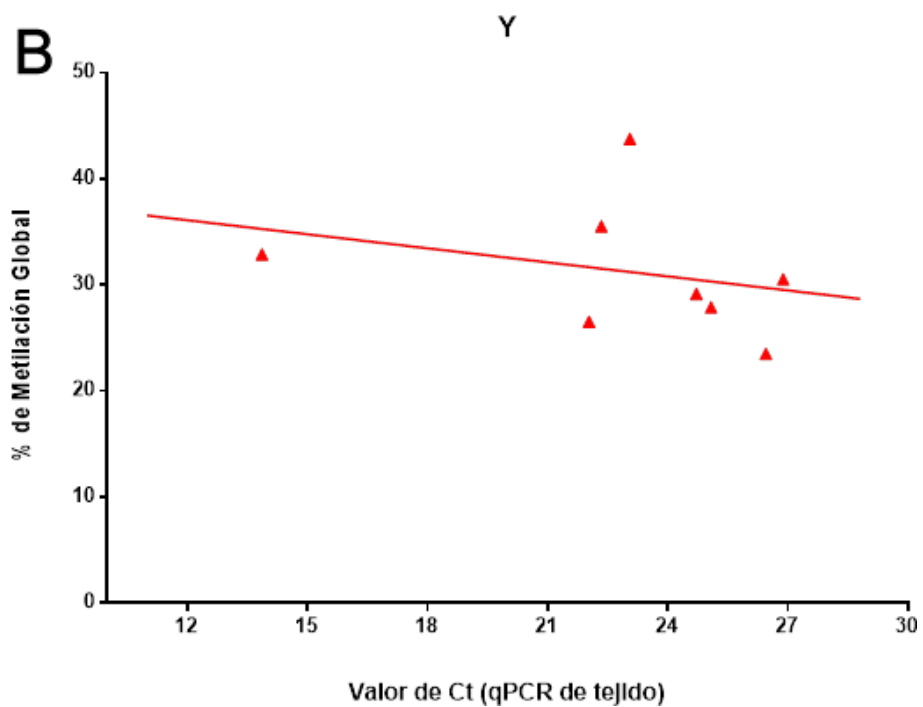
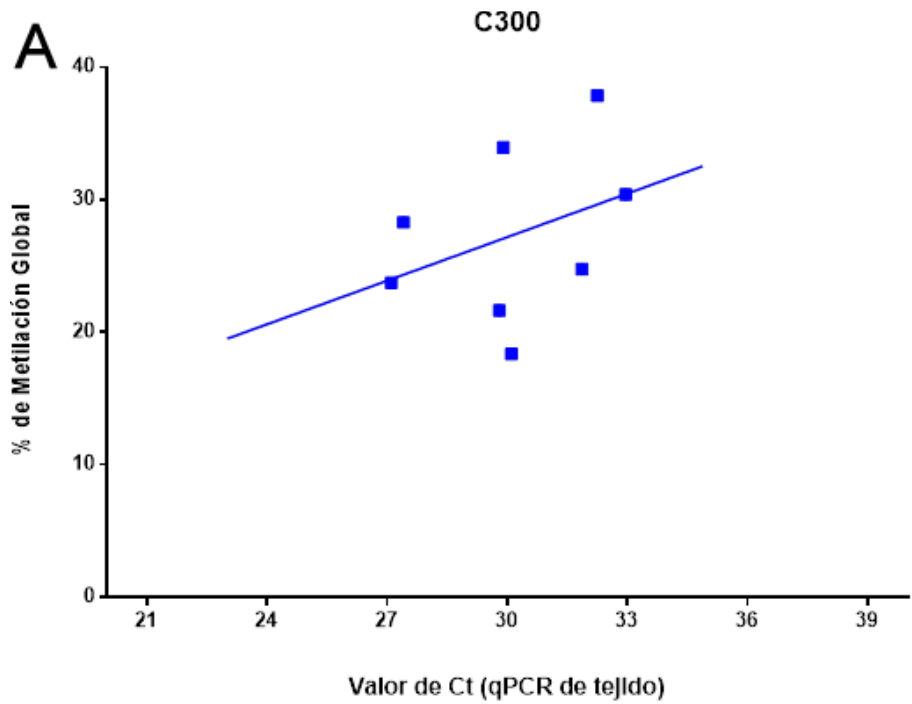


Figura 12. Gráficos de dispersión mostrando Ct (qPCR) de tejido versus nivel de metilación global del mismo tejido en células analizadas globalmente, para C300 y Y. No se detectó correlación para ninguno de los dos grupos infectados (A: C300; B: Y) (Prueba de Correlación de Pearson, $P > 0.05$)

d. Metilación Global

El nivel de metilación global relativo, respecto al control del kit (DNA metilado referencial producido por la compañía), en el grupo Y presentó un porcentaje medio de 31.20%; en el grupo C300 el porcentaje medio de metilación relativa fue de 27.36%, mientras que el grupo Control presento un porcentaje medio de metilación de 27.67%. No se observó diferencias significativas entre los niveles por grupo (ANOVA-Dunnet, $P > 0.05$) (Fig. 13)

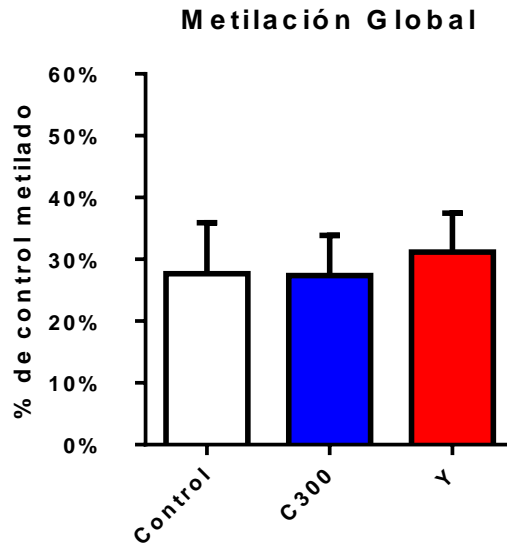


Figura 13. Metilación Global de ADN en muestras de corazón del ventrículo izquierdo. Grupos experimentales: Control (n=6), Grupo C300 (n=8), Grupo Y (n=8). Barras de error representan la desviación estándar.

e. Histopatología

En el análisis histopatológico de tejido de ventrículo izquierdo teñido mediante la técnica hematoxilina-eosina (Fig.14 y Fig. 15), todas las ratas infectadas con la cepa C300 presentaron inflamación severa (Fig. 14). Entre las ratas infectadas con cepa Y el 62.5% de individuos presento inflamación severa (Fig.15). No se observó inflamación moderada entre los individuos infectados con la cepa 300, mientras que en los infectados con la cepa Y se observó inflamación moderada en el 37.5% de individuos. Todos los individuos de los grupos C300 y Y, presentaron edema en el ventrículo izquierdo. El 85.6% de los individuos del grupo C300 y el 12.5% del grupo Y presentaron desorganización tisular. Se observó necrosis del tejido cardiaco en el 71.4% de individuos del grupo C300, y en todos los individuos del grupo Y. Finalmente, la tinción tricrómica de Masson permitió evidenciar presencia de colágeno fibrótico, el cual estuvo presente en 85.5% de los individuos del grupo C300, en el 75% de los individuos del grupo Y. En contraste, los individuos del grupo control no presentaron ningún tipo de inflamación, edema, desorganización tisular, necrosis, o deposición fibrótica de colágeno en el ventrículo izquierdo.

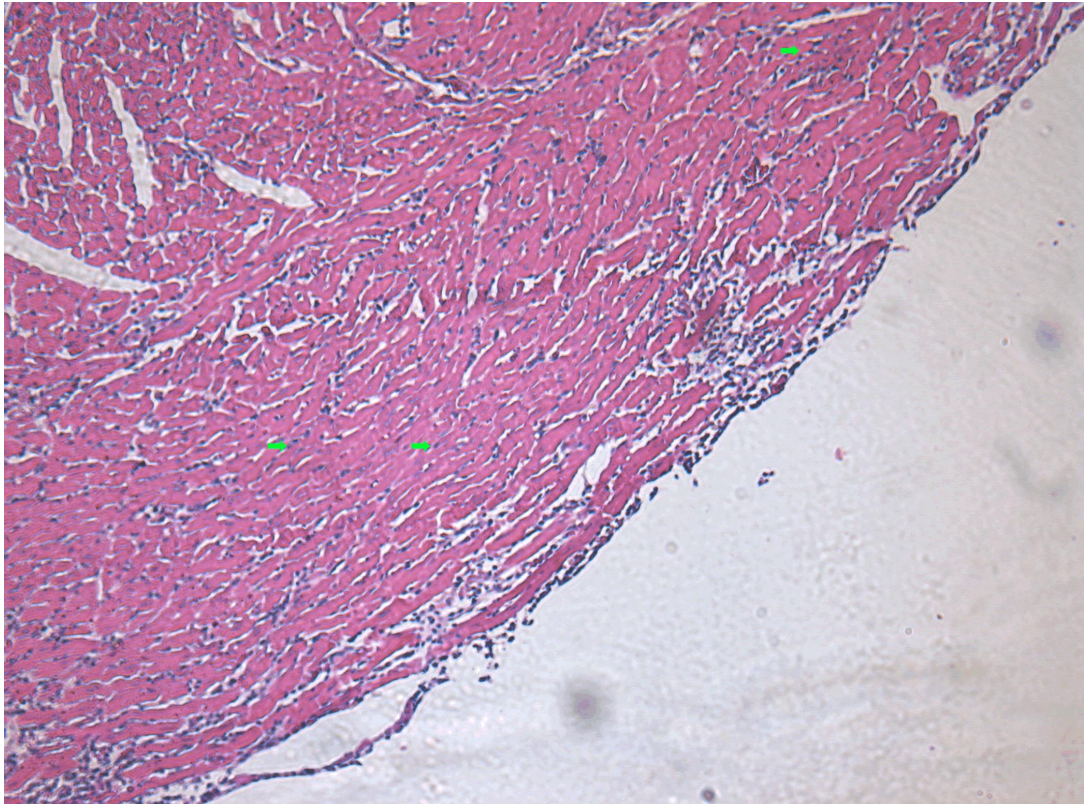


Figura 14. Inflamación Severa. Imagen representativa de sección de tejido cardiaco de rata, con infección C300. Se puede apreciar inflamación severa y difusa, con infiltración leucocitaria, distintivos en la enfermedad de Chagas. 400 aumentos; Tinción hematoxilina-eosina.

Hallazgos Histopatológicos

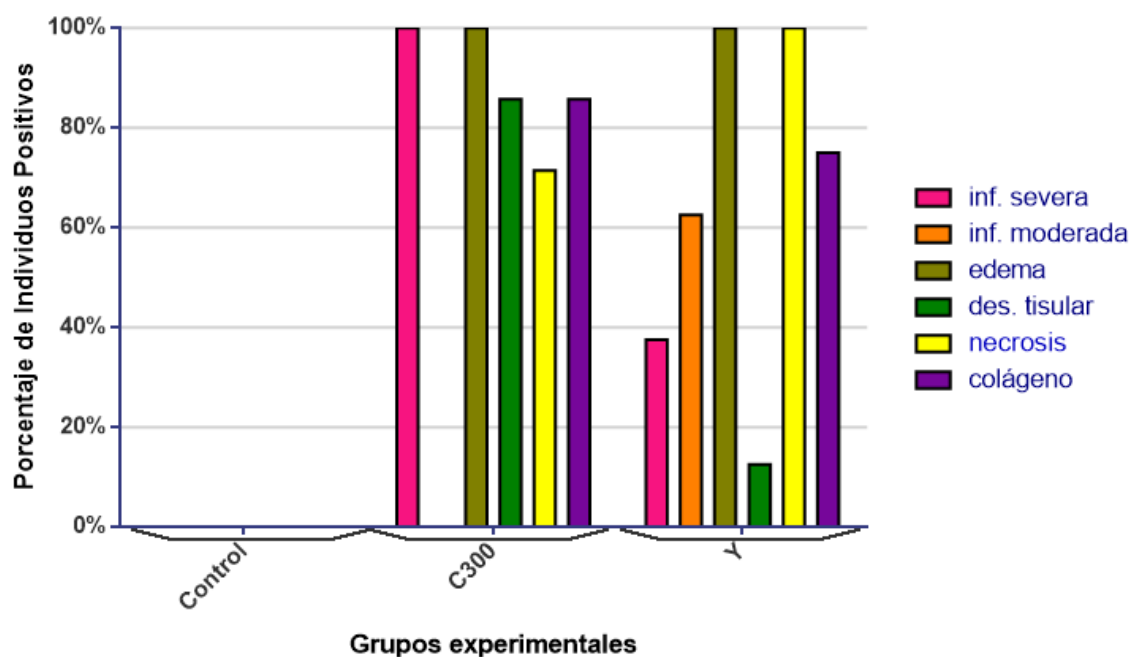


Figura 15. Alteraciones histopatológicas observadas en el ventrículo izquierdo de los grupos experimentales: Control (n=6), C300 (n=7, una muestra no pudo ser procesada por pérdida, ver Tabla 3), Y (n= 8). Inf. Severa = Inflamación severa; Inf. Moderada = Inflamación moderada. Des. Tisular = Desorganización Tisular. Necrosis = presencia de focos necróticos. Todas las observaciones indicadas hasta aquí fueron realizadas por tinción de hematoxilina-eosina. Colágeno = Presencia de colágeno (indicador de fibrosis) por tinción tricrómica de Masson.

f. Inmunohistoquímica comparativa de 5-metilcitosina (5-mC)

El análisis mediante inmunohistoquímica de los núcleos de las tres regiones designadas del ventrículo izquierdo (epicardio, miocardio y endocardio) para la detección y cuantificación de 5-metilcitosina mostró una intensidad media (unidad adimensional de intensidad de grises que abarca desde 0 “negro puro” hasta 65535

“blanco puro”) en el caso del epicardio, de 22986.69 en el grupo 300, de 22939.99 en el grupo Y, mientras que el grupo control mostró un promedio de intensidad de 23693.84 (Figura 16). No se observó diferencias estadísticamente significativas entre el promedio de intensidad de metilación entre los diferentes grupos de tratamiento (Anova – Dunnet, $P > 0.05$).

En el caso del miocardio el grado de metilación de 5 – metilcitosina, medido por intensidad de color en la prueba de histoquímica, fue mayor para el grupo C300 (43,135.45) seguido del grupo Y (40,034.49) y finalmente por el grupo control que presentó un promedio de 35870.17 (Figura 17). Estas diferencias fueron estadísticamente significativas (Anova – Dunnet, $P < 0.05$) entre el grupo 300 y el grupo control.

En el caso del endocardio, el grupo C300 mostró una intensidad media de 47262.30, el grupo Y de 42848.50, y el grupo control un promedio de 41234.24 (Figura 18), observándose que el grupo C300 tenía un promedio significativamente mayor que el grupo control no infectado (Anova – Dunnet, $P < 0.05$).

El control referencial de línea celular LLC-MK2 usando el agente demetilante 5-azacitidina generó un descenso de la metilación global detectable ($P < 0.05$, confirmando la especificidad del anticuerpo monoclonal 33d3 anti-5mC (Figuras 19 y 20).

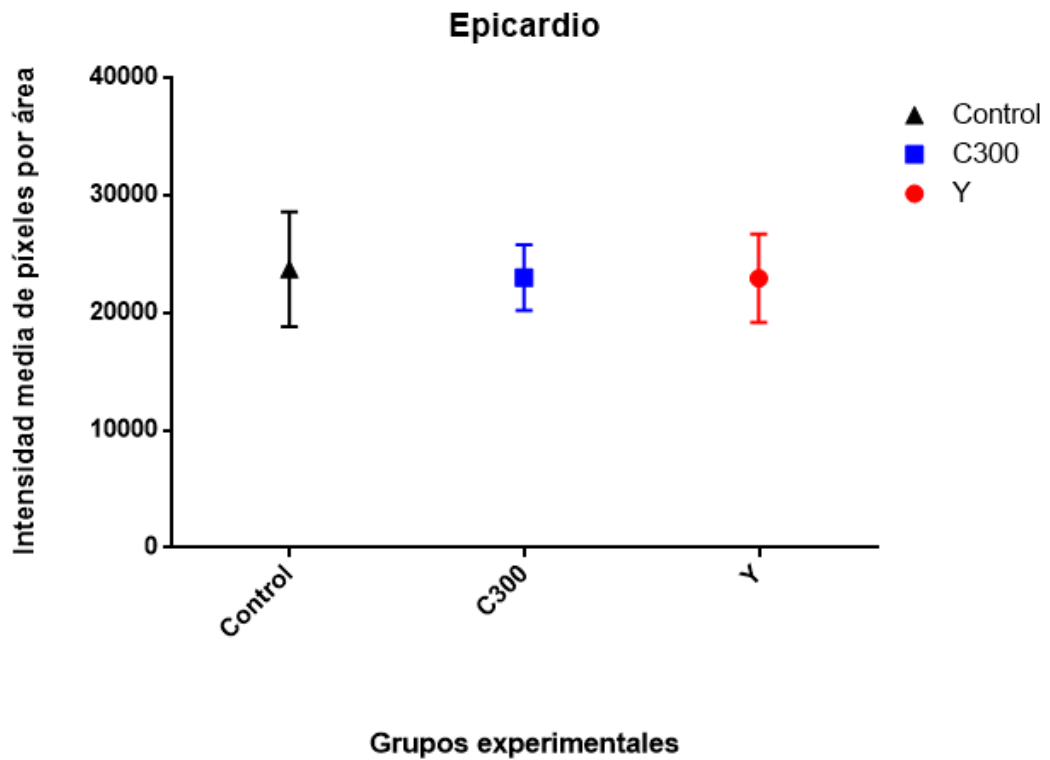


Figura 16. Intensidad media de píxeles de núcleos teñidos por área según grupo, para tejido Epicardio. Al comparar intensidad de los núcleos no se observó diferencia significativa entre ninguno de los 3 grupos. ($P > 0.05$). En el eje vertical, 65535 es el valor de máxima ausencia de color (blanco puro) y 0 representa la máxima intensidad posible de color (negro puro). Grupo control, ratas inoculadas con vehículo (solución salina, $n=6$). Grupo C300, ratas infectadas con 10^5 tripomastigotes cepa 300 ($n=8$); Y: ratas infectadas con 10^5 tripomastigotes cepa Y ($n=8$).

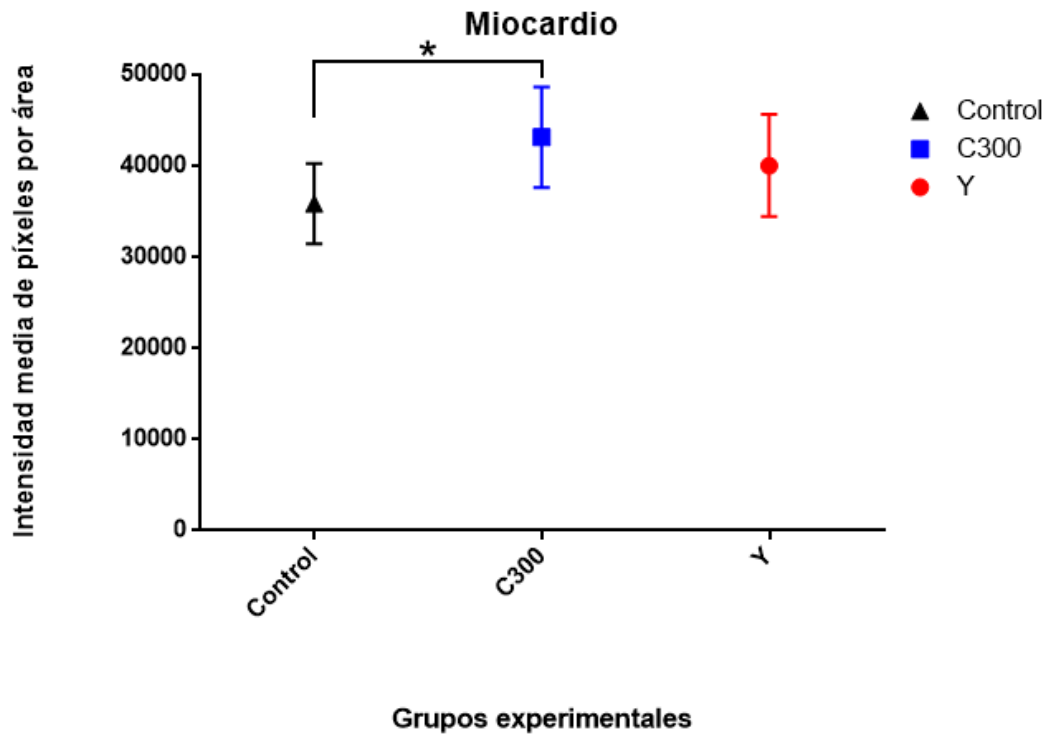


Figura 17. Intensidad media de píxeles de núcleos teñidos por área según grupo, para tejido Miocardio. * El grado de metilación en el núcleo fue mayor en el grupo C300 que en el grupo control ($P < 0.05$). En el eje vertical, 65535 es el valor de máxima ausencia de color (blanco puro) y 0 representa la máxima intensidad posible de color (negro puro). Grupo control, ratas inoculadas con vehículo (solución salina, $n=6$). Grupo C300, ratas infectadas con 10^5 tripomastigotes cepa 300 ($n=8$); Y: ratas infectadas con 10^5 tripomastigotes cepa Y ($n=8$).

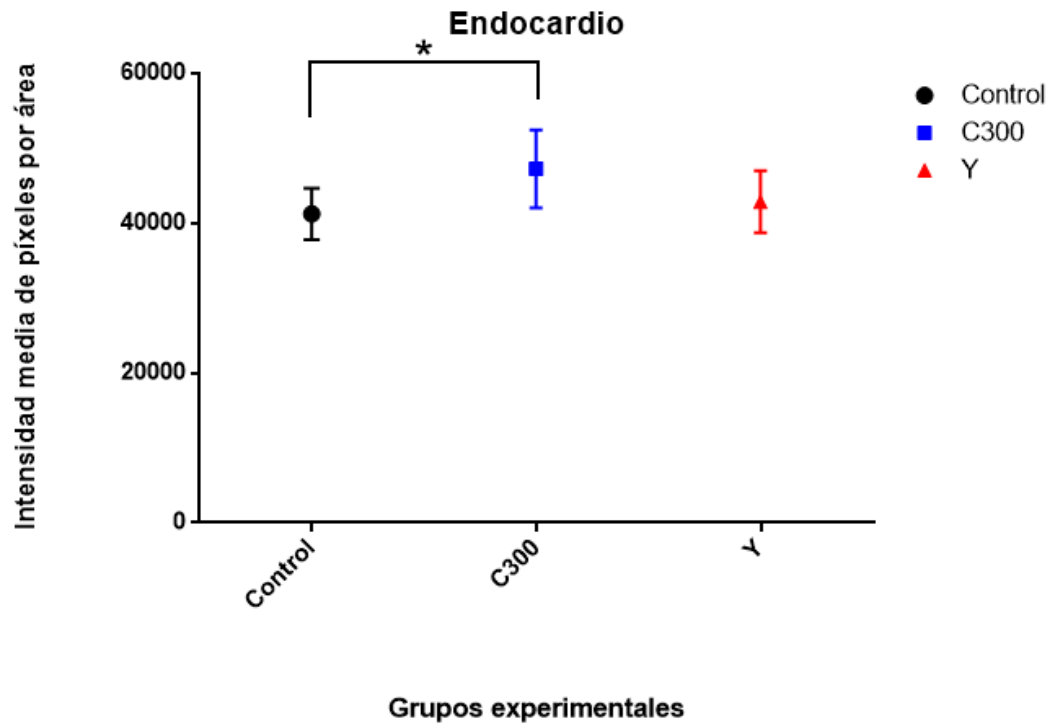


Figura 18. Intensidad media de píxeles de núcleos teñidos por área según grupo, para tejido Endocardio. Al comparar intensidad de los núcleos se observó diferencia significativa entre el grupo C300 y el grupo No infectado (control) (*;P<0.05). En el eje vertical, 65535 es el valor de máxima ausencia de color (blanco puro) y 0 representa la máxima intensidad posible de color (negro puro). Grupo control, ratas inoculadas con vehículo (solución salina, n=6). Grupo C300, ratas infectadas con 10^5 tripomastigotes cepa C300 (n=8); Y: ratas infectadas con 10^5 tripomastigotes cepa Y (n=8).

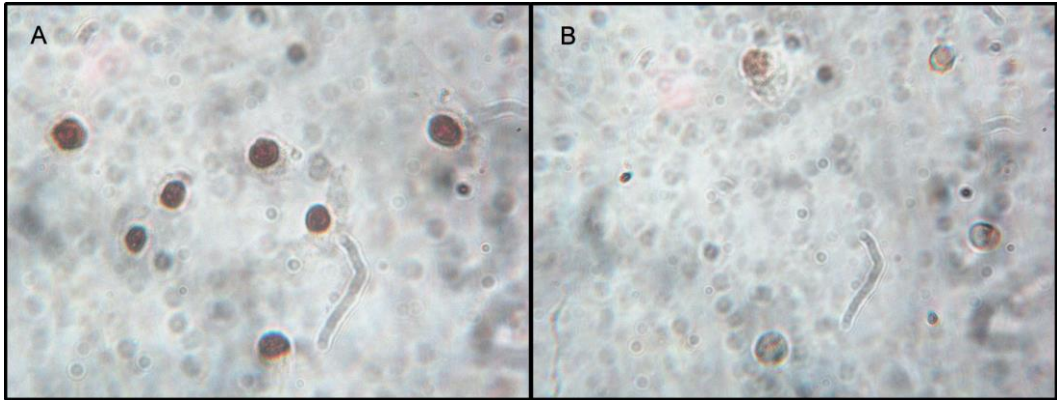


Figura 19. Antes (A) y después (B) de exposición al agente desmetilante 5-azacytidina, los niveles de metilación descendieron visiblemente en los cultivos *in vitro* de LLC-MK2. Magnificación: 250 aumentos.

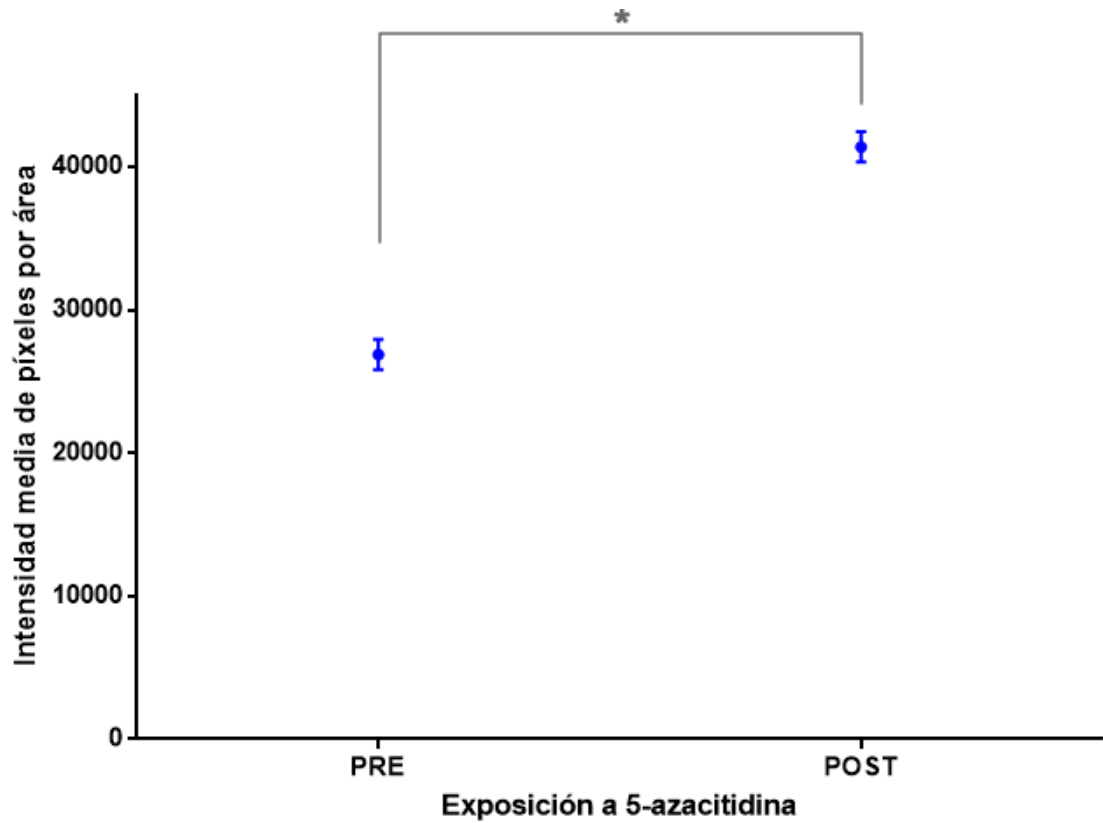


Figura 20. Intensidad media de píxeles por área según condición “PRE” o “POST” exposición a agente demetilante 1 μ M 5-azacitidina de cultivo celular de LLC-MK2 por 72 h. Se halló diferencias significativas ($P < 0.05$) en un ensayo por duplicado. En el eje vertical, 65535 es el valor de máxima ausencia de color (blanco puro) y 0 representa la máxima intensidad posible de color (negro puro).

IX. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se han examinado los efectos de la infección aguda de *T. cruzi* en el estado de metilación del ventrículo izquierdo de corazones de ratas Holtzman, empleando 2 cepas del parásito. Ambas cepas mostraron utilidad experimental, al no causar letalidad (ninguna rata murió antes de ser analizada), presentar parasitemia detectable y patología tisular concordante con lo descrito múltiples veces en la literatura (Perez *et al* 2009; Alvarado-Tapias *et al* 2010; Novaes *et al* 2017). Una de las cepas, la cepa “C300” (DTU TcI, Dr. Mike Levy, comunicación personal) mostró que en ciertas zonas del ventrículo existe aparente hipometilación global significativa comparada con el control no infectado. Este efecto solo pudo ser detectado al examinar los núcleos celulares del tejido mediante inmunohistoquímica cuantitativa, mientras que las pruebas de metilación global basadas en una plataforma ELISA empleando detección de DNA hipometilado no encontraron mayores diferencias entre los 3 grupos experimentales.

La otra cepa de *T. cruzi* empleada en el presente estudio, la cepa Y, DTU TcII (Zingales *et al* 2009) no causó alteraciones significativas de la metilación global en el tejido examinado ya sea mediante ELISA (Figura 11) o por inmunohistoquímica (Figuras 14, 15, 16). Al mismo tiempo esta cepa mostró (descriptivamente) menor número de individuos afectados con inflamación severa y mayor número de individuos afectados con inflamación moderada en comparación con C300, así como menor fibrosis (deposición de colágeno) (Figura 13). Aunque diversos reportes señalan que las cepas DTU TcII son más virulentas que las TcI (Sales-Campos *et al* 2014) y en este estudio se ha visto lo contrario, el daño tisular causado por la cepa Y (Tc II) no es irrelevante; simplemente a nivel de metilación los

cambios no han sido suficiente marcados para alcanzar significancia estadística. Por otra parte, está descrito que *T. cruzi* puede alterar su virulencia, a veces de manera irreversible, a lo largo del tiempo (Basombrio *et al* 2000). Otros estudios muestran que hay proporcionalidad entre marcadores de inflamación y el grado de alteraciones epigenéticas ((Baccarelli *et al* 2010; Perng *et al* 2012), lo cual permite hipotetizar que diferencias en la severidad de los signos patológicos causados por diferentes cepas parasitarias tiene un correlato a nivel de metilación.

El modelo experimental en sí ha demostrado ser informativo e útil. La ruta peritoneal empleada ofrece la ventaja de permitir la administración de volúmenes considerables de manera consistente en roedores (Turner *et al* 2011) y, el inóculo empleado (10^5) es comparable al usado por otros autores en ratas: $1 \times 10^5 - 4.8 \times 10^5$ (Junqueira Junior *et al* 1992); 3×10^5 (Teixeira *et al* 2001); 2×10^5 (Rendon *et al* 2007). Con respecto al sexo, en literatura se han usado indistintamente ratas macho y hembras, aunque las ratas hembras ofrecen la ventaja de permitir la implementación potencial de un modelo de transmisión vertical de la infección, además de ser menos territoriales y agresivas que los machos (Johansen *et al* 2008).

La duración de la fase experimental de este estudio (1 mes) fue implementada porque este periodo de tiempo es útil para observar las principales manifestaciones inflamatorias e histopatológicas de la enfermedad de Chagas. Si bien se podría considerar a la fase crónica como el gold estándar dentro de un modelo murino, todos los modelos animales son imperfectos en relación con los cuadros clínicos descritos en humanos (Silva *et al* 2012). La fase crónica no pudo ser implementada por razones logísticas; y podría servir como un punto complementario de estudio que apoye y profundice los hallazgos descritos en el presente estudio.

El primer método de análisis de DNA metilado, el kit MDQ1, se basa en la detección del mismo empleando un anticuerpo monoclonal específico contra 5-metilcitosina (Reynaud *et al* 1992), en una plataforma ELISA. Puesto que existe información consistente señalando la asociación entre inflamación y alteraciones epigenéticas (Bayarsaihan 2011), es hipotetizable que la inflamación chagásica aguda con típica infiltración mononuclear intensa (Engman y Leon 2002) cause alteraciones de metilación o epigenéticas en alguna forma. Sorprendentemente, no se encontraron diferencias significativas, y se observó al contrario una tendencia de hipermetilación global en la cepa Y, mientras que la cepa C300 mostró valores globales casi similares al grupo no infectado (Figura 11).

El tejido cardiaco mamífero está compuesto por muchos tipos diferentes de células (Zhou y Pu 2016), entre los cuales abundan los cardiomiocitos (70-85% del volumen del órgano), fibroblastos, células endoteliales, células perivasculares, macrófagos residentes y otras (Hulsmans *et al* 2017), por lo cual un análisis de DNA de lisado de tejido, como en este estudio, toma muchos tipos diferentes de epigenomas como sujeto de análisis al mismo tiempo. Esta heterogeneidad se complica por la forma específica de reaccionar de un linaje celular ante infección/inflamación, causando potencial ruido en un análisis global por las múltiples vías de señalización activándose o desactivándose. En consecuencia, podría haber ocurrido que: hubo cambios de metilación pero limitados a unas cuantas células, o hubo aparición de hipometilación global mezclados con hipermetilación global (Stenvinkel *et al* 2007; Arai *et al* 2009) formando un patrón de cancelación, o hubo cambios de metilación exclusivamente locales sin alteraciones globales (Lee *et al* 2008), o no ocurrieron cambios en el estado de

metilación a pesar del entorno proinflamatorio, o era necesario más tiempo (proceso crónico). Es de notar que, en la enfermedad de Chagas, las células infectadas son por definición escasas, formando un patrón multifocal y dinámico (Lewis y Kelly 2016). Es posible que, a pesar del microentorno proinflamatorio, la señal producida por cambios epigenéticos en células infectadas (parasitadas intracelularmente), se pierda en el gran conjunto de DNA de otras células cardíacas (dilución de la señal). Asimismo, es sabido que las tecnologías de análisis de metilación basadas en ELISA poseen poco poder resolutivo, y relativamente alta variabilidad intra e inter ensayo [(Kurdyukov y Bullock 2016) , así como comunicación personal con Jennifer Gormley, especialista en el área de servicio técnico de kits epigenéticos de la casa matriz Sigma, USA]. Por tanto, se puede afirmar de manera conservativa que no hay evidencia de cambios masivos (gran porcentaje de la población celular presentando cambios), o direccionalidad pronunciada (una gran tendencia de las células afectadas hipermetilando o hipometilando pero no ambas opciones simultáneamente) en las muestras procesadas, para ambas cepas. Las células miocárdicas poseen enorme actividad metabólica, con un 20-40% de su volumen citoplasmático ocupado por mitocondrias (Marin-Garcia y Goldenthal 2002) y las alteraciones funcionales del tejido cardíaco en la enfermedad de Chagas tienen un componente de daño mitocondrial, principalmente por el incremento de las especies reactivas prooxidativas (Wen y Garg 2018). Otros autores han descrito alteraciones dinámicas de metilación global miocárdica en insuficiencia cardíaca (Pepin *et al* 2018), apuntando a diferentes causas con la consecuencia común de alteración del equilibrio epigenético y que explicarían la mayores alteraciones encontradas en este estudio en comparación con el resto de estructuras cardíacas.

Aunque múltiples estudios y revisiones han abordado el fenómeno de las disrupciones de diferentes componentes de la maquinaria epigenética normal del hospedero por causa de patógenos microbianos (Silmon de Monerri y Kim 2014) hay contados artículos en la literatura acerca de parásitos eucariontes y metilación de DNA del hospedero. Marr *et al* (Marr *et al* 2014) describió que macrófagos humanos infectados con *Leishmania donovani*, parásito de la misma familia que *T. cruzi* (Trypanosomatidae) presentan alteraciones de metilación en regiones promotoras, así como en partes de los cuerpos de los genes, tanto hiper como hipometilación. Aunque el mecanismo es desconocido, parásitos muertos de *Leishmania donovani* no causan alteraciones de metilación al ser fagocitados por los macrófagos, sugiriendo una manipulación activa de parte del parásito. *Plasmodium chabaudi* (un apicomplejo usado para modelos murinos de malaria) es capaz de causar cambios de metilación en promotores de genes de defensa como los TLRs (*Toll-like receptors*) (Al-Quraishy *et al* 2013). Mucho más publicitado es el caso de *Toxoplasma gondii* (otro apicomplejo) que según hallazgos de Hari Dass y Vyas (2014) causa cambios de metilación de DNA en la amígdala medial del cerebro en ratones infectados. La vasopresina, una hormona nonapeptídica, y que tiene roles en la regulación de la presión sanguínea así como la socialización y conducta mamífera es hipometilada en su promotor tras la infección; lo cual en conjunto con lo anterior se traduce en ratones infectados sintiendo *atracción* en vez de miedo a los gatos, facilitando la transmisión del parásito.

El método que se ha usado en este estudio para complementar el análisis de DNA metilado, denominado inmunohistoquímica cuantitativa (qIHC), ha sido empleado en algunos estudios para evaluar el estado de la metilación global del DNA

(Piyathilake *et al* 2001; Karouzakis *et al* 2009; Gao *et al* 2011) y ofrece la ventaja de examinar tejidos directamente, contrarrestando la “dilución de la señal” que podría existir con la metodología anteriormente mencionada. Tiene coherencia el razonamiento que, de acuerdo con la información histológica (Figura 13) se puede detectar disminución significativa de la metilación global causada por la infección de la cepa “más virulenta” (C300) mientras que la cepa “menos virulenta” (Y) no alcanza un efecto detectable por esta técnica. Por esta razón, en este estudio, la qIHC ha sido más informativa que el ELISA. Un punto meritorio de atención es que no hubo parasitemia detectable en el 100% de individuos infectados por microhematocrito (visualización directa en campo claro), aunque sí hubo parasitemia detectable por métodos moleculares en todos los individuos inoculados. Esto podría haber generado cierta heterogeneidad experimental no prevista y afectado la capacidad de detección de alteraciones de metilación, dado que hay correlaciones descritas entre daño tisular, parasitemia, inóculo inicial, prognosis durante la fase crónica, y activación de la respuesta inmune en los modelos animales de Chagas (Marinho *et al* 1999). Aun cuando se evidenció a nivel histológico daño universal en ambos grupos experimentales, un escenario ideal hubiera sido parasitemia detectable por microhematocrito en todos los individuos inoculados, homogenizando las muestras y elevando el poder estadístico.

Las limitaciones de este estudio son extensas. Se asumió asimismo un tamaño del efecto de mediano a grande; es decir que basta con un reducido número de animales para evidenciar modulaciones epigenéticas asociadas a la inflamación presente. Las técnicas usadas para evaluar el estado de metilación global no se consideran *gold standard*, y han sido usadas por un número reducido de autores; sin embargo, las

técnicas gold standard, tales como secuenciamiento con bisulfito (Beier et al 2007), son prohibitivamente más caras, con costos órdenes de magnitud mayores. Por razones logísticas/presupuestarias tampoco, no fue posible, por ejemplo, analizar la población leucocitaria por ningún método empleado. En concordancia con el paradigma de medicina mínimamente invasiva, muchos estudios intentan asociar alteraciones epigenéticas en sangre (leucocitos) con patologías sistémicas, y en lo pertinente con este estudio, eso sería el estado de metilación local o metilación global del DNA. Existe un amplio rango de publicaciones, en constante expansión, con esta estrategia analítica, que evalúan muchas condiciones sistémicas, como por ejemplo la influencia de disciplinas físicas como Yoga (Harkess *et al* 2016), Tai-chi (Ren *et al* 2012), el efecto de fumar (Hillemacher *et al* 2008) lupus eritematoso sistémico (Hedrich 2017), exposición a polvo ambiental (Cantone *et al* 2017), envejecimiento (Gravina y Vijg 2010), enfermedades cardiovasculares (Kim *et al* 2010), entre otras.

En este sentido, la enfermedad de Chagas es sistémica, y el análisis inmunológico de leucocitos ha sido llevado a cabo repetidas veces en otros estudios, encontrándose principalmente que las poblaciones celulares de linfocitos T y B está anormalmente incrementada en pacientes sintomáticos de la fase crónica (Dutra *et al* 1994; Dutra *et al* 1996) así como sus perfiles exhiben un comportamiento excesivamente pro-inflamatorio y con pérdida de especificidad anti-parasitaria y funcionalidad (Garg *et al* 2016). Si bien no se ha realizado ningún estudio que evalúe epigenéticamente la población leucocitaria del hospedero durante la fase aguda o crónica de Chagas, se podría hipotetizar que habrían alteraciones en las regiones de control (promotores) de genes pro-inflamatorios, sus secuencias

(exones, intrones), o sus reguladores trans. Si consideramos a los principales genes mediadores de inflamación Th1 en Chagas (las citoquinas TNF- α , IFN- γ , TGF- β), se sabe que se ha descrito ya, la participación de aberraciones de metilación de DNA en otras patogénesis y en el control de expresión de cada uno de estos mediadores (Yano *et al* 2003; Sullivan *et al* 2007; Wang *et al* 2013).

Sobre las estrategias farmacológicas que se podrían aplicar para normalizar el estado de metilación, el escenario es desafiante. Diversos grupos de investigación están tratando de detener o revertir el desembocamiento en falla cardiaca chagásica con numerosas drogas distintas y mediante la intervención en diferentes vías de señalización (Perez *et al* 2009; Penitente *et al* 2015; Horta *et al* 2017) pero es más lo que se ignora que lo que se comprende en esta patogénesis. Drogas capaces de modificar el estatus de metilación del DNA, tales como la 5-azacitidina, son demasiado tóxicas, no superan un análisis riesgo/beneficio y no podrían ser usadas en la enfermedad de Chagas. Sin embargo, estrategias más modernas como CRISPR/Cas9 han mostrado recientemente la capacidad de alterar el estado de metilación de regiones muy puntuales (Liu *et al* 2016). Por supuesto, esto implica que el epigenoma patológico de la enfermedad de Chagas debe ser descrito con la mayor profundidad posible, identificando las alteraciones más relevantes y pudiendo así maximizar la efectividad de cualquier tratamiento de edición epigenética (no genética) del hospedero con la mínima invasividad posible. Eventos patológicos cuasi universales en Chagas como fibrosis e inflamación desregulada ofrecen un punto de ataque inicial para estudios de identificación de alteraciones epigenéticas puntuales.

Existe ahora una multitud de tecnologías en proceso de maduración capaces de brindar esta información y que, por limitaciones de recursos tanto financieros como logísticos, no ha sido posible emplear. Es posible secuenciar el “metiloma” entero de un tejido por secuenciación entera del genoma post-tratamiento con bisulfito de sodio (*Whole Genome Bisulfite Sequencing*), el cual convierte solamente las citosinas no metiladas a uracilo, y este uracilo es luego amplificado como timina en una PCR, porque la *Taq* no puede distinguir entre uracilo y timina en las subsiguientes rondas de amplificación. De esta forma, se puede obtener información precisa acerca del estado de metilación de sitios específicos, así como a nivel alélico (el alelo paterno podría estar metilado y el materno no, etc), y subpoblacional (no todas las células de un tejido estarán metiladas o no en una región específica de su genoma). También es posible secuenciar solo regiones génicas repetitivas y móviles como LINE-1 (*Long interspersed nuclear elements*) las cuales forman el 17% del genoma humano y reflejan, hasta cierto punto aceptable, el estado de metilación global de una célula mamífera (*Whole Genome Methylation Profiling*). Otras metodologías más específicas (locales) incluyen el uso de microarreglos de detección, la captura selectiva (enriquecimiento) con *beads* de regiones de alta metilación del genoma previamente cortado en miles de fragmentos con un anticuerpo monoclonal anti – 5mC (Kurdyukov y Bullock 2016). La lista de metodologías modernas es muy extensa, y la gran mayoría implica el uso de una capacidad instalada de análisis bioinformático de un gran volumen de datos, algo que no hubiera sido posible de ejecutar en el presente estudio.

En conjunto, el presente estudio aporta un nuevo enfoque hacia el siempre desafiante entendimiento de la patogénesis de la enfermedad de Chagas. Este plano,

el epigenético, no ha sido, hasta nuestro conocimiento, descrito hasta ahora y sus disrupciones se pueden concebir como una adición más al arsenal descrito de *T. cruzi* para ser capaz infectar virtualmente cualquier célula mamífera, escapar desde el fagosoma de los macrófagos a su citoplasma, inducir apoptosis de linfocitos, entre otros mecanismos. Se ha podido evidenciar alteraciones en los niveles de metilación de tejido cardíaco de individuos infectados en la fase aguda, aunque es muy probablemente proyectable a la fase crónica, debido a que los cardiomiocitos son probablemente células post-mitóticas en su mayoría, con escasa plasticidad, resultando en la irreversibilidad de sus alteraciones de metilación así la infección fuera hipóticamente removida en su totalidad. Si bien este parásito ha mostrado ser un formidable adversario a nuestra especie a 110 años de su descripción, este y futuros estudios de mayor envergadura en el campo epigenético prometen ayudar a resolver su patogénesis y servir de base para futuras propuestas terapéuticas.

X. CONCLUSIONES

- Las ratas infectadas con *T. cruzi*, durante la infección aguda, muestran una hipometilación global de DNA, en el ventrículo izquierdo.
- La hipometilación es detectable solo en la infección con la cepa C300 (DTU TcI), la cual evidenció severo daño histológico, y no fue detectable con la cepa Y (DTU Tc II)
- La hipometilación debido a la cepa C300 (DTU TcI) solo se evidencia en el miocardio y endocardio, más no en el epicardio.

Los individuos inoculados experimentalmente presentaron patologías tisulares marcadas e identificables, tales como inflamación severa y fibrosis, además de parasitemia detectable, permitiendo que el modelo sea considerado como modelo animal útil e informativo.

XI. RECOMENDACIONES

- Emplear métodos de análisis de metilación de DNA más profundos, tanto enfocados a todo el genoma así como a regiones génicas particulares, es decir niveles global y local, junto con la implementación de un flujo de trabajo capaz de analizar informáticamente todos los datos que se generarían.
- Dedicar una unidad de bioinformática (software, hardware) así como un equipo de trabajo de análisis para post-procesamiento de datos crudos “ómicos”: (epigenómicos, genómicos, transcriptómicos...).
- Evaluar además más tejidos (leucocitos, tejido arterial, grasa epicárdica, tejido gastrointestinal) debido a la naturaleza específica de línea celular de sus patrones epigenéticos.

XII. BIBLIOGRAFÍA

- Adhya, D. y Basu, A. (2010). Epigenetic modulation of host: new insights into immune evasion by viruses. *J Biosci* 35(4): 647-663.
- Al-Quraishy, S., Dkhil, M. A., Abdel-Baki, A. A., Delic, D., Santourlidis, S., Wunderlich, F. (2013). Genome-wide screening identifies *Plasmodium chabaudi*-induced modifications of DNA methylation status of Tlr1 and Tlr6 gene promoters in liver, but not spleen, of female C57BL/6 mice. *Parasitol Res* 112(11): 3757-3770.
- Al Akeel, R. (2013). Role of epigenetic reprogramming of host genes in bacterial pathogenesis. *Saudi J Biol Sci* 20(4): 305-309.
- Albuquerque, S. S., Carret, C., Grosso, A. R., Tarun, A. S., Peng, X., Kappe, S. H., Prudencio, M., Mota, M. M. (2009). Host cell transcriptional profiling during malaria liver stage infection reveals a coordinated and sequential set of biological events. *BMC Genomics* 10: 270.
- Alvarado-Tapias, E., Rivas-Coppola, M., Alvarado, A., Bello, M., Briceno, M., Rodriguez-Bonfante, C., Bonfante-Cabarcas, R. (2010). [Adenosine induces ventricular arrhythmias in hearts with chronic chagas cardiomyopathy]. *Rev Esp Cardiol* 63(4): 478-482.
- Andersson, J., Orn, A., Sunnemark, D. (2003). Chronic murine Chagas' disease: the impact of host and parasite genotypes. *Immunol Lett* 86(2): 207-212.
- Arai, E., Ushijima, S., Fujimoto, H., Hosoda, F., Shibata, T., Kondo, T., Yokoi, S., Imoto, I., Inazawa, J., Hirohashi, S., Kanai, Y. (2009). Genome-wide DNA methylation profiles in both precancerous conditions and clear cell renal cell

- carcinomas are correlated with malignant potential and patient outcome. *Carcinogenesis* 30(2): 214-221.
- Aufderheide, A. C., Salo, W., Madden, M., Streitz, J., Buikstra, J., Guhl, F., Arriaza, B., Renier, C., Wittmers, L. E., Jr., Fornaciari, G., Allison, M. (2004). A 9,000-year record of Chagas' disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(7): 2034-2039.
- Ba, X., Gupta, S., Davidson, M., Garg, N. J. (2010). Trypanosoma cruzi induces the reactive oxygen species-PARP-1-RelA pathway for up-regulation of cytokine expression in cardiomyocytes. *J Biol Chem* 285(15): 11596-11606.
- Baccarelli, A., Tarantini, L., Wright, R. O., Bollati, V., Litonjua, A. A., Zanobetti, A., Sparrow, D., Vokonas, P. S., Schwartz, J. (2010). Repetitive element DNA methylation and circulating endothelial and inflammation markers in the VA normative aging study. *Epigenetics* 5(3): 222-228.
- Bartova, E., Krejci, J., Harnicarova, A., Galiova, G., Kozubek, S. (2008). Histone modifications and nuclear architecture: a review. *J Histochem Cytochem* 56(8): 711-721.
- Basombrio, M. A., Segura, M. A., Gomez, L., Padilla, M. (2000). Studies on the virulence and attenuation of Trypanosoma cruzi using immunodeficient animals. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 95 Suppl 1: 175-178.
- Bayarsaihan, D. (2011). Epigenetic mechanisms in inflammation. *J Dent Res* 90(1): 9-17.
- Berger, A. (2000). Th1 and Th2 responses: what are they? *BMJ* 321(7258): 424.
- Bern, C. (2011). Antitrypanosomal therapy for chronic Chagas' disease. *N Engl J Med* 364(26): 2527-2534.

- Bern, C. (2015). Chagas' Disease. *N Engl J Med* 373(5): 456-466.
- Bestetti, R. B. y Muccillo, G. (1997). Clinical course of Chagas' heart disease: a comparison with dilated cardiomyopathy. *Int J Cardiol* 60(2): 187-193.
- Bestor, T. H. (2000). The DNA methyltransferases of mammals. *Hum Mol Genet* 9(16): 2395-2402.
- Bianchi, M. E. (2007). DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J Leukoc Biol* 81(1): 1-5.
- Bougdour, A., Durandau, E., Brenier-Pinchart, M. P., Ortet, P., Barakat, M., Kieffer, S., Curt-Varesano, A., Curt-Bertini, R. L., Bastien, O., Coute, Y., Pelloux, H., Hakimi, M. A. (2013). Host cell subversion by *Toxoplasma* GRA16, an exported dense granule protein that targets the host cell nucleus and alters gene expression. *Cell Host Microbe* 13(4): 489-500.
- Cantone, L., Iodice, S., Tarantini, L., Albetti, B., Restelli, I., Vigna, L., Bonzini, M., Pesatori, A. C., Bollati, V. (2017). Particulate matter exposure is associated with inflammatory gene methylation in obese subjects. *Environ Res* 152: 478-484.
- Cardoni, R. L. (1997). [Inflammatory response to acute *Trypanosoma cruzi* infection]. *Medicina (B Aires)* 57(2): 227-234.
- Coates, B. M., Sullivan, D. P., Mekanji, M. Y., Du, N. Y., Olson, C. L., Muller, W. A., Engman, D. M., Epting, C. L. (2013). Endothelial transmigration by *Trypanosoma cruzi*. *PLoS One* 8(12): e81187.
- Coura, J. R. (2007). Chagas disease: what is known and what is needed - A background article. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 102: 113-122.

- Coura, J. R. y Vinas, P. A. (2010). Chagas disease: a new worldwide challenge. *Nature* 465(7301): S6-7.
- Cui, H., Horon, I. L., Ohlsson, R., Hamilton, S. R., Feinberg, A. P. (1998). Loss of imprinting in normal tissue of colorectal cancer patients with microsatellite instability. *Nat Med* 4(11): 1276-1280.
- Cunha-Neto, E., Bilate, A. M., Hyland, K. V., Fonseca, S. G., Kalil, J., Engman, D. M. (2006). Induction of cardiac autoimmunity in Chagas heart disease: a case for molecular mimicry. *Autoimmunity* 39(1): 41-54.
- Chagas, C. (1909). Nova tripanozomiasis humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1: 159-218.
- Chiribao, M. L., Libisch, G., Parodi-Talice, A., Robello, C. (2014). Early *Trypanosoma cruzi* infection reprograms human epithelial cells. *Biomed Res Int* 2014: 439501.
- de Araujo, F. F., Vitelli-Avelar, D. M., Teixeira-Carvalho, A., Antas, P. R., Assis Silva Gomes, J., Sathler-Avelar, R., Otavio Costa Rocha, M., Eloi-Santos, S. M., Pinho, R. T., Correa-Oliveira, R., Martins-Filho, O. A. (2011). Regulatory T cells phenotype in different clinical forms of Chagas' disease. *PLoS Negl Trop Dis* 5(5): e992.
- de Oliveira, G. M., Diniz, R. L., Batista, W., Batista, M. M., Bani Correa, C., de Araujo-Jorge, T. C., Henriques-Pons, A. (2007). Fas ligand-dependent inflammatory regulation in acute myocarditis induced by *Trypanosoma cruzi* infection. *Am J Pathol* 171(1): 79-86.

- Dhiman, M., Wan, X., Popov, V. L., Vargas, G., Garg, N. J. (2013). MnSODtg mice control myocardial inflammatory and oxidative stress and remodeling responses elicited in chronic Chagas disease. *J Am Heart Assoc* 2(5): e000302.
- Dias, B. G. y Ressler, K. J. (2014). Parental olfactory experience influences behavior and neural structure in subsequent generations. *Nat Neurosci* 17(1): 89-96.
- Dias, J. C., Dias, E., Martins-Filho, O. A., Vitelli-Avelar, D., Correia, D., Lages, E., Prata, A. (2008). Further evidence of spontaneous cure in human Chagas disease. *Rev Soc Bras Med Trop* 41(5): 505-506.
- Drigo, S. A., Cunha-Neto, E., Ianni, B., Cardoso, M. R., Braga, P. E., Fae, K. C., Nunes, V. L., Buck, P., Mady, C., Kalil, J., Goldberg, A. C. (2006). TNF gene polymorphisms are associated with reduced survival in severe Chagas' disease cardiomyopathy patients. *Microbes Infect* 8(3): 598-603.
- Durrani, Z., Weir, W., Pillai, S., Kinnaird, J., Shiels, B. (2012). Modulation of activation-associated host cell gene expression by the apicomplexan parasite *Theileria annulata*. *Cell Microbiol* 14(9): 1434-1454.
- Dutra, W. O., da Luz, Z. M., Cancado, J. R., Pereira, M. E., Brigido-Nunes, R. M., Galvao, L. M., Colley, D. G., Brener, Z., Gazzinelli, G., Carvalho-Parra, J. F. (1996). Influence of parasite presence on the immunologic profile of peripheral blood mononuclear cells from chagasic patients after specific drug therapy. *Parasite Immunol* 18(11): 579-585.
- Dutra, W. O., Martins-Filho, O. A., Cancado, J. R., Pinto-Dias, J. C., Brener, Z., Freeman Junior, G. L., Colley, D. G., Gazzinelli, G., Parra, J. C. (1994).

- Activated T and B lymphocytes in peripheral blood of patients with Chagas' disease. *Int Immunol* 6(4): 499-506.
- Eberharter, A. y Becker, P. B. (2002). Histone acetylation: a switch between repressive and permissive chromatin. Second in review series on chromatin dynamics. *EMBO Rep* 3(3): 224-229.
- Engman, D. M. y Leon, J. S. (2002). Pathogenesis of Chagas heart disease: role of autoimmunity. *Acta Trop* 81(2): 123-132.
- Faul, F., Erdfelder, E., Lang, A. G., Buchner, A. (2007). G*Power 3: a flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. *Behav Res Methods* 39(2): 175-191.
- Feinberg, A. P. (2008). Epigenetics at the epicenter of modern medicine. *JAMA* 299(11): 1345-1350.
- Frade, A. F., Pissetti, C. W., Ianni, B. M., Saba, B., Lin-Wang, H. T., Nogueira, L. G., de Melo Borges, A., Buck, P., Dias, F., Baron, M., Ferreira, L. R., Schmidt, A., Marin-Neto, J. A., Hirata, M., Sampaio, M., Fragata, A., Pereira, A. C., Donadi, E., Kalil, J., Rodrigues, V., Cunha-Neto, E., Chevillard, C. (2013). Genetic susceptibility to Chagas disease cardiomyopathy: involvement of several genes of the innate immunity and chemokine-dependent migration pathways. *BMC Infect Dis* 13: 587.
- Gao, W. L., Li, D., Xiao, Z. X., Liao, Q. P., Yang, H. X., Li, Y. X., Ji, L., Wang, Y. L. (2011). Detection of global DNA methylation and paternally imprinted H19 gene methylation in preeclamptic placentas. *Hypertens Res* 34(5): 655-661.

- Garg, N. J., Soman, K. V., Zago, M. P., Koo, S. J., Spratt, H., Stafford, S., Blell, Z. N., Gupta, S., Nunez Burgos, J., Barrientos, N., Brasier, A. R., Wiktorowicz, J. E. (2016). Changes in Proteome Profile of Peripheral Blood Mononuclear Cells in Chronic Chagas Disease. *PLoS Negl Trop Dis* 10(2): e0004490.
- Geeleher, P., Huang, S. R., Gamazon, E. R., Golden, A., Seoighe, C. (2012). The regulatory effect of miRNAs is a heritable genetic trait in humans. *BMC Genomics* 13: 383.
- Geurts, N., Opdenakker, G., Van den Steen, P. E. (2012). Matrix metalloproteinases as therapeutic targets in protozoan parasitic infections. *Pharmacol Ther* 133(3): 257-279.
- Gloeckner, C., Garner, A. L., Mersha, F., Oksov, Y., Tricoche, N., Eubanks, L. M., Lustigman, S., Kaufmann, G. F., Janda, K. D. (2010). Repositioning of an existing drug for the neglected tropical disease Onchocerciasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(8): 3424-3429.
- Golgher, D. y Gazzinelli, R. T. (2004). Innate and acquired immunity in the pathogenesis of Chagas disease. *Autoimmunity* 37(5): 399-409.
- Gravina, S. y Vijg, J. (2010). Epigenetic factors in aging and longevity. *Pflugers Arch* 459(2): 247-258.
- Haller, D., Mackiewicz, M., Gerber, S., Beyer, D., Kullmann, B., Schneider, I., Ahmed, J. S., Seitzer, U. (2010). Cytoplasmic sequestration of p53 promotes survival in leukocytes transformed by *Theileria*. *Oncogene* 29(21): 3079-3086.

- Hari Dass, S. A. y Vyas, A. (2014). *Toxoplasma gondii* infection reduces predator aversion in rats through epigenetic modulation in the host medial amygdala. *Mol Ecol* 23(24): 6114-6122.
- Harkess, K. N., Ryan, J., Delfabbro, P. H., Cohen-Woods, S. (2016). Preliminary indications of the effect of a brief yoga intervention on markers of inflammation and DNA methylation in chronically stressed women. *Transl Psychiatry* 6(11): e965.
- Hedrich, C. M. (2017). Epigenetics in SLE. *Curr Rheumatol Rep* 19(9): 58.
- Heijmans, B. T., Tobi, E. W., Stein, A. D., Putter, H., Blauw, G. J., Susser, E. S., Slagboom, P. E., Lumey, L. H. (2008). Persistent epigenetic differences associated with prenatal exposure to famine in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(44): 17046-17049.
- Herman, J. G. y Baylin, S. B. (2003). Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med* 349(21): 2042-2054.
- Heussler, V. T., Machado, J., Jr., Fernandez, P. C., Botteron, C., Chen, C. G., Pearse, M. J., Dobbelaere, D. A. (1999). The intracellular parasite *Theileria parva* protects infected T cells from apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(13): 7312-7317.
- Hillemacher, T., Frieling, H., Moskau, S., Muschler, M. A., Semmler, A., Kornhuber, J., Klockgether, T., Bleich, S., Linnebank, M. (2008). Global DNA methylation is influenced by smoking behaviour. *Eur Neuropsychopharmacol* 18(4): 295-298.
- Horta, A. L., Leite, A. L., Paula Costa, G., Figueiredo, V. P., Talvani, A. (2017). Potential Role of Carvedilol in the Cardiac Immune Response Induced by

Experimental Infection with *Trypanosoma cruzi*. *Biomed Res Int* 2017: 9205062.

Hulsmans, M., Clauss, S., Xiao, L., Aguirre, A. D., King, K. R., Hanley, A., Hucker, W. J., Wulfers, E. M., Seemann, G., Courties, G., Iwamoto, Y., Sun, Y., Savol, A. J., Sager, H. B., Lavine, K. J., Fishbein, G. A., Capen, D. E., Da Silva, N., Miquerol, L., Wakimoto, H., Seidman, C. E., Seidman, J. G., Sadreyev, R. I., Naxerova, K., Mitchell, R. N., Brown, D., Libby, P., Weissleder, R., Swirski, F. K., Kohl, P., Vinegoni, C., Milan, D. J., Ellinor, P. T., Nahrendorf, M. (2017). Macrophages Facilitate Electrical Conduction in the Heart. *Cell* 169(3): 510-522 e520.

Hur, K., Niwa, T., Toyoda, T., Tsukamoto, T., Tatematsu, M., Yang, H. K., Ushijima, T. (2011). Insufficient role of cell proliferation in aberrant DNA methylation induction and involvement of specific types of inflammation. *Carcinogenesis* 32(1): 35-41.

INS (2005). Manual de procedimientos de laboratorio para el diagnóstico de la trypanosomiosis americana (enfermedad de Chagas). SERIE DE NORMAS TÉCNICAS 00.

Jahner, D. y Jaenisch, R. (1985). Retrovirus-induced de novo methylation of flanking host sequences correlates with gene inactivity. *Nature* 315(6020): 594-597.

Johansen, J. A., Clemens, L. G., Nunez, A. A. (2008). Characterization of copulatory behavior in female mice: evidence for paced mating. *Physiol Behav* 95(3): 425-429.

- Johnston, S. R. (2009). Are current drug development programmes realising the full potential of new agents? The scenario. *Breast Cancer Res* 11 Suppl 3: S21.
- Junqueira Junior, L. F., Beraldo, P. S., Chapadeiro, E., Jesus, P. C. (1992). Cardiac autonomic dysfunction and neuroganglionitis in a rat model of chronic Chagas' disease. *Cardiovasc Res* 26(4): 324-329.
- Karouzakis, E., Gay, R. E., Michel, B. A., Gay, S., Neidhart, M. (2009). DNA hypomethylation in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum* 60(12): 3613-3622.
- Kawai, T. y Akira, S. (2011). Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity* 34(5): 637-650.
- Kim, J. W., Isobe, T., Chang, K. H., Amano, A., Maneja, R. H., Zamora, P. B., Siringan, F. P., Tanabe, S. (2011). Levels and distribution of organophosphorus flame retardants and plasticizers in fishes from Manila Bay, the Philippines. *Environ Pollut* 159(12): 3653-3659.
- Kim, M., Long, T. I., Arakawa, K., Wang, R., Yu, M. C., Laird, P. W. (2010). DNA methylation as a biomarker for cardiovascular disease risk. *PLoS One* 5(3): e9692.
- Kollien, A. H., Grospietsch, T., Kleffmann, T., Zerbst-Boroffka, I., Schaub, G. A. (2001). Ionic composition of the rectal contents and excreta of the reduviid bug *Triatoma infestans*. *J Insect Physiol* 47(7): 739-747.
- Kurdyukov, S. y Bullock, M. (2016). DNA Methylation Analysis: Choosing the Right Method. *Biology (Basel)* 5(1).
- Law, J. A. y Jacobsen, S. E. (2010). Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. *Nat Rev Genet* 11(3): 204-220.

- Lee, J. J., Geli, J., Larsson, C., Wallin, G., Karimi, M., Zedenius, J., Hoog, A., Foukakis, T. (2008). Gene-specific promoter hypermethylation without global hypomethylation in follicular thyroid cancer. *Int J Oncol* 33(4): 861-869.
- Lee, R. C., Feinbaum, R. L., Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75(5): 843-854.
- Lewis, M. D. y Kelly, J. M. (2016). Putting Infection Dynamics at the Heart of Chagas Disease. *Trends Parasitol* 32(11): 899-911.
- Lidani, K. C. F., Andrade, F. A., Bavia, L., Damasceno, F. S., Beltrame, M. H., Messias-Reason, I. J., Sandri, T. L. (2019). Chagas Disease: From Discovery to a Worldwide Health Problem. *Front Public Health* 7: 166.
- Liu, X. S., Wu, H., Ji, X., Stelzer, Y., Wu, X., Czauderna, S., Shu, J., Dadon, D., Young, R. A., Jaenisch, R. (2016). Editing DNA Methylation in the Mammalian Genome. *Cell* 167(1): 233-247 e217.
- Marin-Garcia, J. y Goldenthal, M. J. (2002). [The mitochondrial organelle and the heart]. *Rev Esp Cardiol* 55(12): 1293-1310.
- Marin-Neto, J. A., Cunha-Neto, E., Maciel, B. C., Simoes, M. V. (2007). Pathogenesis of chronic Chagas heart disease. *Circulation* 115(9): 1109-1123.
- Marinho, C. R., D'Imperio Lima, M. R., Grisotto, M. G., Alvarez, J. M. (1999). Influence of acute-phase parasite load on pathology, parasitism, and activation of the immune system at the late chronic phase of Chagas' disease. *Infect Immun* 67(1): 308-318.

- Marino, A. P., Silva, A. A., Pinho, R. T., Lannes-Vieira, J. (2003). Trypanosoma cruzi infection: a continuous invader-host cell cross talk with participation of extracellular matrix and adhesion and chemoattractant molecules. *Braz J Med Biol Res* 36(8): 1121-1133.
- Marr, A. K., MacIsaac, J. L., Jiang, R., Airo, A. M., Kobor, M. S., McMaster, W. R. (2014). Leishmania donovani infection causes distinct epigenetic DNA methylation changes in host macrophages. *PLoS Pathog* 10(10): e1004419.
- Matsuda, N. M., Miller, S. M., Evora, P. R. (2009). The chronic gastrointestinal manifestations of Chagas disease. *Clinics (Sao Paulo)* 64(12): 1219-1224.
- Meeran, S. M., Ahmed, A., Tollefsbol, T. O. (2010). Epigenetic targets of bioactive dietary components for cancer prevention and therapy. *Clin Epigenetics* 1(3-4): 101-116.
- Morgan, X. C. y Huttenhower, C. (2012). Chapter 12: Human microbiome analysis. *PLoS Comput Biol* 8(12): e1002808.
- Munoz-Saravia, S. G., Haberland, A., Wallukat, G., Schimke, I. (2012). Chronic Chagas' heart disease: a disease on its way to becoming a worldwide health problem: epidemiology, etiopathology, treatment, pathogenesis and laboratory medicine. *Heart Fail Rev* 17(1): 45-64.
- Nagajyothi, F., Desruisseaux, M. S., Jelicks, L. A., Machado, F. S., Chua, S., Scherer, P. E., Tanowitz, H. B. (2009). Perspectives on adipose tissue, chagas disease and implications for the metabolic syndrome. *Interdiscip Perspect Infect Dis* 2009: 824324.
- Nagajyothi, F., Machado, F. S., Burleigh, B. A., Jelicks, L. A., Scherer, P. E., Mukherjee, S., Lisanti, M. P., Weiss, L. M., Garg, N. J., Tanowitz, H. B.

- (2012). Mechanisms of *Trypanosoma cruzi* persistence in Chagas disease. *Cell Microbiol* 14(5): 634-643.
- 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: 494-504.
- Novaes, R. D., Goncalves, R. V., Penitente, A. R., Cupertino, M. C., Maldonado, I., Talvani, A., Natali, A. J. (2017). Parasite control and skeletal myositis in *Trypanosoma cruzi*-infected and exercised rats. *Acta Trop* 170: 8-15.
- Penitente, A. R., Leite, A. L., de Paula Costa, G., Shrestha, D., Horta, A. L., Natali, A. J., Neves, C. A., Talvani, A. (2015). Enalapril in Combination with Benznidazole Reduces Cardiac Inflammation and Creatine Kinases in Mice Chronically Infected with *Trypanosoma cruzi*. *Am J Trop Med Hyg* 93(5): 976-982.
- Pepin, M. E., Ha, C. M., Crossman, D. K., Litovsky, S. H., Varambally, S., Barchue, J. P., Pamboukian, S. V., Diakos, N. A., Drakos, S. G., Pogwizd, S. M., Wende, A. R. (2018). Genome-wide DNA methylation encodes cardiac transcriptional reprogramming in human ischemic heart failure. *Lab Invest*.
- Perez, A. R., Fontanella, G. H., Nocito, A. L., Revelli, S., Bottasso, O. A. (2009). Short treatment with the tumour necrosis factor-alpha blocker infliximab diminishes chronic chagasic myocarditis in rats without evidence of *Trypanosoma cruzi* reactivation. *Clin Exp Immunol* 157(2): 291-299.
- Perez, C. J., Lymbery, A. J., Thompson, R. C. (2014). Chagas disease: the challenge of polyparasitism? *Trends Parasitol* 30(4): 176-182.

- Perng, W., Rozek, L. S., Mora-Plazas, M., Duchin, O., Marin, C., Forero, Y., Baylin, A., Villamor, E. (2012). Micronutrient status and global DNA methylation in school-age children. *Epigenetics* 7(10): 1133-1141.
- Piacenza, L., Peluffo, G., Alvarez, M. N., Martinez, A., Radi, R. (2013). *Trypanosoma cruzi* antioxidant enzymes as virulence factors in Chagas disease. *Antioxid Redox Signal* 19(7): 723-734.
- Piron, M., Fisa, R., Casamitjana, N., Lopez-Chejade, P., Puig, L., Verges, M., Gascon, J., Gomez i Prat, J., Portus, M., Sauleda, S. (2007). Development of a real-time PCR assay for *Trypanosoma cruzi* detection in blood samples. *Acta Trop* 103(3): 195-200.
- Piyathilake, C. J., Frost, A. R., Bell, W. C., Oelschlager, D., Weiss, H., Johanning, G. L., Niveleau, A., Heimburger, D. C., Grizzle, W. E. (2001). Altered global methylation of DNA: an epigenetic difference in susceptibility for lung cancer is associated with its progression. *Hum Pathol* 32(8): 856-862.
- Prata, A. (2001). Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *Lancet Infect Dis* 1(2): 92-100.
- Quijano-Hernandez, I. y Dumonteil, E. (2011). Advances and challenges towards a vaccine against Chagas disease. *Hum Vaccin* 7(11): 1184-1191.
- Ren, H., Collins, V., Clarke, S. J., Han, J. S., Lam, P., Clay, F., Williamson, L. M., Andy Choo, K. H. (2012). Epigenetic changes in response to tai chi practice: a pilot investigation of DNA methylation marks. *Evid Based Complement Alternat Med* 2012: 841810.

- Rendon, D. A., Genes, C. M., Triana, O. (2007). [Myocardial cellular damage and the activity of the mitochondrial ATP synthase in rats infected with a Colombian strain of *Trypanosoma cruzi*]. *Biomedica* 27 Suppl 1: 40-49.
- Reynaud, C., Bruno, C., Boullanger, P., Grange, J., Barbesti, S., Niveleau, A. (1992). Monitoring of urinary excretion of modified nucleosides in cancer patients using a set of six monoclonal antibodies. *Cancer Lett* 61(3): 255-262.
- Rocchi, M. S., Ballingall, K. T., MacHugh, N. D., McKeever, D. J. (2006). The kinetics of *Theileria parva* infection and lymphocyte transformation in vitro. *Int J Parasitol* 36(7): 771-778.
- Sales-Campos, H., Kappel, H. B., Andrade, C. P., Lima, T. P., Mattos, M. E., Jr., de Castilho, A., Correia, D., Giraldo, L. E., Lages-Silva, E. (2014). A DTU-dependent blood parasitism and a DTU-independent tissue parasitism during mixed infection of *Trypanosoma cruzi* in immunosuppressed mice. *Parasitol Res* 113(1): 375-385.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1982). *Molecular cloning : a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory. **Vol. 3:** E3-E4.
- Sanches, T. L., Cunha, L. D., Silva, G. K., Guedes, P. M., Silva, J. S., Zamboni, D. S. (2014). The use of a heterogeneously controlled mouse population reveals a significant correlation of acute phase parasitemia with mortality in Chagas disease. *PLoS One* 9(3): e91640.

- Santana, J. M., Grellier, P., Schrevel, J., Teixeira, A. R. (1997). A Trypanosoma cruzi-secreted 80 kDa proteinase with specificity for human collagen types I and IV. *Biochem J* 325 (Pt 1): 129-137.
- Schmunis, G. A. y Yadon, Z. E. (2010). Chagas disease: a Latin American health problem becoming a world health problem. *Acta Trop* 115(1-2): 14-21.
- Silmon de Monerri, N. C. y Kim, K. (2014). Pathogens hijack the epigenome: a new twist on host-pathogen interactions. *Am J Pathol* 184(4): 897-911.
- Silva, D. R., Castro, S. L., Alves, M. C., Batista Wda, S., Oliveira, G. M. (2012). Acute experimental Trypanosoma cruzi infection: establishing a murine model that utilises non-invasive measurements of disease parameters. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 107(2): 211-216.
- Stenvinkel, P., Karimi, M., Johansson, S., Axelsson, J., Suliman, M., Lindholm, B., Heimbürger, O., Barany, P., Alvestrand, A., Nordfors, L., Qureshi, A. R., Ekstrom, T. J., Schalling, M. (2007). Impact of inflammation on epigenetic DNA methylation - a novel risk factor for cardiovascular disease? *J Intern Med* 261(5): 488-499.
- Strosberg, A., Barrio, K., Stinger, V., Tashker, J., Wilbur, J., Wilson, L. (2007). Chagas disease: a Latin American nemesis. San Francisco, CA: Institute of One World Health: 1-110.
- Sullivan, K. E., Reddy, A. B., Dietzmann, K., Suriano, A. R., Kocieda, V. P., Stewart, M., Bhatia, M. (2007). Epigenetic regulation of tumor necrosis factor alpha. *Mol Cell Biol* 27(14): 5147-5160.
- Teixeira, A. L., Jr., Fontoura, B. F., Freire-Maia, L., Chiari, E., Machado, C. R., Teixeira, M. M., Camargos, E. R. (2001). Cardiac autonomic denervation

- and functional response to neurotoxins during acute experimental Chagas' disease in rats. *Auton Neurosci* 89(1-2): 128-132.
- Turner, P. V., Brabb, T., Pekow, C., Vasbinder, M. A. (2011). Administration of substances to laboratory animals: routes of administration and factors to consider. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 50(5): 600-613.
- Tveita, A. A. (2010). The danger model in deciphering autoimmunity. *Rheumatology (Oxford)* 49(4): 632-639.
- Virgin, H. W., Wherry, E. J., Ahmed, R. (2009). Redefining chronic viral infection. *Cell* 138(1): 30-50.
- Vyatkina, G., Bhatia, V., Gerstner, A., Papaconstantinou, J., Garg, N. (2004). Impaired mitochondrial respiratory chain and bioenergetics during chagasic cardiomyopathy development. *Biochim Biophys Acta* 1689(2): 162-173.
- Waddington, C., H. (1942). The epigenotype. *Endavour* 1: 18-20.
- Wang, Y. Q., Li, Y. M., Li, X., Liu, T., Liu, X. K., Zhang, J. Q., Guo, J. W., Guo, L. Y., Qiao, L. (2013). Hypermethylation of TGF-beta1 gene promoter in gastric cancer. *World J Gastroenterol* 19(33): 5557-5564.
- Weaver, I. C., Cervoni, N., Champagne, F. A., D'Alessio, A. C., Sharma, S., Seckl, J. R., Dymov, S., Szyf, M., Meaney, M. J. (2004). Epigenetic programming by maternal behavior. *Nat Neurosci* 7(8): 847-854.
- Wen, J. J. y Garg, N. (2004). Oxidative modification of mitochondrial respiratory complexes in response to the stress of *Trypanosoma cruzi* infection. *Free Radic Biol Med* 37(12): 2072-2081.

- Wen, J. J. y Garg, N. J. (2018). Manganese superoxide dismutase deficiency exacerbates the mitochondrial ROS production and oxidative damage in Chagas disease. *PLoS Negl Trop Dis* 12(7): e0006687.
- Wen, J. J., Yachelini, P. C., Sembaj, A., Manzur, R. E., Garg, N. J. (2006). Increased oxidative stress is correlated with mitochondrial dysfunction in chagasic patients. *Free Radic Biol Med* 41(2): 270-276.
- WHO (2007). Reporte del grupo de trabajo científico sobre la enfermedad de Chagas : 17-20 de abril de 2005, actualizado en julio de 2007, Buenos Aires, Argentina. World Health Organization. Geneva.
- Yano, S., Ghosh, P., Kusaba, H., Buchholz, M., Longo, D. L. (2003). Effect of promoter methylation on the regulation of IFN-gamma gene during in vitro differentiation of human peripheral blood T cells into a Th2 population. *J Immunol* 171(5): 2510-2516.
- Zhou, P. y Pu, W. T. (2016). Recounting Cardiac Cellular Composition. *Circ Res* 118(3): 368-370.
- Zingales, B., Andrade, S. G., Briones, M. R., Campbell, D. A., Chiari, E., Fernandes, O., Guhl, F., Lages-Silva, E., Macedo, A. M., Machado, C. R., Miles, M. A., Romanha, A. J., Sturm, N. R., Tibayrenc, M., Schijman, A. G. (2009). A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104(7): 1051-1054.

ANEXOS

Tabla S1:

Equivalencia de mm de hematocrito y volumen respectivo :

mm	μ l	mm	μ l
5	4.47	23	20.60
6	5.37	24	21.40
7	6.27	25	22.43
8	7.17	26	23.03
9	8.06	27	24.19
10	8.85	28	25.08
11	9.74	29	25.98
12	10.75	30	26.87
13	11.64	31	27.20
14	12.54	32	28.66
15	13.44	33	29.56
16	14.34	34	30.46
17	15.23	35	31.38
18	16.13	36	32.25
19	17.02	37	33.14
20	17.92	38	34.04
21	18.82	39	33.93
22	19.71	40	35.83

GLOSARIO

5mC (5-metilcitosina) .Es la base nitrogenada citosina que ha recibido, por acción de una enzima metiladora de DNA, un grupo metil en la posición 5.

DAMPs (Damage-associated molecular patterns) Patrón molecular asociado al daño, son moléculas del hospedero liberadas tras la destrucción de células, las cuales activan el sistema inmune

DNA (Deoxyribonucleic acid): Ácido desoxirribonucleico, es un ácido nucleico que contiene la información genética de un organismo

DTUs (Discrete Typing Units): Es la designación de un grupo de linajes de parásitos *Trypanosoma cruzi* que son genéticamente más similares entre sí que frente a cualquier otro linaje, y son identificables por marcadores comunes genéticos, moleculares e inmunológicos,

Edema: Acumulación de líquido en el espacio extracelular de los tejidos.

Epigenética: La Epigenética se refiere a los cambios heredables en el ADN e histonas que no implican alteraciones en la secuencia de nucleótidos y modifican la estructura y condensación de la cromatina, por lo que afectan la expresión génica y el fenotipo.

Fibrosis: Es el desarrollo de tejido conectivo en un órgano como consecuencia de un proceso reparativo, el cual sustituye al tejido funcional (parénquima) por tejido estructural de soporte (estroma).

Inflamación: Es la activación de mecanismos de respuesta innata con componentes celulares y humorales, tras un daño tisular causado por fuerzas físicoquímicas,

organismos infecciosos, etc en un intento del organismo por regresar a su estado anterior.

HDAC: Histona deacetilasas, son un grupo de enzimas implicadas en la eliminación de los grupos acetilo de los residuos de lisina en la histonas.

Histonas: Proteínas que proporcionan soporte estructural a un cromosoma., y que participan en la regulación de la expresión de genes, especialmente cuando éstas reciben alteraciones químicas

Metilación: Es la adición química de un grupo metil $-CH_3$ a una molécula, y en el presente estudio, específicamente a la base nitrogenada citosina.

miRNA (microRNA): es un RNA de una longitud entre 21 y 25 nucleótidos, con capacidad para regular la expresión de otros genes.

Necrosis: Muerte patológica de un grupo de células de un tejido, provocada por un agente nocivo.

PAMPs (Pathogen-associated molecular patterns): Patrón molecular asociado a patógenos, son moléculas pequeñas características de patógenas y reconocidas por el hospedero, tales como lipopolisacáridos bacterianos y DNA viral.

PCR (Polymerase Chain Reaction): Reacción en cadena de la polimerasa, una técnica molecular que permite detectar secuencias específicas de DNA mediante el copiado exponencial de las mismas

Nucleósido: Componente químico orgánico relacionado con los nucleótidos, compuesto por una base nitrogenada y un azúcar. Ejemplo: Desoxitimidina

Nucleótido: Componente químico orgánico de los ácidos nucleicos, conformado por una base nitrogenada, un azúcar y una molécula de ácido fosfórico. Ejemplo: Monofosfato de desoxitimidina.

RNA (Ribonucleic acid): Ácido ribonucleico, es un ácido nucleico que tiene roles esenciales en la codificación, descodificación, regulación y expresión de la información genética de un organismo