



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

Unidad Monterrey

**“Efecto del cambio en la elasticidad de la membrana de
cardiomiocitos de ratón en la infección por
Trypanosoma cruzi”**

Tesis que presenta

Alejandra Nicolás Cruz

Para obtener el grado de
**Maestra en Ciencias en
Ingeniería y Física Biomédicas**

Director de Tesis:

Dr. Jesús Carlos Ruiz Suárez

Apodaca, Nuevo León.

Agosto, 2021

Agradecimientos

A mi familia por su apoyo en cada una de mis decisiones y acompañarme incondicionalmente en mi camino.

A mi asesor, el doctor Carlos Ruiz por creer en mí, por la confianza depositada en este proyecto, por el inmenso apoyo en mi paso por la ciencia y la investigación, por sus consejos, porque hizo de mi maestría una de las mejores experiencias de mi vida, por todo el conocimiento y la experiencia que me ha compartido, pero sobre todo por la humildad y respeto con que me acobijó en su equipo.

A la doctora Hilda Mercado por su amabilidad y apoyo inmenso para realizar este proyecto, por permitirme hacer uso de las instalaciones de su laboratorio cuando fue requerido y por el esfuerzo puesto en las mediciones con AFM.

Al doctor Moisés Santillán, a la doctora Roxana Gutiérrez y a Jorge Arias por proporcionarnos material y reactivos que fueron de mucha utilidad para continuar con este trabajo.

A mi amigo y colega Tomás Buenfil por su compañerismo, por ser un gran apoyo desde mi llegada a esta aventura, por motivarme todos los días a seguir superándome y por su valiosa amistad.

A mi gran amigo el doctor Alberto Campos y al doctor Ricardo Alejandr  del IPN por la valiosa donación de las cepas de *T. cruzi* que sin ello nada de esto sería posible.

Al Cinvestav-Monterrey por recibirme en esta gran institución y mostrarme un nuevo panorama de la investigación, gracias a cada uno de sus miembros por cada favor que en algún momento hicieron por mí.

Contenido

Resumen	6
Abstract	8
Introducción	9
1. Marco teórico.....	10
1.1. <i>Trypanosoma cruzi</i>	10
1.2. Morfología	11
1.3. Ciclo de vida.....	11
1.4. Tripanosomiasis Americana.....	13
1.4.1. Fases de la enfermedad	13
1.5. Mecanismos de transmisión	14
1.6. Diagnóstico.....	15
1.7. Tratamiento	16
2. Antecedentes.....	16
2.1. Mecanismo de infección celular de <i>Trypanosoma cruzi</i>	16
2.2. Distribución tisular de <i>Trypanosoma cruzi</i>	17
2.3. Propiedades mecánicas de la membrana celular.....	18
2.4. Microscopio de Fuerza Atómica.....	19
3. Planteamiento del problema	21
4. Hipótesis.....	23
5. Objetivos.....	23
5.1. Objetivo general	23
5.2. Objetivos específicos.....	23
6. Metodología.....	24
6.1. Parásitos	24
6.2. Aislamiento y cultivo de células cardíacas	24
6.2.1. Tratamiento con CBD para fluidizar la membrana celular	26
6.3. Infección celular.....	27

7. Resultados.....	28
8. Discusión.....	33
9. Conclusiones.....	37
10. Perspectivas.....	38
11. Bibliografía.....	39

Resumen

La enfermedad de Chagas es causada por el parásito intracelular obligado *Trypanosoma cruzi*, este padecimiento es endémico de América Latina, donde las principales patologías asociadas a la enfermedad son la cardiopatía y mega síndromes durante la etapa clínica. Una de las interrogantes más complejas de responder tiene que ver con los factores que determinan la distribución tisular del parásito. Es bien sabido que *T. cruzi* infecta tanto células fagocíticas como no fagocíticas. Hasta la fecha se ha descrito una extensa variedad de ligandos y receptores en la superficie del parásito y la célula hospedera que interactúan una con otra para lograr un reconocimiento mutuo y después llevar a cabo la invasión del parásito en la célula. Sin embargo, no se ha dado una respuesta concreta acerca del mecanismo por el cual se explique la preferencia mayoritaria que presentan los diferentes Unidades Discretas de Tipificación (DTU's) de *T. cruzi* hacia células del tejido musculoesquelético, tejido cardíaco y tejido gastrointestinal. Una característica independiente a las moléculas de superficie, pero que juega un papel importante en las funciones específicas de las células, es la elasticidad de la membrana celular cuya magnitud en el módulo elástico difiere considerablemente entre los tipos de célula. En este trabajo se evaluó el papel de la elasticidad de la membrana de cardiomiocitos de ratón en la infección de dos cepas de *T. cruzi* (Cl-Brener y NINOA), para ello células cardíacas aisladas de ratones macho adultos se trataron con dos concentraciones de CBD (1 μ M y 2 μ M) para fluidizar la membrana celular y aumentar la elasticidad. Después se indujo la infección *in vitro* con cada una de las cepas de parásito. Los resultados mostraron primeramente una mayor capacidad infectiva por parte de la cepa NINOA, y para ambas poblaciones se observó una reducción significativa en la infección de las células tratadas con CBD, así como la baja presencia de amastigotes extracelulares

después de seis días de seguimiento, lo que sugiere que un aumento en la elasticidad de la membrana celular puede generar mayor resistencia a la infección.

Abstract

Chagas disease is caused by the obligate intracellular parasite *Trypanosoma cruzi*. This disease is endemic in Latin America, where the main pathologies associated with the disease are heart disease and mega syndromes during the clinical stage. One of the most complex questions to answer has to do with the factors that determine the tissue distribution of the parasite. It is well known that *T. cruzi* infects both phagocytic and non-phagocytic cells. To date, an extensive variety of ligands and receptors have been described on the parasite and host cell surface that interact with each other to achieve mutual recognition and then carry out invasion of the parasite into the cell. However, no concrete answer has been given as to the mechanism that explains the majority preference shown by the different *T. cruzi* Discret Typing Units (DTU's) towards cells of the musculoskeletal, cardiac and gastrointestinal tissues. Aside from surface molecules, the elasticity of the cell membrane plays an important role in non-specific interactions and its magnitude differs significantly among cell types. In this work we evaluated the role of membrane elasticity of mouse cardiomyocytes upon infection with two strains of *T. cruzi* (CI-Brener and NINOA). For this purpose cardiac cells isolated from adult male mice were treated with two concentrations of CBD (1 μ M and 2 μ M) to fluidize the cell membrane and increase elasticity. *In vitro* infection with each of the parasite strains was then induced. The results showed firstly a higher infective capacity by the NINOA strain, and for both populations a significant reduction in the infection of CBD-treated cells as well as the low presence of extracellular amastigotes was observed after six days of follow-up, suggesting that an increase in the elasticity of the cell membrane may generate greater resistance to infection.

Introducción

Trypanosoma cruzi es un protozooario intracelular obligado transmitido a mamíferos a través del contacto con las heces contaminadas con el parásito de insectos hematófagos de la familia Reduviidae y es el causante de la enfermedad de Chagas que afecta aproximadamente a 20 millones de personas en el mundo (WHO, 2018). Este padecimiento es silencioso, de larga duración y que si no se detecta a tiempo puede ser mortal. Se desarrolla en dos fases, la primera es la fase aguda y la segunda es la fase crónica que se divide en dos etapas: 1) la etapa asintomática que puede durar décadas o incluso toda la vida y 2) la etapa clínica donde hay síntomas específicos de los que destaca la cardiomiopatía chagásica y la visceromegalia.

A pesar de que la enfermedad de Chagas se descubrió hace más de cien años, la falta de control vectorial y el diagnóstico tardío en pacientes de zonas endémicas ha propiciado que esta enfermedad aún represente uno de los retos más importantes en salud pública (Arnal et al., 2019). Aún son muchos los misterios que no se han resuelto respecto a la enfermedad en temas de tratamiento, entendimiento completo del mecanismo de infección y los motivos moleculares durante la distribución tisular del parásito en el hospedero mamífero.

Actualmente los procesos celulares y moleculares involucrados en la infección celular por *T. cruzi* no se conocen completamente y por tanto aún no se ha podido explicar la aparente preferencia del parásito por los tejidos cardíaco, musculoesquelético y del tracto digestivo en la etapa final de la enfermedad (Walker et al., 2014). Un enfoque totalmente diferente desde el punto de vista de la mecánica de las membranas celulares, como lo es la elasticidad, puede llevar a aclarar algunos de estos misterios.

1. Marco teórico

1.1. *Trypanosoma cruzi*

El parásito hemoflagelado *Trypanosoma cruzi* fue descubierto en el año 1909 por el doctor Carlos Chagas en Gerais, Brasil. Aislado de insectos triatóminos y de pacientes infantiles, el doctor Chagas describió la enfermedad que este parásito causa, así como su ciclo biológico en el vector y en el hospedero mamífero.

T. cruzi biológicamente es un microorganismo complejo con una clasificación taxonómica peculiar como se observa a continuación:

Reino: Protozoa

Filum: Euglenozoa

Clase: Kinetoplastea

Orden: Kinetoplastida

Familia: Trypanosomatidae

Género: *Trypanosoma*

Especie: *T. cruzi*

La relevancia de este parásito radica principalmente al orden al que pertenece, los kinetoplástida, ya que sus miembros se caracterizan por poseer una estructura llamada kinetoplasto: un organelo que se considera una extensión de la mitocondria y donde se compacta el ADN mitocondrial en minicírculos (1.4 kpb) y maxi círculos (20 kpb) formando una compleja y compacta red de genes (Momen, 1999).

1.2. Morfología

De forma concreta, *T. cruzi* presenta cuatro formas de desarrollo alternadas en el insecto vector y en el mamífero. Dos de las cuatro formas son replicativas y las otras dos son infectivas (figura 1). Los epimastigotes (C) son una forma replicativa que se encuentra en el intestino medio del insecto que lo transmite, mientras que la forma amastigote (B) que también es replicativa, se encuentra intracelularmente en los hospederos mamíferos; por otro lado, los tripomastigotes metacíclicos (D) y tripomastigotes sanguíneos (A) son las formas infectivas presentes en el vector y en el mamífero, respectivamente (Zuma et al., 2021). Estas dos últimas formas del parásito poseen una membrana ondulante que les confiere propiedades hidrodinámicas que parece jugar un papel importante en la infección.

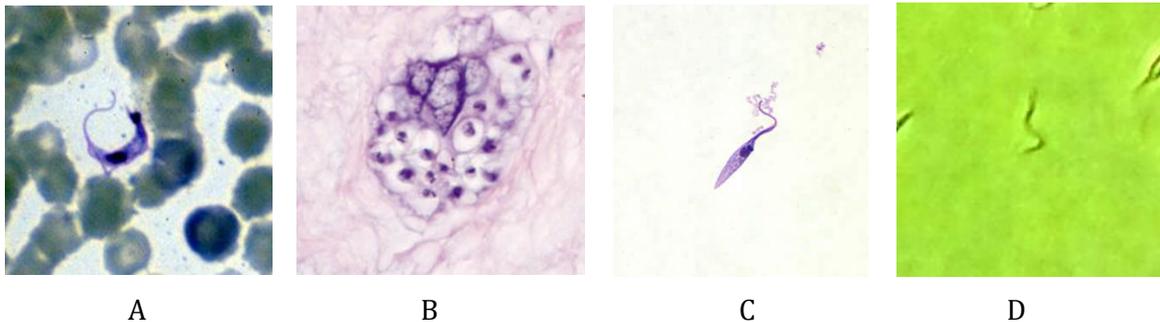


Figura1. Formas de desarrollo de *T. cruzi*. A) tripomastigote sanguíneo en frotis de sangre periférica tinción Giemsa, B) amastigotes intracelulares tinción Wright, C) epimastigote en medio LIT teñido con Wright y D) tripomastigote metacíclico en medio TAU-3AGG.

1.3. Ciclo de vida

El ciclo de vida de *T. cruzi* es bifásico, al igual que sus formas de desarrollo, las fases de su ciclo biológico se alternan en el insecto vector y en el mamífero (figura 2). El ciclo comienza cuando un triatómino portador del parásito se alimenta de la sangre de un hospedero mamífero sano y mientras realiza la succión defeca cerca del sitio de picadura donde deposita heces contaminadas con la forma tripomastigote metacíclico los cuales

ingresan al sistema del hospedero, en el caso del humano, por autoinoculación cuando por acción mecánica arrastra con la mano las heces al sitio de picadura debido al reflejo de rascarse o al tocar el rostro e inocular alguna mucosa. Una vez dentro del organismo los tripomastigotes metacíclicos serán fagocitados por macrófagos a través de una estructura llamada vacuola parasitófora, esta estructura promoverá el cambio de forma del parásito a amastigote, la cual se dividirá por fisión binaria y formará nidos que invaden el citoplasma de la célula infectada hasta que se lise y los amastigotes se liberen al medio extracelular para re-infectar otras células fagocíticas o en su defecto, antes de liberarse fuera de la célula, cambiar a la forma tripomastigote, lisar la célula hospedera, liberarse, viajar por circulación sanguínea e infectar cualquier tejido u órgano con preferencia por el tejido cardíaco y visceral. En el momento en el que el parásito está libre en el torrente sanguíneo, si un insecto vector no infectado se alimenta de un hospedero mamífero infectado ingerirá las formas tripomastigote sanguíneo las cuales cuando lleguen al intestino del insecto triatómino cambiará a la forma epimastigote donde se estará replicando y conforme avance al intestino posterior o ano del vector pasará a la forma infectiva de tripomastigote metacíclico, así cuando este nuevo insecto infectado se alimente de un hospedero mamífero sano el ciclo se repetirá (Rodrigues et al., 2014)

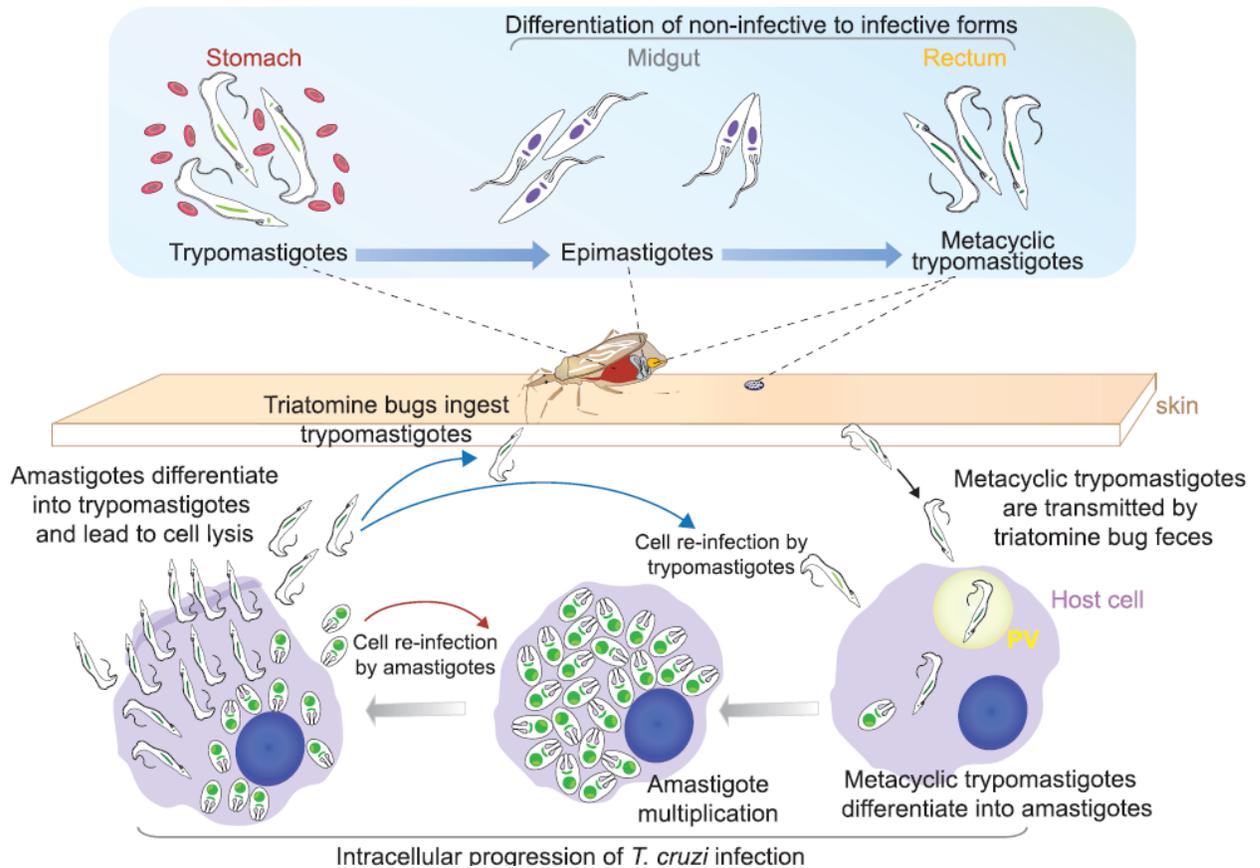


Figura 2. Representación gráfica del ciclo de vida de *T. cruzi* tanto en el hospedero mamífero como en el vector (recuperado de Moretti et al. 2019).

1.4. Tripanosomiasis Americana

1.4.1. Fases de la enfermedad

La enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana se describió por primera vez en 1909 en Berenice, una niña de dos años a quien después de extraerle y observar varias de sus muestras sanguíneas se encontró presencia de formas tripomastigote cuatro meses después de haber cursado por un periodo de malestar general (Chagas, 1909).

Desde entonces y con más de cien años de estudio se sabe que este padecimiento se desarrolla en dos fases: la primera es la fase aguda que se caracteriza principalmente por presentar parasitemia circulante detectable en sangre periférica con

sintomatología inespecífica, y en aproximadamente el 90% de los casos con ausencia de síntomas (Murcia et al. 2013). Por otro lado, la segunda fase conocida como crónica inicia con una primera etapa asintomática que generalmente tiene una duración de 10 a 30 años posteriores a la infección inicial, una vez pasado ese tiempo los pacientes pueden evolucionar a una segunda etapa donde ciertas patologías se hacen presentes, los trastornos más prevalentes son cardíacos y gastrointestinales que pueden presentarse en aproximadamente el 30% de los pacientes crónicos (Palmezano et al. 2015).

1.5. Mecanismos de transmisión

Inicialmente se identificó que *T. cruzi* se transmite por insectos hemípteros heterópteros de la familia Reduviidae y que se alimentan exclusivamente de sangre. Dentro de esta familia se han reconocido más de 130 especies de importancia en salud pública distribuidos entre los géneros *Triatoma*, *Rhodnius* y *Panstrongylus* (figura 3). En México el género *Triatoma* es el más abundante, aunque la atención no debe centrarse solamente en él ya que recientemente se reportó la reincidencia en el país del género *Rhodnius* de la especie *prolixus* con alto potencial intradomiciliario (Campos et al., 2019). La transmisión vectorial es la principal vía de inoculación de *T. cruzi* en el humano y en el ciclo epidemiológico silvestre por lo que el control vectorial es primordial en la prevención de la enfermedad de Chagas.



Figura 3. Insecto vector de la enfermedad de Chagas. A) *Rhodnius prolixus* macho adulto, B) *Triatoma dimidiata* hembra adulta y C) *Panstrongylus geniculatus* macho adulto.

A pesar de que en países endémicos el 80% de los casos de transmisión de *T. cruzi* es causado por la presencia del insecto vector, la enfermedad se ha distribuido en países y continentes no endémicos a causa de la migración ya que el parásito puede ser transmitido también por transfusión sanguínea y trasplante de órganos, esto porque en los bancos de sangre y órganos de países no endémicos no se tiene dentro de la batería de análisis microbiológico la detección de *T. cruzi* por obvias razones. Sin embargo, esto empieza a tomar relevancia y cada vez más naciones están trabajando para implementar pruebas de detección del parásito en sus bancos de sangre y candidatos a donadores de órganos (Antinori et al., 2017).

Otras vías de transmisión que acompañan a las dos anteriormente mencionadas son la transmisión vertical o congénita que se da cuando una mujer embarazada con enfermedad de Chagas transmite la infección al feto. Con menor presencia, pero de igual importancia, están los accidentes de laboratorio y el consumo de alimentos contaminados con el parásito (figura 3) (Ramos et al., 2012).

1.6. Diagnóstico

Uno de los problemas más serios que enfrenta el sector salud en el combate de esta enfermedad es el diagnóstico, la causa es que durante la fase aguda los síntomas son inespecíficos y eso lleva al que este padecimiento sea subdiagnosticado. Además, el estándar de oro en el diagnóstico temprano es confirmar la presencia del parásito mediante microscopía directa identificando en sangre la forma tripomastigote sanguínea en un examen directo en fresco, frotis, gota gruesa o microhematocrito (Salazar et al., 2016).

El diagnóstico en la fase crónica se realiza evaluando la respuesta inmunológica del paciente frente al parásito mediante la detección de anticuerpos. Para que una persona sea diagnosticada con la enfermedad deberá presentar reactividad al menos en

dos técnicas serológicas distintas y ambas pruebas deben realizarse con la misma muestra de suero (ELISA e Inmunofluorescencia indirecta, por ejemplo). En caso de discordancia deberá realizarse un tercer test o dirigirse a un laboratorio especializado (WHO, 2018).

1.7. Tratamiento

Hoy en día son dos los fármacos indicados para el tratamiento de la enfermedad de Chagas: Nifurtimox y Benznidazol. Ambos fármacos son nitrocompuestos que aparentemente basan su actividad a través de la reducción del grupo nitro y como resultado de este proceso se obtiene un radical nitro-anión, que en el caso del Nifurtimox, lleva a la formación de especies reactivas de oxígeno como el anión superóxido y el peróxido de hidrógeno que termina causando un estrés oxidativo en el parásito (Boiani et al., 2010).

Los avances en el desarrollo de nuevos fármacos son escasos, y sumado a la limitada efectividad del Nifurtimox y el Benznidazol (alrededor del 80% en fase aguda), la comunidad científica está trabajando para que la enfermedad deba ser tratada tanto en su fase inicial como en la fase crónica temprana-indeterminada. Sin embargo, se sabe que el tratamiento también es dependiente de la edad y resulta ser más efectivo en menores de 18 años, lo que lleva a que en individuos adultos y adultos mayores, la efectividad de los fármacos sea variable e incluso pueda llegar a ser nula y con efectos adversos más severos (Mills, 2020).

2. Antecedentes

2.1. Mecanismo de infección celular de *Trypanosoma cruzi*

T. cruzi es capaz de infectar cualquier célula nucleada ya sea que esté especializada en fagocitosis o no. En macrófagos y cualquier célula fagocítica, las cuatro

formas de desarrollo del parásito pueden ingresar al citoplasma del hospedero a través de un mecanismo ampliamente descrito llamado fagocitosis, se sabe que en los macrófagos la infección es dependiente de actina para poder encapsular al parásito en la vacuola parasitófora e ingresarlo al citoplasma. En las células no fagocíticas el mecanismo aún no está bien definido y las propuestas siguen siendo controversiales además que la infección natural se lleva a cabo por las formas tripomastigote, sin embargo, se sugieren una serie de numerosos pasos para describir el mecanismo de entrada de *T. cruzi*. Los tripomastigotes inician la infección al interactuar con diversas moléculas de superficie de la célula hospedera con los ligandos de la superficie del parásito (principalmente glicoproteínas y transialidasas) que desencadenan varias vías de entrada del parásito en los diferentes tejidos para conferirle a *T. cruzi* la característica de ser un patógeno tan exitoso que infecta múltiples tipos de células. Cada una de estas vías, culminan en el encapsulamiento del parásito en vacuolas fusionadas con lisosomales que son necesarias para estimular el cambio de forma de *T. cruzi* y la infección sea efectiva (Walker et al., 2014).

2.2. Distribución tisular de *Trypanosoma cruzi*

En el año 2009 se llegó a un consenso internacional para clasificar las diferentes cepas de *T. cruzi* circulantes en Unidades Discretas de Tipificación o DTUs con la finalidad de agrupar características biológicas, bioquímicas y moleculares entre las poblaciones y clonas identificadas de *T. cruzi*. Actualmente son seis los grupos de DTUs nombrados como TcI-TcVI; todos ellos son responsables de causar daños cardíacos agudos y digestivos crónicos en pacientes con enfermedad de Chagas, aunque ya se ha descrito ampliamente una distribución generalizada del tripanosomátido en múltiples tejidos y órganos (Zingales et al., 2012).

2.3. Propiedades mecánicas de la membrana celular

Las membranas biológicas son esenciales para la vida celular y por ende de cualquier organismo, están formadas de una bicapa lipídica compuesta de moléculas hidrocarbonadas como fosfolípidos, glicolípidos y colesterol (Yeagle, 2005).

A pesar de que se conoce su composición química y muchas de sus funciones biológicas, las membranas difieren sustancialmente entre las distintas líneas celulares. La elasticidad como una propiedad física de las membranas es una característica que no se ha explorado tan detalladamente y varía considerablemente entre los tipos celulares (Martínez et al., 2010). Se sabe que las propiedades mecánicas y termodinámicas de las membranas dependen fuertemente del tipo de lípido que las compone, esto se ve reflejado en experimentos de calorimetría donde la temperatura de transición, T_m , depende de las características químicas de los fosfolípidos (Cevc, 1993).

Por otro lado, el tejido muscular al igual que el tejido cardíaco están formados por células que durante su vida se encuentran bajo actividad mecánica altamente demandante, en el caso de los cardiomiocitos todo el tiempo están expuestas a estrés de tipo pulsativo, oscilatorio o a eventos turbulentos (Jacot et al., 2010), en este último caso se encuentra la susceptibilidad del cardiomiocito a procesos infecciosos.

Si nos enfocamos en la infección celular por *T. cruzi*, se sabe que un cambio en las propiedades mecánicas de las membranas, por ejemplo, la ruptura del citoesqueleto y el ablandamiento de la célula podrían proporcionar un ambiente que facilita la replicación de los parásitos o su eventual salida de la célula. En el contexto de la infección tisular por *T. cruzi*, los cambios en la mecánica de la célula huésped podrían alterar negativamente la función de los órganos afectados y desempeñar un papel importante en la fisiopatología de la enfermedad (Mott et al., 2009).

2.4. Microscopio de Fuerza Atómica

Existen muchos métodos para poder evaluar la elasticidad de las membranas celulares, de los más conocidos son la microscopía de luz, aspiración por micropipeta, y la microscopía de fuerza atómica (AFM). Esta última se basa en una micropalanca o cantiléver flexible que en uno de sus extremos tiene unida una punta microscópica la cual entra en contacto con la superficie de la muestra, dicha muestra se encuentra sobre un piezoeléctrico (figura 4). Las variaciones en la deflexión del cantiléver causado por las fuerzas de atracción y repulsión entre los átomos de la superficie de la muestra y de la punta son captados por un fotodiodo detector sobre el que se refleja un haz láser que se incide en la parte superior del cantiléver. La técnica de AFM permite obtener un perfil tridimensional de la superficie, así como las curvas de fuerza a partir de las cuales se puede calcular los módulos de elasticidad de muestras biológicas mediante el modelo de Hertz (Allison et al., 2010).

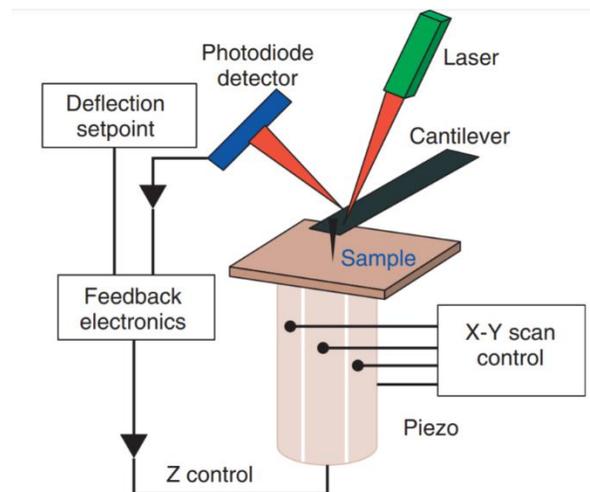


Figura 4. Componentes y funcionamiento del AFM. La información de la muestra se obtiene reflejando un rayo láser ubicado en la superficie posterior del cantiléver en un fotodiodo. A medida que la punta interactúa sobre un área específica de la muestra, el sistema de retroalimentación eleva o baja la punta en respuesta a los cambios en la topografía de la superficie para mantener una posición constante (Tomado de <https://onlinelibrary.wiley.com>).

En las últimas dos décadas el estudio de las propiedades mecánicas de los sistemas biológicos ha ido en aumento, se sabe que la elasticidad de las membranas lipídicas juega un rol importante en el funcionamiento celular ya que el valor del módulo elástico varía de un tipo de célula a otra y bajo ciertos estados patológicos. Esa heterogeneidad en la elasticidad puede ser también la responsable de la susceptibilidad o resistencia a infecciones por microorganismos intracelulares, pero aún falta mucho por descubrir al respecto (Kuznetzova et al., 2007).

3. Planteamiento del problema

Trypanosoma cruzi es un protozooario hemoflagelado causante de la tripanosomiasis americana o enfermedad de Chagas; dicho padecimiento fue catalogado por la OMS dentro de las enfermedades tropicales desatendidas. En México se ha reportado una seroprevalencia de 3.38% hasta el año 2017, lo que representa 4.06 millones de casos en todo el territorio nacional con mayor presencia en la zona sursureste.

Desde su descubrimiento en 1909 por el Doctor Carlos Chagas en Brasil, el estudio acerca de *T. cruzi* ha evolucionado lentamente en comparación con el entendimiento de otros microorganismos. A pesar de ello, en la actualidad el conocimiento es basto acerca del parásito e incluso se ha decodificado su genoma. Con todo esto es bien sabido que *T. cruzi* infecta tanto células fagocíticas como no fagocíticas, pero dependiendo del tipo celular que vaya a afectar, el mecanismo por el cual ingrese al citoplasma de la célula hospedera será diferente.

Se han observado distintos factores que influyen en la distribución tisular de *T. cruzi* entre los que destacan: las características genéticas del parásito (DTU al que pertenece) y las características genéticas del hospedero. A pesar de ello, el mecanismo de infección aún no se ha terminado de describir completamente para las células no fagocíticas afectadas y su asociación con la recurrente infección de todos los linajes de *T. cruzi* en cardiomiocitos, células musculoesqueléticas y células del tracto gastrointestinal de pacientes que cursan con la enfermedad de Chagas.

Con base en lo anterior se plantean las siguientes interrogantes:

¿Cuáles son las características mecánicas de la membrana celular en la infección por *T. cruzi* en cardiomiocitos de ratón?

¿Cómo afecta el aumento o la disminución de la elasticidad de la membrana de cardiomiocitos en la infección por *T. cruzi*?

4. Hipótesis

La elasticidad de la membrana es un factor determinante para el éxito de la entrada de *T. cruzi* en cardiomiocitos de ratón, y esta característica puede estar asociada con la distribución tisular de los distintos linajes que muestran mayor afinidad por estas células y por consecuencia la presencia de síndromes cardiacos en los pacientes clínicos.

5. Objetivos

5.1. Objetivo general

Determinar el efecto que tiene el cambio de la elasticidad en la membrana de cardiomiocitos de ratón durante la entrada de *T. cruzi* al citoplasma de estas células en modelo *in vitro*.

5.2. Objetivos específicos

Describir las propiedades elásticas de la membrana de miocitos cardiacos de ratón bajo condiciones basales y su susceptibilidad en la infección por *T. cruzi*.

Estudiar el efecto del aumento y la disminución de la elasticidad de la membrana de cardiomiocitos de ratón en la infección por *T. cruzi*.

6. Metodología

6.1. Parásitos

Epimastigotes de dos cepas (NINOA y CI-Brener) de *T. cruzi* se mantuvieron en medio LIT suplementado con 10% de suero fetal bovino, 5% hemina (5mg/mL) y 1% penicilina-estreptomicina (10000 U-10mg/mL) a 28°C con resiembras cada siete días. Se siguió la cinética de crecimiento mediante conteo por microscopía en cámara de Neubauer cada 24 horas durante los siete días antes de la siguiente resiembra.

6.2. Aislamiento y cultivo de células cardíacas

A partir de corazones de ratones adultos (4-8 semanas de edad) de la cepa BALB/c se aislaron cardiomiocitos (CM) mediante la técnica modificada de Li D. y colaboradores (2014). Para ello se prepararon los diferentes buffers y disoluciones necesarias para el aislamiento:

Buffer de aislamiento libre de calcio (113 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 0.6 mM KH₂PO₄, 0.6 mM Na₂HPO₄, 1.2 mM MgSO₄·H₂O, 10 mM HEPES, 12 mM NaHCO₃, 10 mM KHCO₃, 10mM BDM y 5.5 mM glucosa. pH ajustado a 7.2 con 1N de HCl y esterilizado por filtración con una membrana de 0.2 µm almacenado por no más de cuatro días en frío a 3°C.

Buffer de digestión. 15000 U de actividad de colagenasa tipo II en 50 mL de buffer de perfusión 0.1 mM.

Buffer de interrupción de acción enzimática (DB). Para una solución de 50 mL se añaden 45 mL de buffer de perfusión y 5 mL de SFB. A partir de esto se prepararon las soluciones de reinserción de calcio.

Solución calcio I. 2.5 µL ca²⁺ 100mM + 20 mL DB.

Solución de calcio II. 10 μL Ca^{2+} 100mM + 10 mL DB.

Solución de calcio III. 40 μL Ca^{2+} 100mM + 10 mL DB.

Medio de cultivo. Para un stock de 50 mL se utilizaron 48 mL de medio DMEM, 1 mL BDM 500 mM, 0.5 mL de penicilina-estreptomina (10000 U-10mg/mL), 1.25 mL BSA 40 mg/mL y 1.25 mM de CaCl_2 100 mM

Para el aislamiento de células cardíacas primero se esterilizó el material de disección (tijeras, pinzas, base de acrílico) con una mezcla de etanol 70% y 0.01% de cloruro de benzalconio. Todo el material, reactivos y disoluciones se manipularon dentro de la campana de bioseguridad.

Cada ratón se llevó a anestesia profunda con pentobarbital sódico (6mg/100mL) a una dosis de 90 mg/kg administrado intraperitonealmente con jeringa para tuberculina 1mL, aguja 30G. Entre 2-5 minutos después de que el ratón pierde la consciencia se realizaron dos pruebas de reflejo, una palpebral y otra por presión de las extremidades inferiores. Una vez que no hubo reflejo evidente del animal se procedió a realizar una incisión transversal en la parte baja del abdomen para exponer la cavidad abdominal, después se ubicó la vena cava y se realizó un corte transversal total a dicho vaso sanguíneo para eliminar la mayor cantidad de sangre, 30 segundos después de la exanguinación, se expuso la cavidad torácica y se extrajo el corazón. El tejido recolectado se colocó en buffer de aislamiento libre de calcio en frío (8°C) y se perfundió manualmente por 5 minutos. Después del lavado por perfusión se eliminaron del corazón las aurículas y los residuos de otros tejidos como pulmones y timo; los ventrículos restantes del tejido cardíaco se trituraron con tijeras de disección en 250 μL de buffer de aislamiento.

Después de obtener los pequeños trozos de tejido ventricular, estos se llevaron a un tubo para centrífuga de 50 mL con 10 mL de buffer de digestión a agitación constante

de 180 rpm y temperatura de 37°C durante 25 minutos. Pasado ese tiempo los trozos de tejido se resuspendieron alrededor de 20 veces con una pipeta automática de 10 mL para disgregar el tejido y separar las células cardíacas individualmente. Se centrifugó el concentrado de células a 300 rpm durante 5 minutos para separar las células cardíacas de otras células de menor tamaño como fibroblastos, mioblastos, eritrocitos, leucocitos, entre otras. Se recuperó el pellet de CM y se realizó una reinserción gradual de calcio a las células resuspendiendo el concentrado celular en 10 mL de solución de calcio I (se hizo por duplicado), se centrifugó a 300 rpm por 5 minutos y se repitió el mismo procedimiento para las soluciones de calcio II y III.

Antes del cultivo definitivo las células se incubaron durante dos horas en medio de cultivo a 37°C con una atmósfera de 5% CO₂, esto para lograr la adhesión de fibroblasto que aún pudieran estar presentes. Finalizadas las dos horas, las células se cultivaron en un volumen final de 2.5 mL de medio de cultivo en placas de 30 mm a una concentración de 40 000 células/mL para lograr una confluencia del 80%, aproximadamente, y se mantuvieron a temperatura constante de 37°C y 5% CO₂ con cambios de medio cada 48 horas.

6.2.1. Tratamiento con CBD para fluidizar la membrana celular

Se evaluaron dos concentraciones diferentes de cannabidiol (CBD) para observar su impacto en la infección por *T. cruzi*. En ambos casos el procedimiento fue el mismo. Después de la primera incubación celular, para eliminar fibroblastos, las células fueron tratadas en experimentos separados con 1 µM y 2 µM de CBD previamente disuelto en DMSO como vehículo. El stock de CBD se agregó directamente en el medio de cultivo con las células y se incubó por 30 minutos a una temperatura de 37°C y 5% CO₂. Después de la incubación se realizó el cambio de medio de cultivo libre de CBD.

6.3. Infección celular

Se tomaron epimastigotes de *T. cruzi* cultivados en medio LIT para realizar infecciones primarias en células cardíacas de ratón adulto con y sin tratamiento previo con CBD. Para ello, se cuantificó en cámara de Neubauer la concentración en parásitos/mL de los cultivos de la cepa NINOA y CI-Brener en el día 4 post resiembra. Se tomó el volumen necesario para conseguir un inóculo en el cultivo celular de 5×10^6 parásitos/mL. Los epimastigotes se lavaron por triplicado en medio de cultivo y se centrifugó a 2500 rpm por 5 minutos para finalmente ser resuspendidos en 2.5 mL del medio de cultivo que se añadieron al concentrado de células cardíacas previamente incubadas con o sin CBD. El seguimiento de la infección se realizó durante seis días (tiempo en el que las células permanecieron viables) en cámara de Neubauer donde se buscaron y cuantificaron células con presencia de amastigotes en el citoplasma o en su defecto amastigotes libres en el medio. Es importante mencionar que la interacción de los epimastigotes con las células se mantuvo durante los seis días de seguimiento.

7. Resultados

Se siguió la cinética de crecimiento de epimastigotes de dos cepas de *T. cruzi* mediante conteo en cámara de Neubauer cada 24 horas durante 7 días (gráfico 1). Se observó que tanto la cepa NINOA como CI-Brener alcanzaron el punto máximo de su crecimiento en el día 5 post resiembra (PR) con concentraciones de 2.072×10^7 y 2.373×10^7 parásitos/mL, respectivamente. La cinética permitió determinar los días PR en los cuales el parásito presentó mejor actividad y mayor número poblacional, siendo estos los días 4 y 5 PR.

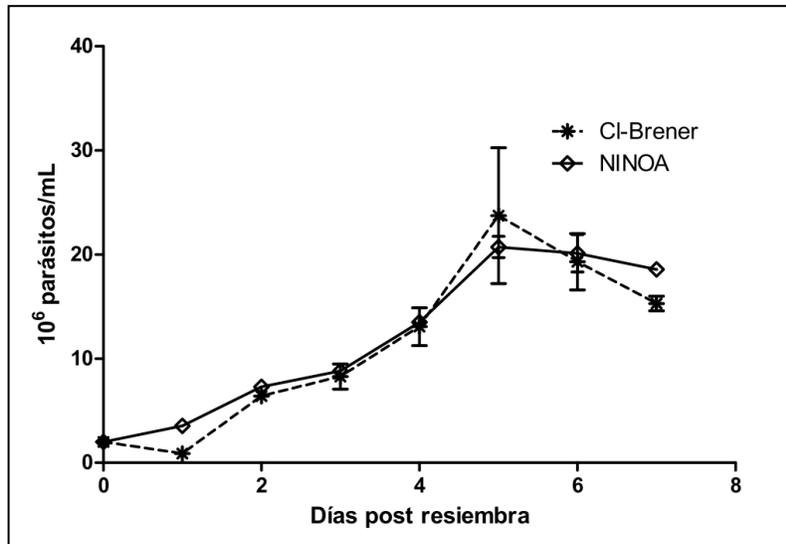


Gráfico 1. Cinética de crecimiento de *T. cruzi* en medio LIT.

Una vez caracterizada la cinética de ambas cepas se aislaron células cardiacas a partir de ratones macho de la cepa BALB/c. En promedio se obtuvieron 50 000 células/mL por cada corazón extraído. Las células consideradas como viables al inicio del cultivo presentaron morfología rectangular con presencia de estrías transversales (figura 5), después de 48 horas de incubación la morfología en su mayoría cambió a estructuras ovaladas pero funcionales.

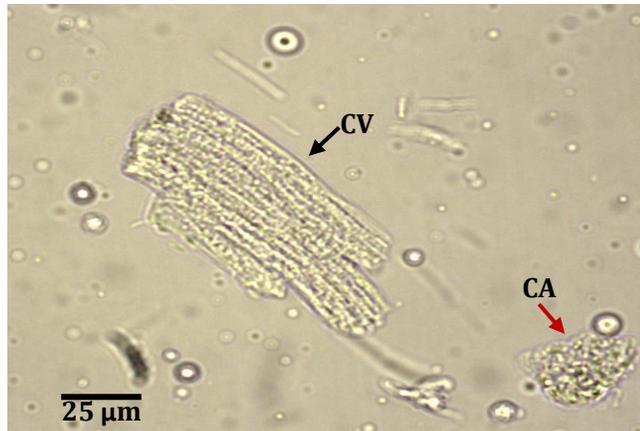


Figura 5. Célula cardíaca al inicio del cultivo celular. CV: cardiomiocito viable con morfología rectangular y estrías transversales. CA: cardiomiocito después de sufrir apoptosis. Aumento 40X.

Después de haber establecido las condiciones de aislamiento de CM se realizó el seguimiento de la cantidad de población de células cardíacas sin tratamiento y pretratadas con DMSO. Para ambos casos se observó una población de células cardíacas superior a 30 000 células/mL durante los cinco días posteriores al aislamiento y a partir del día seis se presentó una caída drástica en la concentración de células (gráfico 2), lo que indicaba el envejecimiento del cultivo y por consecuencia una mayor tasa de muerte celular.

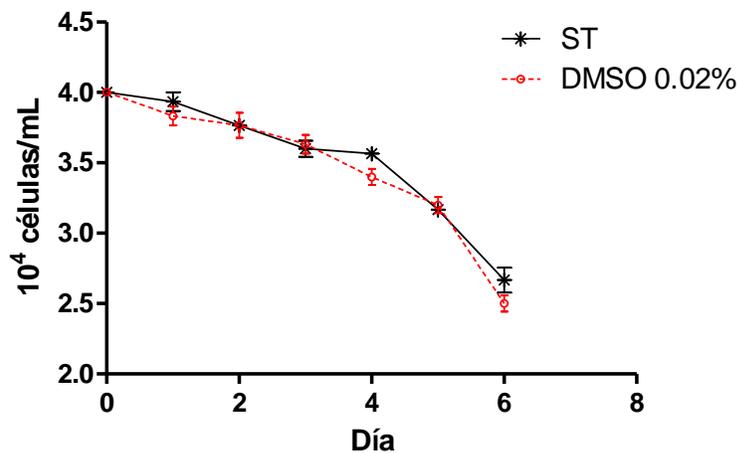


Gráfico 2. Seguimiento de la supervivencia de cardiomiocitos aislados con y sin pretratamiento con DMSO.

Después se procedió a realizar las infecciones con ambas cepas de *T. cruzi* tanto para células sin tratamiento y pretratadas con DMSO para asegurar que la infección no se vería afectada por el vehículo. Una vez realizado ese control, los CM se trataron con 1 μ M y 2 μ M de CBD para posteriormente ser infectadas con el parásito. A partir del día dos después de iniciada la interacción célula-parásito se encontraron células con presencia de amastigotes intracelulares como se puede ver en la figura 6 donde claramente se observa una célula cardíaca infectada y su morfología afectada posiblemente por la misma infección. Estas células se cuantificaron a partir de una base de 100 células observadas y se encontró que para aquellas células tratadas con CBD la infección disminuye considerablemente en comparación con las que no fueron tratadas, además de que esa disminución parece ser dependiente de la concentración de CBD ya que cuando los CM se incubaron con 1 μ M de CB se observó una disminución en el número de células infectadas de casi tres veces en comparación con el control pero este fenómeno fue más evidente cuando se duplicó la concentración de CBD a 2 μ M.

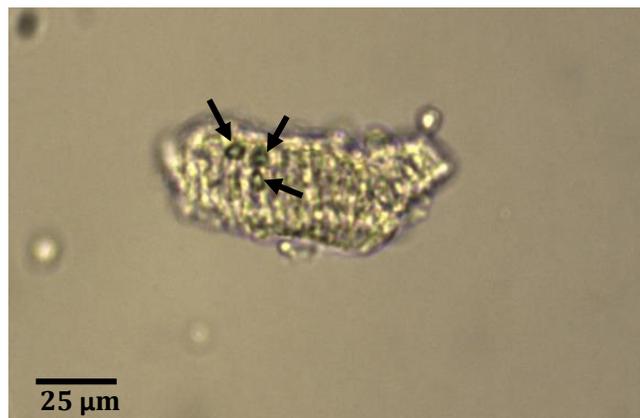


Figura 6. Célula cardíaca infectada con *T. cruzi*, se observan amastigotes (flechas negras) en el citoplasma. Aumento 40X.

Por otro lado, se observó que la cepa NINOA parece tener mayor capacidad infectiva que la cepa de referencia CI-Brener (gráfico 3) con base a los siguientes indicadores: 1) la aparición de células infectadas que presentaron amastigotes en su citoplasma se

encontraron a partir del día dos en aquellas que fueron infectadas con la cepa NINOA y en el día tres en el caso de CI-Brener, y 2) el número de esas células infectadas fue mayor en las infecciones con la cepa NINOA que con CI-Brener, tanto en células tratadas con CBD como en las que no se les hizo tratamiento alguno.

Otro indicador del progreso de las infecciones fue la presencia de amastigotes extracelulares como evidencia de la ruptura celular de los CM y que permitió su liberación, para ello se eligieron 10 campos al azar con aumento 40x por microscopía óptica directa y se cuantificó el total de amastigotes encontrados en todos los campos (gráfico 4). El comportamiento en la proporción de aparición de las formas amastigote para ambas cepas fue directamente proporcional al número de células infectadas a lo largo del tiempo.

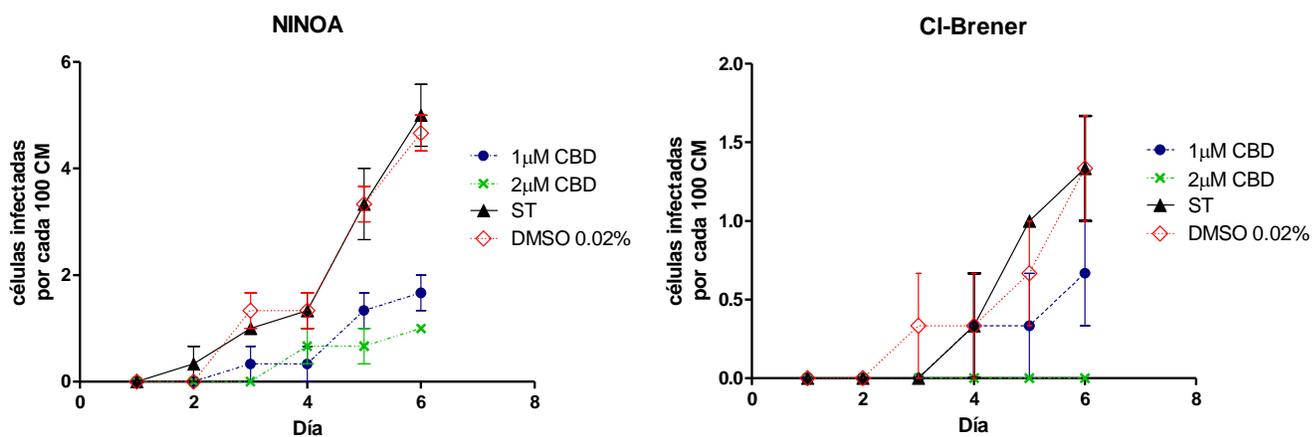


Gráfico 3. Infección in vitro de CM con epimastigotes de la cepa NINOA (izquierda) y cepa CI-Brener (derecha). En color negro y rojo las infecciones en células sin tratamiento y pretratadas con el vehículo DMSO 0.02%, respectivamente. En azul la infección en células pretratadas con 1 μM de CBD, y en verde las que fueron pretratadas con 2 μM de CBD.

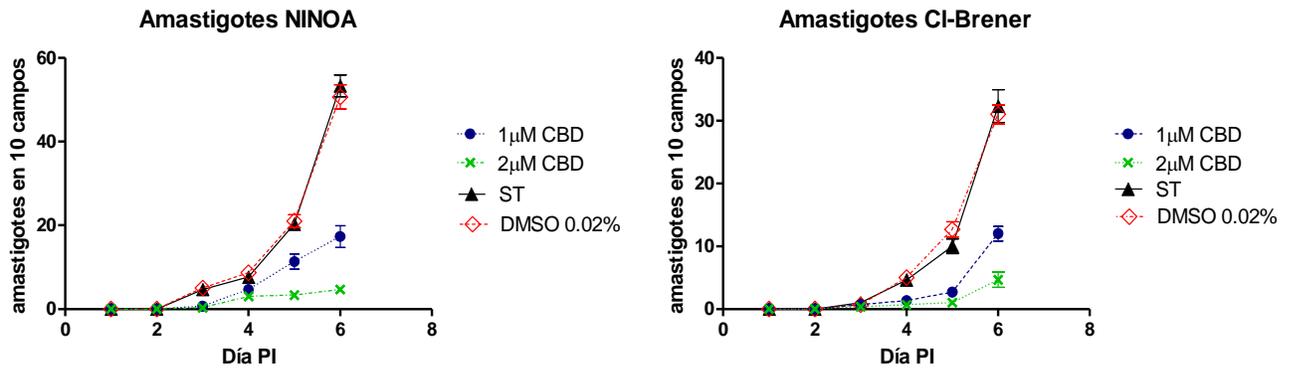


Gráfico 4. Amastigotes extracelulares libres en el medio de cultivo. El total de amastigotes graficado cada día corresponde a lo encontrado en un total de 10 campos con aumento 40X.

8. Discusión

La enfermedad de Chagas causada por *T. cruzi* sigue representando un serio problema de salud a nivel mundial. La complejidad de este padecimiento continúa aun descifrándose y uno de los retos a los que nos seguimos enfrentando es la diversa capacidad de daño tisular que se presenta durante el desarrollo de la patología y la gravedad de las afectaciones durante la fase crónica, en donde hasta un 30% de los pacientes sufren trastornos cardiacos y aproximadamente un 10% padecen alteraciones digestivas, neurológicas o combinadas, cobrando la vida de aproximadamente 50,000 personas anualmente (OMS, 2018). Los esfuerzos por descubrir y entender los mecanismos celulares y moleculares que llevan a estas complicaciones se han convertido en verdadero reto, principalmente porque la constante aparición de daño al tejido cardiaco y gastrointestinal representa una complicación extra al limitado tratamiento (Andrade et al., 2010). Por lo anterior, en el presente estudio se abordó esta interrogante desde el papel que juega la elasticidad de la membrana, específicamente de cardiomiocitos, en el proceso de infección por *T. cruzi*.

A finales de los años 90's e inicios del 2000, se demostró que *T. cruzi* posee la capacidad de infectar cualquier célula, exceptuando los eritrocitos, y la proporción en la infección puede depender en gran medida de las características genéticas del microorganismo (Silva et al., 2019). Dicha afirmación se pudo observar en este trabajo a partir del seguimiento de la infección en CM con las dos cepas evaluadas donde se observó que la cepa NINOA tiene una capacidad infectiva mayor que la cepa CI-Brener, independientemente de que la cinética de crecimiento es similar en ambas, y la explicación puede encontrarse en la naturaleza misma de cada población ya que NINOA pertenece al DTU TcI (linaje más prevalente en América Latina) mientras que CI-Brener

está clasificada como TcVI (linaje localizado en una región específica de Sudamérica y estrictamente doméstico) (Zingales et al., 2012)

Por otra parte, se ha sugerido que el tropismo cardíaco pudiera estar influenciado por una región peptídica altamente conservada en todas las gp85/transialidasas (proteínas de superficie del parásito) que interactúa con el endotelio vascular cuya presencia parece ser mayor en la vasculatura del corazón que en otros órganos (Tonelli et al., 2010). Sin embargo, la expresión de la superfamilia de genes que codifican para esta proteína se da principalmente en la forma tripomastigote metacíclico de *T. cruzi* y la distribución tisular es definida por la forma tripomastigote sanguíneo, además de que en las formas epimastigotes las transialidasas están inhibidas y se ha visto que esta forma del parásito también es capaz de infectar cualquier célula, incluyendo aquellas del tejido cardíaco (Días et al., 2017).

Ante la incertidumbre de aún no tener una respuesta al cuestionamiento del tropismo tisular de *T. cruzi*, la necesidad de abordar este tema desde otro enfoque se ha vuelto crucial. Es bien sabido que la función celular está esencialmente determinada por su estructura, en ese sentido, los diferentes niveles de organización estructural de las células dependen de las propiedades mecánicas. Se ha encontrado que el valor en la elasticidad de la membrana celular de las células cardíacas es superior a la de otros tipos de célula (Kuznetzova et al., 2007).

En adición a lo anterior, algunos compuestos altamente hidrófobos pueden interactuar con los lípidos de la membrana celular y modificar la fluidez de esta estructura y consecuentemente su elasticidad y función. El CDB es un compuesto hidrófobo que presenta muchas bondades terapéuticas dentro de las que destaca su aplicación para tratar desórdenes psiquiátricos, la alta capacidad antiinflamatoria y analgésica en trastornos crónicos del dolor como la migraña, así como su efecto antiepiléptico (Campos

et al., 2017), y más recientemente la inducción de apoptosis en células cancerígenas. Se ha visto que estos procesos son mediados por canales transmembranales que interactúan con ligandos específicos, pero en el caso del CBD diversos estudios acerca de su efecto sobre canales iónicos parecen indicar que la inhibición de estos canales no ocurre a través de la unión ligando-receptor, lo que sugiere que el CBD altera las propiedades biofísicas de la membrana provocando cambios en la fluidez de la bicapa lipídica y de esa manera se inhibe la función de los canales (Ghovanloo et al., 2018).

El uso del CBD para modificar la elasticidad de la membrana de CM, y en consecuencia provocar la posible inhibición o reducción de la infección por *T. cruzi*, ha dado resultados positivos en este estudio, además de que esa disminución es dependiente de la concentración. Aquí se evaluó el efecto de 1µM de CBD al interactuar 30 minutos con las células cardíacas aisladas, y al final de la infección se observó una reducción aproximada del 60% respecto a los controles. Cuando la concentración de CBD se duplicó, el porcentaje de infección se vio reducido hasta un 90%. Este efecto en general de los cannabidiolos ya se ha visto en estudios previos acerca de procesos parasitarios infecciosos en modelos *in vitro* e *in vivo* que han mostrado una reducción en la infección celular o en el crecimiento y proliferación de algunos parásitos extracelulares y en el caso de *T. cruzi* ha sido evidente la disminución en la infección *in vitro* de mioblastos cardíacos, pero curiosamente no disminuye la parasitemia en modelos animales a pesar de que la inflamación y fibrosis del corazón descienden considerablemente (Hernández et al., 2017). Muchos autores sugieren que la influencia del CBD para modificar fenómenos biológicos está controlado por los receptores CB1 y CB2. No obstante, también se ha visto que el CBD puede afectar a un extenso grupo de receptores, y esa inespecificidad ha llevado a pensar que la interacción es directamente con la bicapa lipídica, e influye directamente en la fluidez de la membrana e indirectamente en el funcionamiento de

proteínas transmembrana (Watkins, 2019). Es posible que la disminución de la infección observada en este trabajo, así como el número de amastigotes extracelulares en el medio, se debe al aumento del módulo de elasticidad de la membrana de las células cardíacas y en consecuencia la capacidad de amortiguamiento ante el ataque del parásito es mayor y la resistencia a la infección se incrementa.

Resulta estrictamente necesario evaluar los módulos elásticos de células cardíacas tratadas con CBD para acercarnos a la afirmación de que es el cambio en la rigidez de la membrana lo que puede estar determinando la reducción de la infección y dirigir este enfoque como la razón del porqué el tejido cardíaco es el más afectado en etapas avanzadas de la enfermedad de Chagas. Con los resultados aquí obtenidos podemos conducirnos en esa línea y continuar explorando más a detalle la relación entre la mecánica celular y el tropismo causado por *T. cruzi*. Es importante que se realicen más estudios donde se explore el rol de la elasticidad en procesos infecciosos y que se amplíe la investigación acerca del CBD como posible tratamiento paliativo en la etapa clínica de este padecimiento.

9. Conclusiones

La cepa NINOA es más infectiva que la cepa CI-Brener bajo condiciones *in vitro* en un modelo de infección de células cardíacas aisladas de ratones adultos, a pesar de que el comportamiento del crecimiento en medio LIT de ambas cepas es similar.

El aparente cambio en la elasticidad de la membrana celular de cardiomiocitos inducida por CBD disminuye la infección celular y en consecuencia inhibe el desarrollo del ciclo biológico de *T. cruzi* independientemente del linaje, lo cual pudiera justificar la compleja distribución tisular de los seis DTU's y que se concentra mayormente en el tejido cardíaco de los pacientes crónicos.

10. Perspectivas

Determinar curvas de fuerza de células cardiacas fluidizadas con CBD y sin tratamiento, mediante microscopía de fuerza atómica, para el cálculo de los módulos de Young y asociar los posibles cambios de elasticidad de la membrana en la inhibición de la infección por *T. cruzi*.

11. Bibliografía

1. Allison, D. P., Mortensen, N. P., Sullivan, C. J. y Doktycz, M. J. (2010). Atomic force microscopy of biological samples. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 2(6), 618–634.
2. Andrade L.O, Galvao L.M.C., de Nazareth S.L., Meirelles M, Chiari E, Pena S.D.J., Macedo A.M. (2010) Differential tissue tropism of *Trypanosoma cruzi* strains: an in vitro study. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 105, 834–837.
3. Antinori S, Galimberti L, Bianco R, Grande R, Galli M, Corbellino M. (2017) Chagas disease in Europe: A review for the internist in the globalized world. *Eur J Intern Med.* 43:6-15.
4. Arnal A, Waleckx E, Rico-Chávez O, Herrera C, Dumonteil E (2019) Estimating the current burden of Chagas disease in Mexico: A systematic review and meta-analysis of epidemiological surveys from 2006 to 2017. *PLoS Negl Trop Dis*13(4): e0006859.
5. Boiani M., Piacenza L., Hernández., Boiani L., Cerecetto H., González M., Denicola A. (2010) Mode of action of Nifurtimox and N-oxide-containing heterocycles against *Trypanosoma cruzi*: Is oxidative stress involved?, *Biochemical Pharmacology*. 79 (12): 1736-1745
6. Campos A. A., Nicolás C. A., Girón A. J. I., Rivas N, Alexandre A. R. (2019) Presence of *Rhodnius prolixus* Stål, 1859 (Hemiptera: Reduviidae) in Oaxaca, Mexico, ten years after the certification of its elimination. *J Vector Ecol.* 44(2):293-295.
7. Campos A. C., Fogaça M. V., Scarante F. F., Joca S., Sales A. J., Gomes F. V., Sonogo A. B., Rodrigues N. S., Galve-Roperh I., y Guimarães F. S. (2017). Plastic

- and Neuroprotective Mechanisms Involved in the Therapeutic Effects of Cannabidiol in Psychiatric Disorders. *Frontiers in pharmacology*, 8, 269.
8. Cevc G., Allen T. M., Neidleman, S. L. (1993). *Phospholipids handbook*.
 9. Chagas C. (1909) Nova tripanozomiase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo de *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1: 159–218.
 10. Dias P.P., Capila R.F., do Couto N.F., Estrada D., Gadelha F.R., Radi R, et al. (2017) Cardiomyocyte oxidants production may signal to *T. cruzi* intracellular development. *PLoS Negl Trop Dis* 11(8): e0005852
 11. Ghovanloo M.R, Stuart N.G., Mezeyova J, Dean R.A., Ruben P.C., Goodchild S.J. (2018) Inhibitory effects of cannabidiol on voltage-dependent sodium currents. *J Biol Chem*. 293(43):16546-16558.
 12. Henriksen, J. R., & Ipsen, J. H. (2004). Measurement of membrane elasticity by micro-pipette aspiration. *The European Physical Journal E*, 14(2), 149–167.
 13. Hernández C. R, Méndez D. M., Prospéro G. Ó., Morales M. J. (2017) Immunoregulatory role of cannabinoids during infectious disease. *Neuroimmunomodulation*; 24:183-199.
 14. Jacot J.G., Martin J.C., Hunt D.L. (2010) Mechanobiology of cardiomyocyte development. *J Biomech*. 43(1):93-98. doi:10.1016/j.jbiomech.2009.09.014.
 15. Kuznetsova T.G., Starodubtseva M. N., Yegorenkov N. I., Chizhik S. A., Zhdanov R. I. (2007) Atomic force microscopy probing of cell elasticity. *Micron*. 38(8):824-33.
 16. Martínez B. L., Maldonado A. A., Hernández Z. E. (2010) Elasticidad de las membranas biológicas. *Revista Mexicana de Física*, 56 (1) 107–122.

17. Mills R.M. (2020) Chagas Disease: Epidemiology and Barriers to Treatment. *Am J Med.* 133(11):1262-1265.
18. Momen H. (1999) Taxonomy of *Trypanosoma cruzi*: A commentary on characterization and nomenclature. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 94:181-4.
19. Moretti N. S., Mortara R. A., Schenkman S. (2019) *Trypanosoma cruzi*. *Trends in Parasitology.* Elsevier; 36(4):1471-4922.
20. Mott, A., Lenormand, G., Costales, J., Fredberg, J. J., & Burleigh, B. A. (2009). Modulation of host cell mechanics by *Trypanosoma cruzi*. *Journal of cellular physiology*, 218(2), 315–322. <https://doi.org/10.1002/jcp.21606>.
21. Murcia L., Carrilero B., Saura D., Iborra M A., y Segovia M. (2013) Diagnóstico y tratamiento de la enfermedad de Chagas. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 31(Supl 1):26-34
22. Palmezano JM, Plazas LK, Rivera KE, Rueda VP. (2015) Enfermedad de Chagas: realidad de una patología frecuente en Santander, Colombia. *MÉD.UIS.* 28(1):81-90.
23. Ramos J.M., Milla A, Rodríguez J.C., López-Chejade P, Flóres M, Rodríguez J.M., Gutiérrez F. (2012) Chagas disease in Latin American pregnant immigrants: experience in a non-endemic country. *Arch Gynecol Obstet.* 285(4):919-23.
24. Rodrigues J.C., Godinho J.L., de Souza W. (2014) Biology of human pathogenic trypanosomatids: epidemiology, life cycle and ultrastructure. *Subcell Biochem.* 74:1-42.
25. Salazar S. P. M., Bucio T. M. I., Cabrera B.M., De Alba A. M. C., Castillo S. D. R., Zenteno G. E. A, Rojo M.J., Fernández S. N. A., Perera S. M. G. (2016) Enfermedad de Chagas en México. *Fac. Med. UNAM.*

26. Silva Pereira S., Trindade S., De Niz M., Figueiredo L.M. (2019) Tissue tropism in parasitic diseases. *Open Biol.* 9: 190036.
27. Tonelli RR et al. (2010) Role of the gp85/transsialidases in *Trypanosoma cruzi* tissue tropism: preferential binding of a conserved peptide motif to the vasculature in vivo. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 4, 1–8.
28. Walker, D. M., et al., (2014). Mechanisms of cellular invasion by intracellular parasites. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 71(7), 1245–1263
29. Watkins A. R. (2019). Cannabinoid interactions with ion channels and receptors. *Channels (Austin, Tex.)*, 13(1), 162–167.
30. World Health Organization (WHO). (2018) Chagas disease (American trypanosomiasis).
31. Yeagle, P. L. (2005) *The structure of biological membranes*, (CRC Press), Boca Raton-London-New York-Singapore.
32. Zingales B., Miles M.A., Campbell D.A., Tibayrenc, M., Macedo A.M., Teixeira M. M. G., Sturm N. R. (2012). The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: Rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infection, Genetics and Evolution*, 12(2), 240–253.
33. Zuma A. A., Dos Santos B. E., de Souza W. (2021) Basic biology of *Trypanosoma cruzi*. *Curr Pharm Des.* 27(14):1671-1732.