



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE MEDICINA VETERINARIA

**“EVOLUCIÓN DE LA INFECCIÓN EXPERIMENTAL CON
Trypanosoma cruzi, EN TRES CEPAS PURAS DE RATONES”**

RUBÉN GUERRA CARVAJAL

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Medicina
Preventiva Animal

PROFESOR GUÍA: Dr. M.V. M. S. CLAUDIO ZÚÑIGA MARTI

**SANTIAGO- CHILE
2013**



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE MEDICINA VETERINARIA

**“EVOLUCIÓN DE LA INFECCIÓN EXPERIMENTAL CON
Trypanosoma cruzi, EN TRES CEPAS PURAS DE RATONES”**

RUBÉN GUERRA CARVAJAL

NOTA FINAL:

	NOTA	FIRMA
PROFESOR GUÍA : DR. CLAUDIO ZUÑIGA
PROFESOR CONSEJERO: DR. PEDRO CATTAN
PROFESOR CONSEJERO: DR. JULIO LARENAS

**SANTIAGO – CHILE
2013**

**“EVOLUCIÓN DE LA INFECCIÓN EXPERIMENTAL CON
Trypanosoma cruzi, EN TRES CEPAS PURAS DE RATONES”**

**"EVOLUTION OF EXPERIMENTAL INFECTION WITH *Trypanosoma cruzi*, IN
THREE INBRED MICE STRAINS"**

RUBÉN MAURICIO GUERRA CARVAJAL

Unidad de Inmunología, Departamento de Medicina Preventiva
Animal

RESUMEN

Trypanosoma cruzi, agente etiológico de la enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana, es un parásito intracelular obligatorio que causa una infección crónica debilitante en humanos. En el presente trabajo, en un modelo experimental, se infectaron tres grupos de ratones machos de las cepas A.Sw, Balb/c y CF1, de 10 semanas de edad, con 2.000 tripomastigotes sanguíneos del clon Dm28c de *T. cruzi*. Se evaluó la evolución de la infección en términos de prepatencia, valores de parasitemia, mortalidad y un estudio histopatológico. Los resultados obtenidos indicarían la existencia de un componente genético en la evolución de la infección con *T. cruzi*, ya que la mortalidad alcanzada por el grupo de ratones de la cepa Balb/c fue un 100%, sin embargo sólo fue de un 10% en el caso de la cepa A.Sw y 0% de mortalidad para la cepa CF1. Respecto a los promedios alcanzados en las parasitemias en el día de su máximo nivel para cada grupo, se observó que el mayor valor fue evidenciado por los animales Balb/c con 2×10^6 parásitos/mL, un valor de $1,1 \times 10^6$ parásitos/mL para CF1 y el menor valor de $6,2 \times 10^5$ observado en los ratones A.Sw. A nivel histopatológico, según los cortes realizados, sólo se encontraron pseudoquistes al día 14 p.i. en corazón en las tres cepas y en el caso de la cepa Balb/c en tejido muscular. La mayor cantidad de parásitos intracelulares, inflamación y daño se observó en las muestras de los animales Balb/c.

Palabras claves: *Trypanosoma cruzi*, infección de ratones, histopatología

ABSTRACT

Trypanosoma cruzi, etiologic agent of the Chagas disease or american trypanosomiasis, is an obligatory intracellular parasite that cause a debilitating chronic illness in humans . In this study, in an experimental model, were infected three groups of mice strains A.Sw, Balb/c and CF1, males from 10 weeks of age, with 2.000 blood tripomastigotes from Dm28c clone of *T. cruzi*. We evaluated the evolution of the infection in terms of prepatencia, values of parasitaemia, mortality and a histopathological study. The results could indicate the existence of a genetic component in the course of the infection since mortality achieved by Balb/c, A.Sw and CF1 strains reached to 100%, 10% and 0% mortality, respectively. Regarding the average scores in parasitemia on day of its maximum level for each group, it was observed that the higher value was evidenced by Balb/c mice with 2×10^6 parasites/mL, $1,1 \times 10^6$ parasites/mL for CF1 and the lowest value of $6,2 \times 10^5$ parasites/mL was observed in A.Sw strain. A histopathological level, as the cuts made, found pseudocysts only at day 14 p.i. in heart in the three strains and in the case of the Balb/c strain in muscular tissue. Most intracellular parasites, inflammation and damage was observed in samples from animals Balb / c.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*, mice infection, histopathology.

INTRODUCCIÓN

Trypanosoma cruzi es un parásito hemoflagelado perteneciente al Orden Kinetoplástida, miembro de la Familia Trypanosomatidae y es agente causal de la enfermedad de Chagas en el humano o tripanosomiasis americana (Valenzuela *et al.*, 2010). Esta enfermedad debido a su amplia distribución y alta prevalencia en el hombre y animales, es uno de los mayores problemas de salud pública, fundamentalmente, en Centro y Sudamérica (Texeira *et al.*, 2011). Se extiende desde el sur de Estados Unidos hasta el sur de Argentina y en Chile desde la Región de Arica hasta la Región del Libertador Bernardo O'higgins, siendo más frecuente en áreas rurales y periurbanas (Apt *et al.*, 2008a ; Toso *et al.*, 2011).

En Chile, en 1921 el Dr. Juan Noé y su colaborador Dr. Miguel Massa comprobaron por primera vez la presencia de *T. cruzi* en el intestino de vinchucas (*Triatoma infestans*), colectadas en viviendas de los alrededores de Santiago. En 1938, el Dr. Gasic describió el primer caso agudo en la localidad de Domeyko (sector norte de la actual Región de Coquimbo) (Silveira *et al.*, 2002). La situación de la enfermedad de Chagas en nuestro país es diferente a la de otros países de la región, como resultado del control de vectores y en los bancos de sangre, la prevalencia ha disminuido drásticamente. En la actualidad, 850.000 personas viven en zonas endémicas de riesgo para contraer la enfermedad y se estima que en el país hay aproximadamente 142.000 personas infectadas con *T. cruzi* (Toso *et al.*, 2011).

Las formas de infección con *T. cruzi* son la vectorial, la transfusional, la transplacentaria, los trasplantes de órganos infectados, los accidentes de laboratorio y el consumo de vectores o animales infectados (Toso *et al.*, 2011).

La transmisión vectorial es causada por las deyecciones de triatomíneos infectados por *T. cruzi* depositadas en la piel de mamíferos, en el momento de alimentarse (Toso *et al.*, 2011). Al alimentarse de la sangre de un mamífero, el insecto deposita las deyecciones contaminadas con tripomastigotes metacíclicos (forma no replicativa, infectante) y

producto del prurito causado, el individuo arrastra los parásitos hacia la herida producida por la picadura del insecto o a mucosas cercanas. Los tripomastigotes que ingresan invaden una gran cantidad de células nucleadas, principalmente macrófagos residentes, alojándose en el citoplasma de la célula infectada, diferenciándose a una forma redonda, sin flagelo evidente, denominada amastigote (forma replicativa). Luego de un cierto número de divisiones, los amastigotes se diferencian nuevamente en tripomastigotes, que salen de la célula y regresan al torrente sanguíneo, dirigiéndose a tejidos blancos como el miocardio, musculatura esquelética, musculatura lisa visceral y células de la glía central. Finalmente los tripomastigotes sanguíneos pueden ser ingeridos por algún triatómico, transformándose a epimastigotes (forma replicativa no infectiva) en el intestino medio del vector, multiplicándose activamente hasta pasar al intestino posterior diferenciándose a tripomastigotes metacíclicos y dar paso a un nuevo ciclo reproductivo del parásito (Apt, 2008a; Valenzuela *et al.*, 2010).

La interacción hospedador-parásito es dinámica y depende de muchos factores dependientes tanto del parásito (cepa, virulencia, dosis de inoculación, etc.) como del hospedador (edad, sexo, perfil genético, etc.) (Barbosa *et al.*, 2011; Zúñiga *et al.*, 2012).

Desde un punto de vista clínico, en la infección con *T. cruzi* se distinguen dos fases. En la fase aguda se puede detectar alta parasitemia y parásitos replicándose dentro de macrófagos y una variedad de otras células hospedadoras, especialmente células de músculo estriado y cardíaco. Esto es histopatológicamente caracterizado por infiltración leucocitaria y presencia de pseudoquistes (células infectadas). En la fase crónica no se observan parásitos sanguíneos pero existe un progresivo daño tisular que habitualmente compromete diversos tejidos, manifestándose un curso clínico variable, abarcando desde ausencia de síntomas a compromiso cardíaco severo o gastrointestinal, con la aparición de megasíndromes (Zúñiga *et al.*, 1998; Barbosa *et al.*, 2011).

Los síntomas de la enfermedad son silenciosos y a menudo aparecen muchos años después de la infección. La mayoría de las personas que tienen la enfermedad no saben que están infectadas, siendo una enfermedad crónica debilitante. En los últimos años, las

migraciones en gran escala de individuos de origen latinoamericano ya infectados, a otras partes del mundo, ha convertido la enfermedad en un problema mundial (WHO, 2007).

En Chile se describen tres especies de vectores de la enfermedad de Chagas, denominadas como vinchucas. *Triatoma infestans* es el vector doméstico y *Mepraia spinolai* y *Mepraia gajardoi* corresponden a especies silvestres (Apt *et al.*, 2008a).

Tras la aplicación de la iniciativa mediada por INCOSUR (Iniciativa en Salud de los Países del Cono Sur), se certificó a Chile como el segundo país que ha interrumpido la transmisión vectorial de la enfermedad de Chagas (Zulantay *et al.*, 2004), en el año 1999, aunque es una enfermedad que debe ser notificada obligatoriamente (Valenzuela *et al.*, 2010).

Los animales domésticos, principalmente perros, gatos y roedores, pueden estar clínicamente afectados o actuar como hospedadores reservorios, en cuyo caso pueden pasar inadvertidos e introducir al parásito en áreas donde éste no existe (Urquhart *et al.*, 2001).

La infección experimental por *T. cruzi* se ha reproducido, fundamentalmente la etapa aguda, en diversas especies animales, como conejos, perros, ratones y primates no humanos (Zúñiga *et al.*, 1998; Urzúa *et al.*, 2004). El conocimiento sobre la fisiopatología de la infección de *T. cruzi* en animales de experimentación ha constituido un avance importante en el estudio de la enfermedad de Chagas, ya que los modelos experimentales controlados permiten analizar diferentes parámetros dependientes tanto del hospedador como del parásito, lo que por razones prácticas y éticas no pueden realizarse en humanos (Zúñiga *et al.*, 1998; Zúñiga *et al.*, 2012)

Ratones experimentalmente infectados con *T. cruzi* han mostrado un desarrollo de la infección semejante a lo que ocurre en el ser humano con la enfermedad de Chagas, especialmente en la fase aguda (Zúñiga *et al.*, 1997; Andrade *et al.*, 2010). Distintas cepas de ratones difieren en la susceptibilidad o resistencia a la infección y se ha planteado un

complejo control génico de los niveles de parasitemia y la sobrevivencia de los animales infectados (Zúñiga *et al.*, 2002; Zúñiga *et al.*, 2007; Andrade *et al.*, 2010).

En el presente trabajo se pretendió analizar un factor dependiente del hospedero, como es la constitución genética, en la infección experimental de tres cepas de ratones, genéticamente diferentes, inoculados con el clon Dm28c de *T. cruzi*. Se analizaron posibles diferencias y semejanzas en la evolución de la infección en las tres cepas de ratones, considerando: prepatencia, niveles de parasitemia, mortalidad y el estudio histopatológico de corazón y músculo esquelético de los animales infectados.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepa de parásitos.

Se utilizaron tripomastigotes sanguíneos del clon Dm28c de *T. cruzi* (Contreras *et al.*, 1988). Este parásito se mantiene por pasajes sucesivos en ratones Balb/c, en el bioterio de la Unidad de Inmunología de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile.

Ratones.

Se usaron tres grupos de 10 machos de 10 semanas de edad cada uno, correspondientes a las cepas Balb/c, A.Sw y CF1. Las cepas A.Sw y Balb/c provienen originalmente del Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, U.S.A. y la cepa CF1 fue adquirida en la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

Además se utilizaron tres grupos controles de cinco machos de cada una de las cepas de ratones, de 10 semanas de edad. Los cuales fueron inoculados con 0,2 mL de una dilución de sangre de animales sanos Balb/c y sangrados según el protocolo de los animales problema. El grupo control permite excluir el efecto de las sangrías sucesivas y la inoculación de glóbulos rojos extraños Balb/c en los ratones de cepas A.Sw y CF1.

Todos los ratones fueron mantenidos en condiciones semejantes, con control de temperatura, agua y alimentación *ad libitum*, luz y humedad.

Modelo de infección.

Para la obtención de parásitos usados como inóculo, se extrajeron 0,6 mL de sangre mediante punción cardíaca de un ratón Balb/c infectado con el clon Dm28c, que fue sacrificado mediante CO₂ por vía inhalatoria en el momento. La sangre se colocó en un tubo estéril con 0,1 mL de citrato de sodio, utilizado como anticoagulante. Luego se realizó una dilución 1/50 de la sangre infectada en suero fisiológico estéril y se hizo un recuento de parásitos en la cámara de Neubauer. Este procedimiento permitió determinar la cantidad de parásitos totales en los 0,6 mL de sangre. Posteriormente se hicieron las diluciones respectivas para llegar aproximadamente a 2.000 parásitos en 0,2 mL que fue la cantidad inoculada en forma intraperitoneal a cada ratón problema. En el caso de los animales del grupo control se inocularon con 0,2 mL de sangre de animales Balb/c sanos.

Estudio de parasitemia.

Los animales infectados se sangraron a partir del tercer día post infección (p.i.) y luego día por medio hasta que la parasitemia fuera negativa. La sangre fue obtenida de la vena caudal, en tubos de microhematocrito heparinizados y se contaron parásitos en 50 campos al azar, utilizando un aumento de 400x. Los resultados fueron expresados como el promedio de parasitemia del grupo más la desviación estándar correspondiente. Todo lo anterior de acuerdo al método descrito por Rojas de Arias y Ferro (1988).

Estudio histopatológico.

Se sacrificó un ratón de cada grupo, con el mayor nivel de parasitemia, a los días 7, 14 y 21 p.i. y se tomaron muestras de corazón y músculo esquelético del miembro posterior para su estudio histopatológico. Los tejidos fueron incluidos en parafina según métodos convencionales y cortados en micrótomos de rotación (Leitz) de 5 µm de espesor. Luego fueron teñidos con la técnica Hematoxilina-Eosina (HE).

La intensidad de las lesiones fue evaluada con aumento de 100X y se representó de acuerdo al siguiente criterio: (-) Tejido preservado, sin signos aparentes de inflamación; (+) Lesiones mínimas, con discreto infiltrado polimorfonuclear, hiperemia; (++) Lesiones moderadas, con infiltrado linfocitario, hiperemia, edema; (+++) Lesiones severas, con gran infiltración leucocitaria, hiperemia, edema, hemorragia y necrosis. (Zúñiga *et al.*, 1998).

El número de células parasitadas (seudoquistes) se evaluó en 10 campos microscópicos con aumento de 400X y se representó de la siguiente manera: (-) Negativo, ausencia de células parasitadas (seudoquistes); (+) Leve, presencia de 1-5 seudoquistes, (++) Moderado, presencia de 6-10 seudoquistes; (+++) Severo, presencia de 11 o más seudoquistes (Zúñiga *et al.*, 1998).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el gráfico N° 1 se muestra la evolución de la infección a través de los promedios de parasitemias en los tres grupos de ratones. Respecto al periodo de prepatencia en sangre, no hubo diferencia, siendo de 5 días para cada grupo con promedios de parasitemia relativamente similares. La cepa Balb/c alcanzó su nivel máximo de parasitemia al día 9 p.i. con un promedio de 2×10^6 parásitos/mL mucho más marcado que la cepa A.Sw en donde su pico también fue al día 9 pero con un promedio de sólo $6,2 \times 10^5$ parásitos/mL ($p < 0.01$). En el caso de la cepa CF1 su pico fue el día 7 con $1,1 \times 10^6$ parásitos/mL, menor que el alcanzado por los ratones BALB/c ($p < 0.05$) y mayor que el nivel de la cepa A.Sw ($p < 0.01$). La duración de las parasitemias varió para cada cepa, siendo hasta el día 13 para A.Sw, hasta el día 15 para CF1 y hasta el día 17 para Balb/c. En el grupo control de cada una de las cepas no se evidenciaron alteraciones patológicas de ningún tipo.

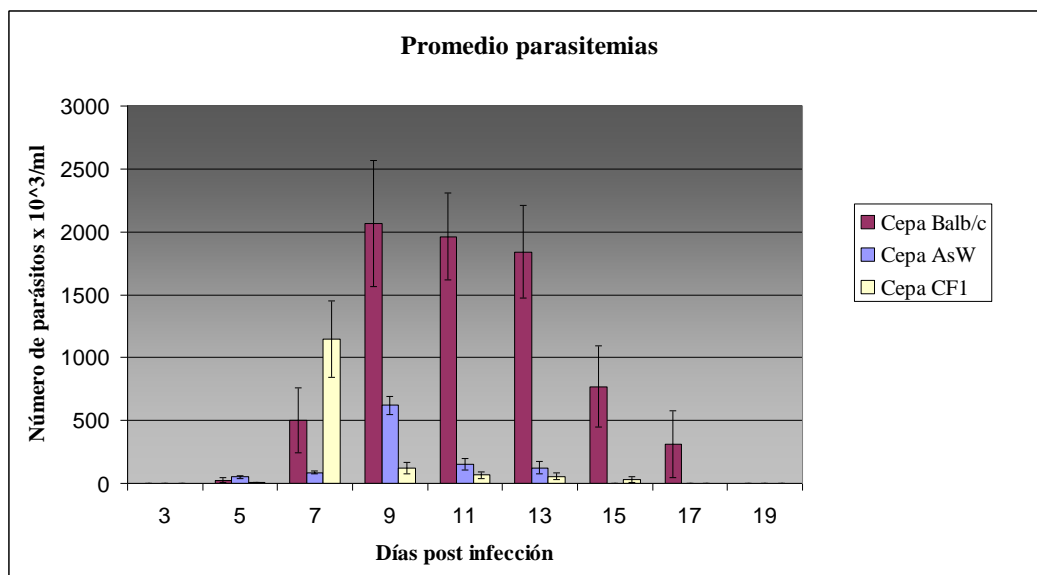


Gráfico N°1. Promedio de parasitemias de ratones ASw, Balb/c y CF1, infectados con 2.000 tripomastigotes sanguíneos del clon Dm28c de *T. cruzi*.

Como todos los ratones fueron infectados, se utilizó la muerte o supervivencia como criterio para determinar la susceptibilidad o resistencia de cada grupo de ratones frente a la infección. El gráfico N° 2 muestra la curva de supervivencia de cada una de las cepas de ratones, corregidas según el número de animales total restando los sacrificados los días 7, 14 y 21. Es así como hasta el día 11 post infección no se presenta mortalidad en ninguna de las cepas, manteniendo la cepa CF1 esta condición hasta finalizado el estudio, sin embargo los animales Balb/c fallecen todos de manera progresiva. De acuerdo a estos resultados se puede inferir que, tanto los animales de la cepa A.Sw con un 90% y los de la cepa CF1 con un 100% de supervivencia se comportaron como resistentes a la infección y los ratones de la cepa BALB/c se comportaron como altamente susceptibles con un 100% de mortalidad al día 21 p.i. El grupo control tuvo un 100% de supervivencia para todas las cepas.

Se ha descrito que la relación entre los niveles de parasitemia alcanzados y la supervivencia de los animales infectados no presenta siempre una asociación, es decir una alta parasitemia no se relaciona con una mayor mortalidad (Minoprio *et al.*, 1989; Zúñiga *et al.*, 2002). Estudios realizados con la cepa Brazil de *T.cruzi* mostraron que los ratones infectados de la cepa C3H, desarrollan altos niveles de parasitemia y mueren todos en un

lapso corto de tiempo y por el contrario los ratones de la cepa C57BL/10 que desarrollan bajas parasitemias sobreviven a la infección (Wrightsman *et al.*, 1982). De acuerdo a esto se podría sugerir que la magnitud de la parasitemia que el individuo desarrolla después de la infección sería responsable de la muerte posterior (Zuñiga *et al.*, 2012). Sin embargo, al infectar las cepas C3H, C57BL/10 y B10.S con la cepa Perú de *T.cruzi*, que es más virulenta que la cepa Brazil, a pesar que la cepa C3H siguió presentado los más altos niveles de parasitemia, se murió el 100% de los animales C3H y C57BL/10 mientras que los ratones B10.S sobrevivieron todos a pesar de expresar parasitemias semejantes a los animales C57BL/10 (Wrightsman *et al.*, 1982) indicando que los niveles de parasitemia no tendrían un efecto relevante en el destino de los animales infectados. Los resultados del presente estudio parecen apoyar que los niveles de parasitemia, en este modelo, sí es un factor importante para determinar la supervivencia o muerte de los animales experimentalmente infectados, puesto que mueren sólo los individuos con altas parasitemias. De todas maneras, en términos generales, se podrá pensar que los niveles de parasitemia es sólo uno de los parámetros a considerar como respuesta a la infección pero por sí sólo no determinaría la muerte de los animales infectados.

Los factores genéticos asociados a la resistencia o susceptibilidad frente a una variedad de agentes infecciosos se encuentran habitualmente ligados al Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC), cuyos genes codifican para proteínas responsables de la inducción de la respuesta inmune contra una variedad de antígenos (Murphy *et al.*, 2009). En nuestro caso, las tres cepas de ratones difieren en su haplotipo MHC (Klein *et al.*, 1983), por lo tanto se podría pensar que en los haplotipos A.Sw y CF1 existirían factores genéticos responsables de la resistencia los cuales estarían ausentes en el haplotipo Balb/c.

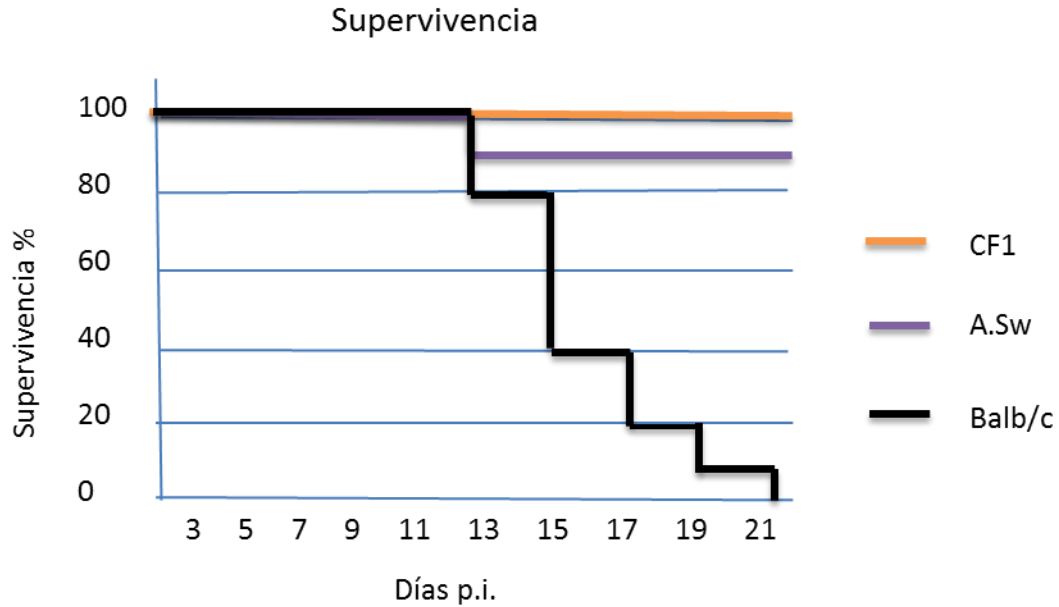


Gráfico N° 2. Supervivencia de las tres cepas de ratones A.Sw, Balb/c y CF1, infectados con 2.000 tripomastigotes sanguíneos de *T. cruzi*, medida como porcentaje en días post infección.

ESTUDIO HISTOPATOLOGICO

La evolución de la infección producida por el clon Dm 28c en tres cepas de ratones, fue evaluada por un estudio histopatológico de un ratón sacrificado de cada grupo los días 7, 14 y 21 post infección (tabla 1). Las lesiones inflamatorias se presentaron a los 7 días post infección en la cepa A.Sw en ambos tejidos estudiados, sin embargo en la cepa Balb/c y CF1 no se observaron lesiones microscópicas evidentes en este día de estudio. Probablemente hubo una respuesta inflamatoria más temprana inducida por el parásito en los tejidos en la cepa A.Sw, lo que no fue tan marcado en las otras dos cepas.

Tabla 1. Estudio histopatológico de cortes de corazón y músculo en tres cepas puras de ratones infectados con el clon Dm 28c de *Trypanosoma cruzi* correspondientes a individuos sacrificados los días 7, 14, 21 post infección (p.i.).

Cepa	Tejido	Lesión	7 p.i.	14 p.i.	21 p.i.
BALB/c	Corazón	Inflamación	-	++	++
		Pseudoquistes (n°)	0	6	0
		Necrosis	-	+	+++
	Músculo	Inflamación	-	++	++
		Pseudoquistes (n°)	0	1	0
		Necrosis	-	-	+++
A.Sw	Corazón	Inflamación	++	++	+
		Pseudoquistes (n°)	0	1	0
		Necrosis	-	+	+
	Músculo	Inflamación	+	++	+
		Pseudoquistes (n°)	0	0	0
		Necrosis	-	+	-
CF1	Corazón	Inflamación	-	+	++
		Pseudoquistes (n°)	0	1	0
		Necrosis	-	-	+
	Músculo	Inflamación	-	+	+
		Pseudoquistes (n°)	0	0	0
		Necrosis	-	-	-

(-) Sin lesiones; (+) Lesiones leves; (++) Lesiones moderadas; (+++) Lesiones severas.

Los procesos inflamatorios son muy evidentes, en las tres cepas, al día 14 p.i. asociándose este suceso, probablemente, a un mayor ingreso de los parásitos a los tejidos y coincidiendo con una baja en las parasitemias luego de la fase replicativa inicial. Paralelamente se presenta necrosis en tejido cardíaco de las cepas Balb/c y ASw y en tejido muscular de la cepa A.Sw lo que indicaría una respuesta más fuerte del sistema inmunológico contra el parásito y probablemente un daño colateral exagerado producido por una probable respuesta autoinmune en el hospedero (Duthie *et al.*, 2005). Además, se encuentran seudoquistes en tejido cardíaco de las tres cepas. Respecto al tejido muscular sólo se encuentran un seudoquiste en la cepa Balb/c.

Al día 21 p.i. no se encuentran pseudoquistes en los cortes realizados en ninguna de las cepas probablemente por control realizado por el sistema inmune de los parásitos circulantes pero sin descartar una limitación técnica pues no se realizaron cortes seriados de cada una de las muestras de tejido. Sí se presenta inflamación variable y necrosis en ambos tejidos estudiados en todas las cepas siendo más severa en corazón y músculo de la cepa Balb/c. Esto último se puede asociar con la alta susceptibilidad que presentó esta cepa ante la infección con el clon Dm28c de *T. cruzi* dada su mortalidad y los niveles de parasitemia alcanzados. Cabe destacar que los animales de cada grupo control sacrificados no presentaron alteraciones histopatológicas evidentes.

En la figura 1 correspondiente a tejido cardíaco, día 7 p.i., de la cepa A.Sw se aprecia un moderado infiltrado inflamatorio difuso en el tejido cardíaco sin presencia de pseudoquistes. En músculo (figura 2) se observan focos de inflamación con infiltración celular. Los tejidos de las cepas Balb/c y CF1 no presentaron alteraciones evidentes en este día (datos no mostrados).

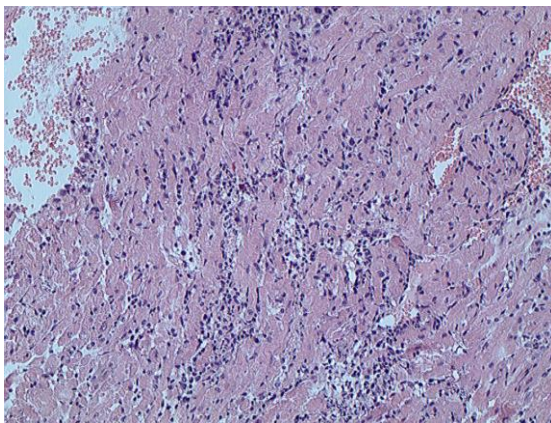


Figura 1: Corazón. Ratón de la cepa Asw sacrificado el día 7 p.i. Se observa infiltración celular difusa en todo el tejido. HE, 200X.

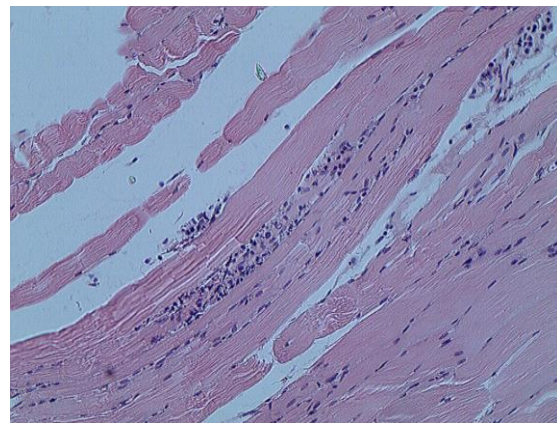


Figura 2: Tejido muscular. Ratón correspondiente a la cepa Asw sacrificado el día 7 p.i. Se observan focos de infiltración celular. HE, 200X.

En la figura 3 se observa tejido muscular, día 14 p.i., correspondiente a la cepa Balb/c observándose infiltrado inflamatorio leucocitario, la presencia de un pseudoquiste y necrosis .En la figura 4 correspondiente a la cepa CF1 se observa un infiltrado inflamatorio leve y ausencia de pseudoquistes. En músculo de la cepa A.Sw (figura 5) se observan 2 focos inflamatorios y necrosis del tejido muscular.

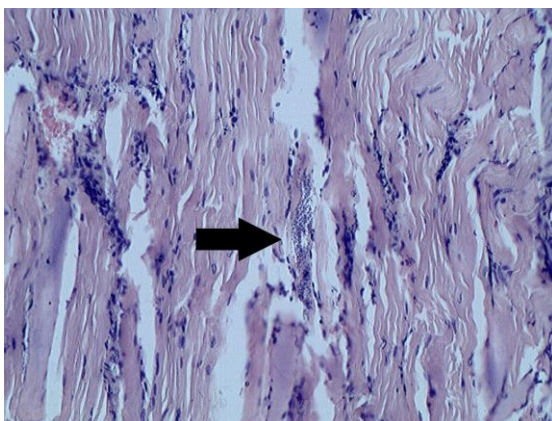


Figura 3: Tejido muscular. Ratón de la cepa Balb/c sacrificado el día 14 p.i. Se observan focos de infiltración celular, necrosis del tejido y un pseudoquiste indicado por la flecha. HE, 200X.

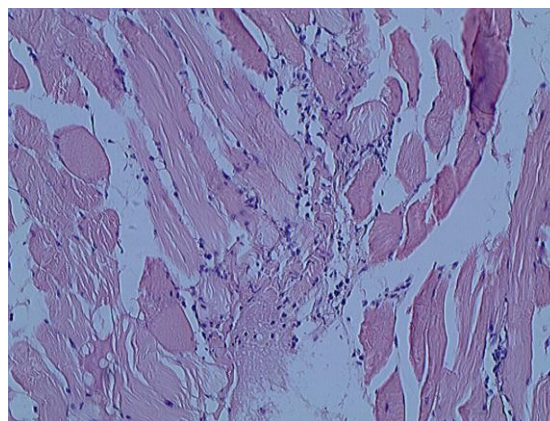


Figura 4: Tejido muscular. Ratón de la cepa CF1 sacrificado el día 14 p.i. Se observa un leve infiltrado celular. HE, 200X.

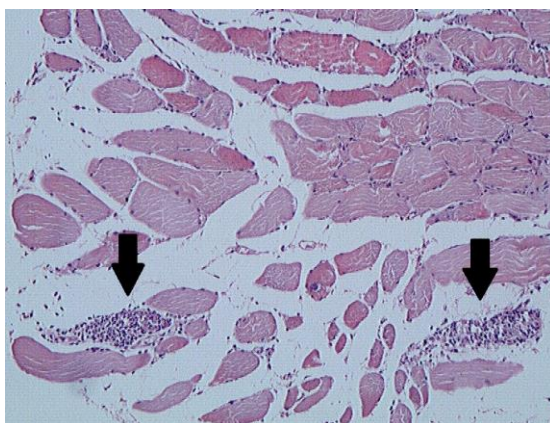


Figura 5: Tejido muscular. Ratón correspondiente a la cepa A.Sw sacrificado el día 14 p.i. Se observan dos focos inflamatorios y necrosis del tejido muscular. HE, 100X.

En la figura 6 correspondiente a la cepa Balb/c se observa gran cantidad de pseudoquistes distribuidos en todo el tejido, infiltrado inflamatorio y necrosis de las fibras cardíacas en el corte. En la figura 7 de la cepa Asw se evidencia infiltración celular, presencia de pseudoquistes e inflamación multifocal. En la imagen de la cepa CF1 (figura 8) se aprecia un pseudoquiste y escasa infiltración.

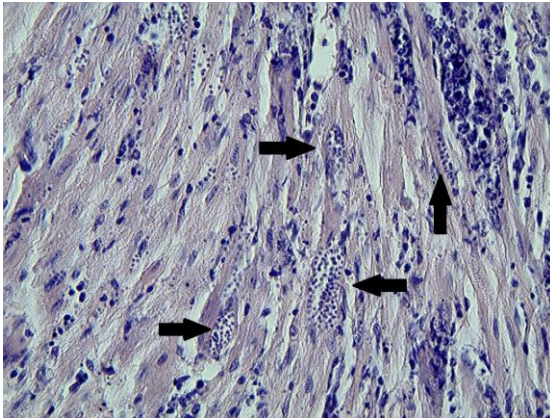


Figura 6: Corazón. Ratón de la cepa Balb/c sacrificado el día 14 p.i. Se observa infiltrado inflamatorio y múltiples pseudoquistes indicados por las flechas y distribuidos por todo el tejido. HE, 400X.

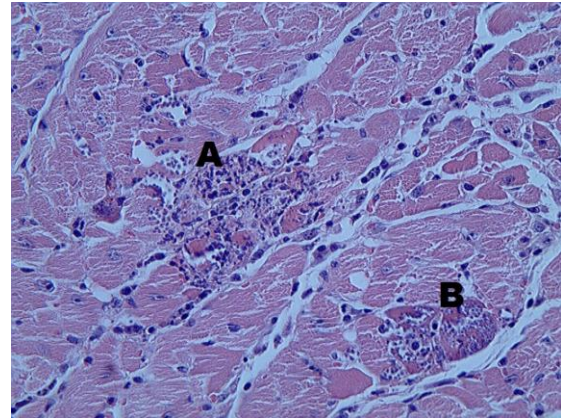


Figura 7: Corazón. Ratón correspondiente a la cepa Asw sacrificado el día 14 p.i. Se observa en la imagen foco inflamatorio (A) y uno o múltiples pseudoquistes (B). HE, 400X.

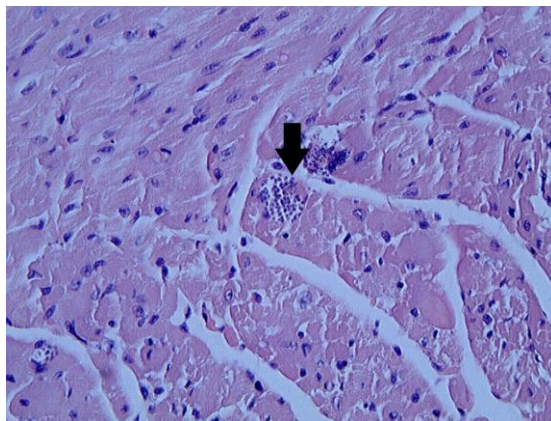


Figura 8: Corazón. Ratón de la cepa CF1 sacrificado el día 14 p.i. Se observa un pseudoquiste sin infiltración celular evidente. HE, 400X.

En la figura 9 correspondiente a músculo Balb/c se observa un leve infiltrado inflamatorio, necrosis, degeneración de Zenker y no se aprecian pseudoquistes. En la imagen de tejido muscular de la cepa CF1 (figura 10) se evidencia un proceso inflamatorio difuso con infiltrado celular mononuclear. En la figura 11 correspondiente a músculo de la cepa A.Sw se muestran focos de infiltración celular. En los cortes realizados en corazón para las 3 cepas al día 21 p.i., no se evidenciaron pseudoquistes y las lesiones son similares a las presentadas en músculo (datos no mostrados).

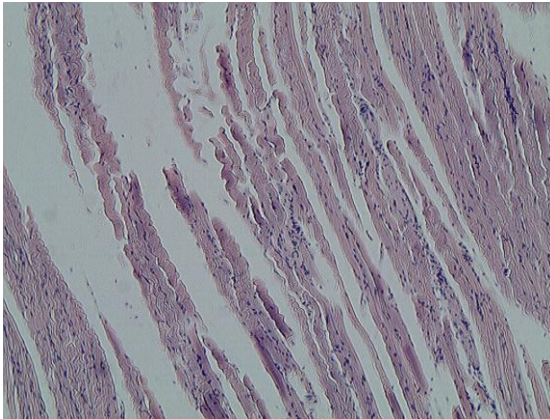


Figura 9: Tejido Muscular. Ratón de la cepa Balb/c sacrificado el día 21 p.i. Se observa infiltrado celular inflamatorio, necrosis y degeneración de Zenker. HE, 100X.

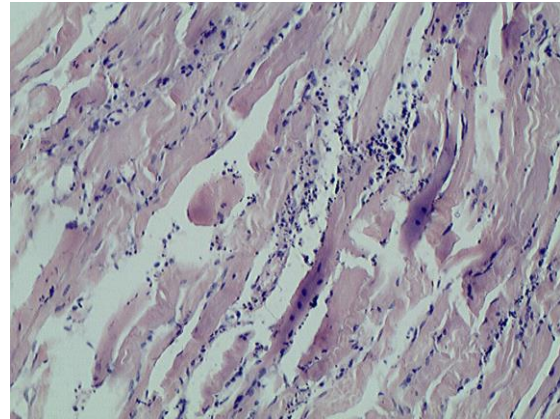


Figura 10: Tejido muscular. Ratón de la cepa CF1 sacrificado el día 21 p.i. Se observa moderado infiltrado celular. HE, 200X.

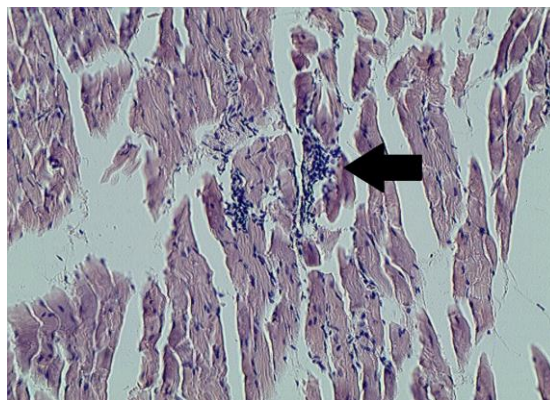


Figura 11: Tejido muscular. Ratón de la cepa A.Sw sacrificado el día 21 p.i. Se observa un foco de infiltración celular evidente. HE, 200X.

Asociando la parasitemia alcanzada y supervivencia, se observa una mayor mortalidad en los animales que expresaron mayores niveles de parasitemia demostrando que la cepa Balb/c es muy susceptible a la infección con el clon Dm28c y que en este modelo si hay una asociación positiva entre mayores niveles de parasitemia y mortalidad (Zúñiga *et al.*, 2002). La prepatencia y la duración de la parasitemia no parecen ser un factor en el desarrollo de la infección con el clon Dm28c de *T. cruzi* ya que estos valores fueron semejantes en las tres cepas de ratones. En el desarrollo de la infección el alcanzar un pico más tempranamente en promedio de parasitemia no se relacionó ni con una mortalidad temprana ni con mayores lesiones histopatológicas.

En este trabajo también se encontró una relación positiva entre un mayor nivel de parasitemia con la gravedad de las lesiones histopatológicas encontradas, como en el caso de la cepa Balb/c con el mayor promedio de parásitos en sangre y con inflamación y lesiones tisulares más graves. La presencia de pseudoquistes no tendría relación con la intensidad del daño en los tejidos ya que en corazón de las tres cepas de ratones éstos fueron encontrados con diferentes grados de intensidad en las lesiones.

La cepa A.Sw, con el menor promedio de parásitos en sangre, mostró lesiones similares a la cepa CF1. A pesar que se postula que el daño tisular exagerado y la muerte de los animales infectados no siempre son inducidos por un mayor número de parásitos circulantes en sangre sino por una respuesta inmunológica autoinmune que desarrolla el individuo frente a la infección (Minoprio *et al.*, 1989), en esta situación los niveles de parasitemia parecieron ser un factor importante en el desarrollo de la infección.

CONCLUSIONES

- En tres cepas de ratones con diferente genotipo, frente a la infección con 2.000 tripomastigotes sanguíneos del clon Dm28c de *T. cruzi* como dos cepas se comportaron como resistentes y otra como susceptible, se deduce que factores genéticos del hospedero son un factor importante en el control y desarrollo de la infección con este parásito.
- Las cepas A.Sw y CF1 mostraron ser resistentes a la infección con 2000 tripomastigotes del clon Dm 28c con una supervivencia de 90% y 100% respectivamente.
- La infección con 2.000 tripomastigotes sanguíneos del clon Dm28c de *T. cruzi* indujo en los animales de la cepa BALB/c los más altos niveles de parasitemia, un 100% de mortalidad y las lesiones histopatológicas más marcadas, demostrando que el clon Dm 28c es altamente virulento para esta cepa de ratón.
- En esta situación experimental el nivel de parasitemia alcanzado por los animales infectados sí se relacionó con el daño tisular y la mortalidad pues los mayores daños y la mayor mortalidad se observó en los animales que alcanzaron los más altos niveles de parasitemia.
- Se encontraron histopatológicamente mayor número de pseudoquistes y lesiones más evidentes en corazón que en el tejido muscular, indicando quizás un mayor tropismo del parásito hacia la célula cardíaca.

REFERENCIAS

ANDRADE, L.; GALVÃO, L.; MEIRELLES, M.; CHIARI, E.; PENA, S.; MACEDO, A. 2010. Differential tissue tropism of *Trypanosoma cruzi* strains: an in vitro study. Mem. Inst. Oswaldo Cruz vol.105 (nº6): 834-837.

APT, W.; HEITMANN, I.; JERCIC, M.; JOFRÉ, L.; MUÑOZ, P.; NOEMÍ, I.; SAN MARTIN, A.; SAPUNAR, J.; TORRES, M.; ZULANTAY, I. 2008a. Guías clínicas de la enfermedad de Chagas. Parte I. Introducción y epidemiología. Revista chilena infectología vol.25. (3): 189-193.

BARBOSA, G.; DE ALBURQUERQUE, D.; BATISTA, A.; ANDRADE, P.; ALMEIDA, E.; GUARRIENTO, M.; TEIXEIRA, M.; BOTELHO, S. 2011. *Trypanosoma cruzi*: parasite persistence in tissues in chronic chagasic Brazilian patients. Mem. Inst. Oswaldo Cruz vol.106 (1): 85-91.

CONTRERAS, V.; ARAUJO-JORGE, T.; BONALDO, M.; THOMAZ, N.; BARBOSA, H.; MEIRELLES, M.; GOLDENBERG, S. 1988. Biological aspect of the Dm 28c clone of *Trypanosoma cruzi* after metacyclogenesis in chemically defined media. Mem Inst Oswaldo Cruz 83: 123 – 133.

DUTHIE, M.; KAHN, M.; WHITE, M.; KAPUR, R., KAHN, S. 2005. Critical proinflammatory and anti-inflammatory functions of different subsets of CD1d-Restricted natural killer T cells during *Trypanosoma cruzi* infection. Infect immun. 73 (1): 181-192.

KLEIN, J. ; FIGUEROA, F. ; CHELA-DAVID, S. 1983. H-2 haplotypes . Genes and antigens. Immunogenetics 17: 553 – 596.

MINOPRIO, P.; ITOHARA S.; HEUSSER C.; TONEGAWA S.; COUTINHO, A. 1989. Immunobiology of murine *T. cruzi* infection: The predominance of parasite-nonspecific responses and the activation of TCRI cells. Immunol Rev 112: 183-207.

MURPHY, K. ; TRAVERS, P. ; WALPORT, M. 2009. Presentación de antígenos a los linfocitos T. En : Inmunobiología de Janeway. Capítulo 5. 7ª ed. Ed. McGraw-Hill.México.

ROJAS DE ARIAS, A; FERRO, E. 1988. Quantification of *Trypanosoma cruzi* parasitemia by direct micromethod. Trans Roy Soc Trop Med Hyg. 82: 248.

SILVEIRA, A.; ROJAS DE ARIAS, A.; SEGURA, E.; GUILLÉN, G.; RUSSOMANDO, G.; SCHENONE, H.; PINTO, J.; VALDES, J.; LORCA, M.; SALVATELLA, R. 2002. El control de la enfermedad de Chagas en los países del cono sur de América. <<http://www.paho.org/Spanish/AD/DPC/CD/dch-historia-incosur.PDF>>[consulta:19/Mayo/2011]

TEXEIRA, A. ; HECHT, M. ; GUIMARO M. ; SOUSA A.; NITZ N. 2011. Pathogenesis of Chagas' disease . Clin Microbiol Rev. 5: 593 – 609.

TOSO, A.; VIAL, F.; GALANTI, N. 2011. Transmisión de la enfermedad de Chagas por vía oral. Rev. Med. Chile 139: 258-266.

URQUHART, G.; ARMOUR, J.; DUNCAN, J.; DUNN, A.; JENNINGS, F. 2001. Parasitología veterinaria. 2da ed. Editorial Acriba, S.A.. Zaragoza, España: 242-249

URZÚA, C.; MORALES, M.; VERGARA, U.; PALAU, M.; ZÚÑIGA, C. 2004. Sexo del hospedero y dosis infectante de parásitos como factores en el desarrollo de la infección con *Trypanosoma cruzi* en un modelo murino. Parasitol. Latinoam. 59: 104-109.

VALENZUELA, L.; BARRÍA, C.; SEPÚLVEDA, S.; GALANTI, N.; CABRERA, G. 2010. Enfermedad de Chagas crónica: Estrés oxidativo y miocarditis chagásica asociada a la persistencia parasitaria. Av. Cs. Vet. Vol.25. (1 y 2): 35-44.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). 2007. WHO expands fight against Chagas disease with support from Bayer. Media centre. News. [en línea] <<http://www.who.int/mediacentre/news/notes/2007/np16/en/index.html>> [consulta: 19 Mayo 2011]

WRIGHTSMAN, R; KRASSNER, S. ; WATSON , J. 1982. Genetic control of response to *Trypanosoma cruzi* in mice : multiple genes influencing parasitemia and survival. Infect Immun 36 : 637-644.

ZULANTAY, I; BOZÁN, F.; SALAS, C.; ZILLERUELO, N.; OSUNA, A.; GIL, L.; RODRÍGUEZ, J.; ROJAS, A.; EGEA, J.; APT, W. 2004. Enfermedad de Chagas crónica. Ausencia de *Triatoma infestans* intradomiciliario y persistencia de *Trypanosoma cruzi* circulante post-terapia. Parasitol. latinoam. v.59 (3 y 4): 93-98.

ZÚÑIGA, C.; VARGAS, R.; COURCELLES, M.; VERGARA, U. 1997. Infección experimental con *Trypanosoma cruzi* en machos y hembras de tres cepas de ratones. Parasitol. Al Día 21: 85-91.

ZÚÑIGA, C.; PARRA, A.; VELA, H.; COURCELLES, T.; VARGAS, R.; VERGARA, U. 1998. Estudio histopatológico en ratones infectados en forma experimental con *Trypanosoma cruzi*. Parasitol. Día 22: 23-28.

ZÚÑIGA, C., VARGAS, R., VERGARA, U. 2002. Evolución de la infección con *Trypanosoma cruzi* en cepas susceptibles y resistentes de ratones. Arch Med Vet 2 : 183 – 188.

ZÚÑIGA, C.; CEPEDA, R.; PALÁU, MT.; VERA, A.; MEJÍA, J.; VERGARA, U. 2007. Efecto protector de una cepa no virulenta contra la infección con una cepa virulenta de *Trypanosoma cruzi* en un modelo murino. Arch. Med. Vet. vol.39, (1): 77-82.

ZÚÑIGA, C.; BINDER, N. ; PALAU, M.T. ; LARENAS J. ; VERGARA U. 2012. Edad del hospedero en la evolución de la infección experimental con *Trypanosoma cruzi* en un modelo murino. Rev Ibero-Latinoam Parasitol. 71 (1): 23 – 33.