



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

DESARROLLO DE LA INFECCION CON
***Trypanosoma cruzi* EN TRES CEPAS PURAS DE**
RATONES

ALEJANDRO VERA MELLA

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

PROFESOR GUIA: Dr. CLAUDIO ZUÑIGA MARTI M.V; M.S.

SANTIAGO-CHILE 2005



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

DESARROLLO DE LA INFECCION CON
Trypanosoma cruzi **EN TRES CEPAS PURAS DE**
RATONES

ALEJANDRO VERA MELLA

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

NOTA FINAL.....

	NOTA	FIRMA
PROFESOR GUÍA : DR. CLAUDIO ZUÑIGA
PROFESOR CONSEJERO : DRA. RAQUEL CEPEDA
PROFESOR CONSEJERO : DR. FERNANDO FREDES

SANTIAGO-CHILE 2005

AGRADECIMIENTOS

He llegado al final de una etapa, con la entrega de esta tesis termino mi etapa de estudiante de medicina veterinaria, no ha sido fácil, he tenido penas y alegrías, pero creo que en el transcurso de la carrera he aprendido más que solo conocimientos y esto da un saldo muy positivo. A continuación paso a nombrar a todos los que me han acompañado en este camino, a mis Padres Sergio e Hilda que sin ellos nada de esto hubiera sido posible; a mi hermano Nelson por su apoyo; a mis amigos y compañeros de carrera con quienes compartí tantos momentos; a mi novia Pamela, amiga, compañera y soporte en los momentos difíciles, y finalmente a mi profesor guía el Dr. Claudio Zúñiga, quien brindó todos sus conocimientos y trabajo para que esta tesis llegara a buen puerto y en quien he encontrado mucho más que sólo un guía para mi trabajo. Por todo lo anterior y por muchas cosas que se quedan sin mencionar muchas gracias a todos.

RESUMEN

En el presente trabajo se infectaron ratones de las cepas ACA, A.Sw y C57BL/6 con 2.000 tripomastigotes sanguíneos del clon Dm 28c de *Trypanosoma cruzi*.

Los animales de la cepa ACA se comportaron como altamente susceptibles a la infección, con un 100 % de mortalidad antes de las tres semanas postinfección. Por el contrario, las cepas A.Sw y C57BL/6 se mostraron como resistentes sobreviviendo el 100 % de los animales, pasados los 6 meses postinfección. Las cepas ACA (H2^f) y A.Sw (H2^S) son congénicas, es decir sólo difieren en el cromosoma 17, donde se ubica el Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC). Los resultados anteriores implicarían que genes ligados al haplotipo H2^S serían importantes en el fenómeno de resistencia a la infección. Algo semejante ocurre con la cepa C57BL/6 que porta el haplotipo H2^b y se comporta como resistente al igual que otras cepas descritas como tal, como las cepas B10 y LP también portadoras del haplotipo H2^b, pero diferentes en el resto de los cromosomas a la cepa C57BL/6. Todo esto apoyaría la idea que una determinada combinación de genes MHC es importante en la resistencia o susceptibilidad a la infección con *T.cruzi*, en el modelo murino.

Las cepas ACA y A.Sw presentaron los más altos niveles de parasitemia, siendo una cepa susceptible y la otra resistente, lo que estaría de acuerdo con la idea que los niveles de parasitemia no se correlacionan siempre con la resistencia o susceptibilidad a la infección.

El estudio histopatológico de tejidos de los animales infectados mostró que el tejido más afectado es miocardio, menos músculo esquelético y prácticamente no se observaron alteraciones importantes en intestino delgado.

El mayor número de células parasitadas fue observado en la cepa ACA, que fue la única que mostró correlación positiva entre cantidad de parásitos intracelulares y cantidad de parásitos circulantes.

INDICE

- Introducción	1
- Revisión Bibliográfica	3
- Objetivos	13
- Materiales y Métodos	14
- Resultados	18
- Discusión	30
- Conclusiones	36
- Bibliografía	37

INTRODUCCIÓN

La tripanosomiasis americana o Enfermedad de Chagas es causada por el protozoo hemoflagelado *Trypanosoma cruzi* y afecta a millones de personas en el continente americano. El agente causal fue aislado por primera vez, en 1909, por el biólogo brasileño Carlos Chagas, de un insecto vector (*Panstrongylus megistus*). En su condición de endemo-enzootia, esta enfermedad se encuentra extendida desde el sur de los Estados Unidos, hasta el paralelo 41, latitud sur, en Chile y Argentina (Schmunis, 1994).

El mayor porcentaje de infección se evidencia en zonas rurales y periurbanas, donde las precarias condiciones socio-económicas y la naturaleza doméstica del insecto vector favorecen la mantención endémica de la infección. En Chile, el territorio afectado se extiende desde la I Región, frontera con Perú por el Norte hasta la VI Región, en la zona central del país (Schenone y Rojas, 1989).

En el ciclo biológico de *T. cruzi* participan vectores biológicos hematófagos de la subfamilia Triatominae, como también hospederos vertebrados como el hombre, animales domésticos y especies silvestres.

El modelo experimental más utilizado para estudiar esta parasitosis es el modelo murino, debido a su fácil manejo, mayor conocimiento de su estructura genética y porque las alteraciones que ocurren durante la etapa aguda de la infección son semejantes a las que ocurren en el humano.

En el presente trabajo se analizó el desarrollo de la infección en tres cepas puras de ratones infectados experimentalmente con el clon Dm 28c de *T. cruzi*.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

El parásito *Trypanosoma cruzi* causa la enfermedad de Chagas, en el humano, un síndrome incurable y debilitante que afecta a millones de personas en Latinoamérica (Dias *et al.*, 2002). En la década de los 90, la Enfermedad de Chagas fue considerada, por el Banco Mundial, como la enfermedad parasitaria con el mayor impacto socio-económico en Latinoamérica, incluso más que el efecto combinado de todas las otras enfermedades parasitarias (World Bank, 1993). El número de personas infectadas fue estimado en 16 – 18 millones, con alrededor de 100 millones con riesgo de infección.

En los últimos años estos valores han ido disminuyendo paulatinamente, hasta considerar que actualmente existen unos 11 millones de personas infectadas (Dias *et al.*, 2002). Este éxito se ha debido, principalmente, a adecuados programas de erradicación del vector y mejores sistemas de control en los bancos de sangre y considerando, además, la mayor migración de personas de zonas rurales a las ciudades con una mejora en la calidad de la vivienda de estas personas. Chile y Uruguay fueron declarados países libres de la transmisión vectorial de la enfermedad en 1999 y 1997, respectivamente (Dias *et al.*, 2002).

A pesar de lo mencionado anteriormente, existe el riesgo latente de la reaparición del problema pues ya se observa una tendencia a relajar o incluso suprimir los programas de control, ya sea por una cuestión de costo-beneficio o porque se le da prioridad a enfermedades emergentes (Basombrío *et al.*, 1998). A lo anterior, se suma el escaso conocimiento acerca de la importancia en la transmisión de la enfermedad de los vectores silvestres presentes en nuestro país, como son *Mepraia spinolai* y *M. gajardoi*, ya que al ser eliminado el vector

doméstico éstos podrían pasar a ocupar los nichos ecológicos vacantes (Canals y Cattán, 1992; Acuña, 2002). El otro factor a considerar es la colonización de territorios vírgenes y el consecuente riesgo de domesticación de especies selváticas de triatomíneos, lo cual ha ocurrido en zonas de la Amazonia brasileña (Coura *et al.*, 2002).

Agente Etiológico

T. cruzi pertenece a la Clase Zoomastigophorea, es decir protozoo flagelado que no posee cromatóforos. El Orden es Kinetoplastida, cuyos miembros se caracterizan por tener un kinetoplasto, organelo que contiene ácido desoxiribonucleico (ADN) mitocondrial y está localizado a nivel de la base del flagelo. La familia es Trypanosomatidae, parásitos con un solo flagelo y que pueden infectar a vertebrados, invertebrados, ciliados y plantas. Son flagelados digénicos (parásitos con alternancia de su ciclo evolutivo en hospederos invertebrados y vertebrados) que presentan diferentes formas celulares durante su ciclo evolutivo. Pertenecen al Género *Trypanosoma* y Subgénero *Schizotrypanum* que se dividen dentro del hospedero como amastigotes. La especie es *T. cruzi*. *T. cruzi* Clade incluye a *T. cruzi* y *T. Rangeli*. *T. cruzi* comprende a *T. cruzi cruzi* (sensu strictu, s.s) y *T. marinkellei*, parásito de murciélagos sudamericanos. Dentro de *T. cruzi* s.s., posteriores subdivisiones han sido hechas en base a patrones de isoenzimas y análisis de fragmentos de restricción en el ADN del kinetoplasto (Stevens *et al.*, 2001).

Formas o estados biológicos de *T. cruzi*

Durante su ciclo biológico los tripanosomátidos experimentan modificaciones morfológicas y funcionales al pasar de hospederos vertebrados a insectos y viceversa. En *T. cruzi* se describen tres estados biológicos diferentes (Atías y Apt, 1991; Botero y Restrepo, 1992) :

Epimastigote : Es la forma especialmente adaptada para sobrevivir y multiplicarse extracelularmente en el intestino del insecto vector y tiene un tamaño de 10-20 μm . Posee un único flagelo unido cerca del centro del cuerpo, un núcleo y un kinetoplasto anterior al núcleo. Luego de multiplicarse por fisión binaria, se acumulan en la porción distal del intestino del insecto, posteriormente se diferencian al estado de tripomastigotes. También es la forma preponderante en los cultivos axénicos del parásito.

Tripomastigote : Esta es la forma infectante no replicativa del parásito. La forma que es eliminada desde la ampolla rectal del insecto vector e ingresa al hospedero, se denomina tripomastigote metacíclico. La forma que se encuentra posteriormente circulante en sangre de personas o animales infectados se conoce con el nombre de tripomastigote sanguíneo. Ambas formas son alargadas, fusiformes y con un tamaño de alrededor de 20 μm . Posee un núcleo grande cerca de la parte central y a lo largo del cuerpo tiene una membrana ondulante bordeada por el flagelo, que se inicia en la región del kinetoplasto y sale del cuerpo por el extremo anterior. El tamaño notoriamente grande del kinetoplasto constituye una de las principales características morfológicas, que lo diferencian de otras especies de tripanosomas. En este estado, los parásitos presentan un marcado pleomorfismo y se describen formas anchas, delgadas e intermedias.

A pesar que se piensa que *T. cruzi* puede infectar cualquier célula del organismo, la mayoría de las cepas de parásitos tienen predilección para infectar macrófagos y células musculares lisas, estriadas y cardíacas. Dentro de la célula infectada, en el hospedero, el tripomastigote se diferencia a la forma de amastigote.

Amastigote : Esta es la forma replicativa del parásito en las células del hospedero mamífero. Se caracteriza por ser redondeado u oval, dividirse por fisión binaria y tener un tamaño de alrededor de 1.5 – 4 μm y no poseer un flagelo evidente a la microscopía óptica. Los amastigotes se aglomeran dentro de las células formando nidos o pseudoquistes.

Vías de Transmisión

La principal vía de transmisión de la enfermedad son insectos hematófagos que pertenecen al orden Hemíptera, familia Reduviidae, subfamilia Triatominae y que incluye a los géneros *Rhodnius*, *Mepraia*, *Triatoma* y *Panstrongylus*. Estos vectores sólo existen en América al igual que *T. cruzi*, pero se consideran de aparición más reciente que el protozoo, probablemente derivando de especies más ancestrales con hábitos fitófagos (Schofield, 2000; Stevens *et al.*, 2001). Más de 50 especies de triatominos pueden ser infectadas por *T. cruzi*, pero sólo unas pocas especies tienen hábitos domésticos de manera de tener contacto con humanos y animales domésticos como perros y gatos.

Las especies de vector varían en los diferentes países donde existe la enfermedad. Los vectores más importantes son *Triatoma infestans* en Argentina,

Bolivia, Brazil, Chile, Paraguay, Perú y Uruguay; *T. sordida* en Argentina, Bolivia, Brazil y Paraguay; *Panstrongylus megistus* y *T. brasiliensis* en Brazil; *T. dimidiata* en Ecuador, México y Centro América; *T. barberi* en México; *Rhodnius pallescens* en Colombia y Panamá y *R. Prolixus* en Colombia, México, Venezuela y Centro América (Schmunis, 1994).

En Chile, se encuentran también *M. spinolai* y *M. gajardoi* (Frías *et al.*, 1998; Canals *et al.*, 1999), especies autóctonas que poseen hábitos principalmente silvestres y sólo en raras ocasiones invaden la vivienda humana. Desde el punto de vista epidemiológico *M. spinolai* podría actuar como vector del ciclo silvestre de la enfermedad en Chile, pero se ha reportado menores índices de infección que *T. infestans* (Canals *et al.*, 1999; Acuña, 2002).

Existen otras formas adicionales de infección como son, las transfusiones sanguíneas, los trasplantes de órganos de donantes infectados y la transmisión congénita (Aguilera *et al.*, 1988; Muñoz *et al.*, 1990).

Ciclo Biológico de *T. cruzi*

El vector se infecta al ingerir sangre de un mamífero con tripomastigotes sanguíneos circulantes. Estas formas sufren transformaciones a lo largo del tubo digestivo del insecto, encontrándose principalmente tres estados diferentes:

- a) Formas redondeadas en el estómago, denominadas como esferomastigotes;
- b) En el tracto intestinal los parásitos se diferencian y multiplican extracelularmente como epimastigotes;
- c) Al cabo de 15-30 días los epimastigotes se diferencian en tripomastigotes metacíclicos que se acumulan en la ampolla rectal y son eliminados con las heces (Botero y Restrepo, 1992; Burleigh y

Andrews, 1995). Por lo general, el vector se torna infectante a los 20-30 días después de una alimentación de sangre infectada y permanece así toda la vida, un año aproximadamente (Botero y Restrepo, 1992).

Los triatominos infectados, al picar nuevamente a un mamífero y luego de una ingestión abundante de sangre, habitualmente deyectan sobre la piel del hospedero contaminando el sitio de la picadura u otro punto lesionado favoreciendo la entrada del parásito al tejido. Los tripomastigotes que ingresan pueden infectar cualquier célula del organismo, por un proceso mediado por vacuolas e iniciando en el interior el ciclo intracelular, que dura aproximadamente 4-5 días. El primer paso es el escape del parásito desde la vacuola endocítica hacia el citosol, lo que ocurre dentro de las primeras 2 horas luego de la entrada a la célula. Una vez en el citosol, los tripomastigotes se diferencian al estado de amastigotes que es la forma replicativa intracelular. Se dividen por fisión binaria, cada 12 horas, de manera que se originan alrededor de 500 amastigotes por cada tripomastigote internalizado. Después de completar su ciclo replicativo, los amastigotes se diferencian en tripomastigotes, se provoca la ruptura de la célula y los parásitos salen a circulación, donde pueden invadir otras células vecinas o ser ingeridos por un vector, completándose así el ciclo (Botero y Restrepo, 1992).

A pesar de representar lo mencionado anteriormente la ruta clásica de transmisión, existen dudas que el parásito pueda atravesar la piel intacta, por lo que se acepta, actualmente, que la principal vía de entrada son las mucosas a nivel ocular, nasal o bucal. De hecho, se postula que la infección de animales domésticos, como perros y gatos ocurriría, principalmente, por vía oral, por deposiciones contaminadas presentes en el pelaje o alimentos y no directamente por el vector, a diferencia de lo que ocurre en el humano (Schofield, 2000;

Montenegro *et al.*, 2002). De la misma manera, los pequeños roedores, que son importantes reservorios en países como Brazil, Colombia y Venezuela, se infectarían, principalmente, por consumir insectos vectores infectados (Diotaiuti *et al.*, 1995).

Fases de la enfermedad

La enfermedad de Chagas, en el humano, presenta tres fases o etapas: Fase aguda, indeterminada y crónica (Apt y Reyes, 1986; Atías y Apt, 1991; Botero y Restrepo, 1992).

Fase aguda: Tiene un período de incubación de 3-12 días con manifestaciones clínicas muy variables y evidente principalmente en niños. Esta fase va acompañada de un aumento progresivo de parásitos en circulación, generalmente detectables por técnicas parasitológicas corrientes. En los tejidos se encuentran células parasitadas (pseudoquistes) e infiltrados de células mononucleares. En la forma generalizada grave se puede presentar toxemia, meningoencefalitis y miocarditis aguda. Todo lo anterior puede originar insuficiencia cardíaca y llevar al paciente a la muerte en 2-4 semanas. De todas maneras, en esta fase el índice de mortalidad es relativamente bajo y no superior al 5 % de los individuos infectados. En el ratón, el desarrollo de la fase aguda depende fuertemente de la cepa de ratón, de la cepa de parásito y de la dosis de inóculo inicial en la infección experimental. En las cepas susceptibles de ratones muere el 100 % de los animales infectados alrededor de los 15 post-infección (Zúñiga, 1995; Zúñiga *et al.*, 1998)

Fase latente o indeterminada: Esta fase se caracteriza por una lenta multiplicación de los parásitos, oligoparasitemias y sin manifestaciones clínicas evidentes. Este período puede durar meses, años, indefinidamente o pasar a la forma crónica.

Fase crónica: Aparece tardíamente y los signos clínicos principales corresponden a la cardiopatía chagásica con miocarditis y las visceromegalias, principalmente megaesófago y megacolon. En esta forma de la enfermedad puede ocurrir muerte súbita sin haber desarrollado insuficiencia cardíaca, pero con un grado de cardiomegalia.

Modelos experimentales

En condiciones naturales, *T. cruzi* puede infectar alrededor de 100 especies de mamíferos de diferentes órdenes, incluyendo animales silvestres y domésticos (Texeira *et al.*, 2001; Stevens *et al.*, 2001). Lo anterior ha permitido realizar infecciones experimentales en diferentes especies animales, con la ventaja de poder hacer el estudio de lo que ocurre durante la etapa aguda, lo que habitualmente no es posible analizar en humanos, ya que normalmente los pacientes son detectados en la etapa crónica. En la infección experimental con *T. cruzi* se han utilizado cobayos (Basombrío *et al.*, 1987), conejos (Ramírez y Brener, 1987), cabras (Fernandez *et al.*, 1994), perros (De Lana *et al.*, 1992), monos (Rosner *et al.*, 1998), ratas (Revelli *et al.*, 1985) y ratones (Zúñiga *et al.*, 1997a).

Existen múltiples factores, tanto dependientes del parásito como del hospedero, que se encuentran involucrados en determinar la resistencia o

susceptibilidad a la infección con *T. cruzi*. De hecho, parásitos de una misma cepa, derivados de cultivos axénicos, cultivos celulares o de sangre no tienen el mismo comportamiento al infectar animales en forma diferencial (Zúñiga *et al.*, 1997b; Paláu *et al.*, 2003) En el modelo murino, se sabe que las distintas cepas de ratones difieren en la susceptibilidad o resistencia a la infección con *T. cruzi*, existiendo al parecer un complejo control genético de los niveles de parasitemias y sobrevivencia de los animales infectados (Trischmann y Bloom, 1982; Wrigshman *et al.*, 1982; Zúñiga, 1995; Zúñiga *et al.*, 2002).

Entre los factores genéticos, dependientes del hospedero, importantes para determinar la evolución de la infección con *T. cruzi* se encuentran los genes asociados al Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) que codifican para un conjunto de moléculas involucradas en la respuesta inmune a una variedad de antígenos (Vergara *et al.*, 2002). En el ratón el MHC se denomina sistema H2 y se ubica en el cromosoma 17. Todos los genes MHC que están ubicados en un cromosoma constituyen un haplotipo y los distintos haplotipos de las cepas de ratones se representan con las siglas H2 y una letra minúscula superpuesta. Por ejemplo, la cepa ACA posee el haplotipo H2^f, la cepa A.Sw tiene el haplotipo H2^s y la cepa C57BL/6 porta el haplotipo H2^b. Se denominan cepas congénicas de ratones a aquellas que sólo difieren en el par de cromosomas 17 y comparten el resto de los cromosomas (Klein *et al.*, 1983). Las cepas ACA y A.Sw se consideran congénicas. La reactividad diferencial de estas cepas congénicas frente a un estímulo antigénico permite responsabilizar directamente a elementos del MHC, puesto que el cromosoma 17, donde se ubica este complejo génico, es la única diferencia entre ellas.

Desde que la tripanosomiasis americana fue descrita por Carlos Chagas en 1909, uno de las aspiraciones de los investigadores en el campo de la inmunoparasitología ha sido poder desarrollar una vacuna efectiva contra esta enfermedad, frente a la cual tampoco existen tratamientos farmacológicos altamente adecuados. El conocimiento sobre la fisiopatología de la infección con *T. cruzi* en animales de experimentación, ha aportado avances importantes ya, que estudios en estos modelos han permitido analizar diferentes parámetros dependientes tanto del hospedero como del parásito, en condiciones que por razones éticas y prácticas no pueden realizarse en humanos.

La respuesta inmune, en diferentes cepas puras de ratones, a la infección con una variedad de parásitos intracelulares ha sido analizada como un esfuerzo para desarrollar modelos que permitan entender mejor las enfermedades producidas en el hombre, por estos agentes patógenos.

OBJETIVO GENERAL

Estudiar la evolución de la infección con el Clon Dm 28c de *T. cruzi* en tres cepas puras de ratones.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

Estudiar prepatencias, niveles de parasitemia y mortalidad en tres cepas puras de ratones, infectados con el Clon Dm28c de *T. cruzi*.

Comparar histopatológicamente las lesiones en diferentes tejidos de los ratones infectados de las tres cepas.

MATERIALES Y METODOS

Cepa de parásito

Las infecciones experimentales se llevaron a cabo utilizando tripomastigotes sanguíneos del clon Dm 28c de *T. cruzi* (Contreras *et al.*, 1988). Esta cepa de parásito fue donada por la Dra. Anne Wallace de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile y es mantenida en el bioterio de la Unidad de Inmunología de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, por pasajes sucesivos en ratones Balb/c.

Ratones

Se utilizaron ratones de las cepas ACA (H2^f), A.Sw (H2^s) y C57BL/6 (H2^b). Estas cepas se mantienen por cruzamientos endogámicos en el bioterio de la Unidad de Inmunología, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Chile y provienen originalmente del Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, U.S.A.

Modelo de infección

Se utilizaron tres grupos de 16 ratones machos, de 10 semanas de edad de cada una de las diferentes cepas. Todos los animales de cada grupo fueron inoculados por vía intraperitoneal con 0,2 ml de una dilución de sangre que contenía aproximadamente 2.000 tripomastigotes sanguíneos del parásito. La

sangre fue obtenida de un ratón Balb/ c infectado. Como grupo control se inocularon 10 ratones machos, de 10 semanas de edad con 0,2 ml de una dilución de sangre de un ratón Balb / c sin infectar. Estos ratones fueron sangrados paralelamente con los animales experimentales. De esta manera se pretendió definir que las alteraciones y posible muerte de los animales experimentales se debió a la infección con *T. cruzi* y no a variables como una posible anemia por las sucesivas sangrías o a fenómenos adversos inducidos por la sangre Balb/c en forma independiente del parásito.

Dosis de parásitos inoculados

La sangre para infectar los animales experimentales fue extraída mediante punción cardíaca de un ratón Balb/c infectado con el clon Dm 28c (0,6 ml), que fue sacrificado en el momento. La sangre se colocó en un frasco estéril que contenía 0,1 ml de citrato de sodio utilizado como anticoagulante. Luego se realizó una dilución de 10 µl de sangre infectada en 490 µl de suero fisiológico estéril, para luego realizar un recuento de parásitos en cámara de Neubauer. Este procedimiento permitió determinar la presencia de 10^6 de parásitos en los 0,6 ml de sangre extraída. Lo anterior implica que al sacar 30 µl de los 0,6 ml en esta muestra se encuentran aproximadamente 5×10^4 parásitos. Posteriormente, se realizó la dilución de estos 30 µl en 5 ml de suero fisiológico estéril para tener aproximadamente 2.000 parásitos en 0,2 ml, que fue la cantidad inoculada a cada ratón.

Estudio de Parasitemia

En la determinación de la prepatencia y niveles de parasitemia los animales infectados se sangraron a partir del tercer día postinfección (p.i), y luego se repitió día por medio hasta que la parasitemia fue negativa. La sangre de los ratones infectados fue obtenida de la vena caudal, en tubos de microhematocrito heparinizados, por capilaridad. Luego cada muestra fue centrifugada a 800 x g por 5 minutos y se dejó reposar por 30 minutos, a temperatura ambiente. Se calculó el volumen de sangre en cada tubo. La mayor concentración de parásitos se espera en la zona leucoplaquetaria, por lo tanto en este lugar se cortó con un lápiz diamante y se colocó este volumen en un portaobjeto, que luego fue cubierto con un cubreobjeto de 20 x 20 mm.

Finalmente se contaron parásitos en 50 campos al azar, utilizando un aumento de 400 x. El cubreobjeto de 20 x 20, con este aumento, cubre 1.600 campos ópticos, por lo tanto se deriva lo obtenido en 50 a 1.600 campos y eso corresponde a los parásitos presentes en la muestra del tubo de microhematocrito, como esa cantidad de sangre fue medida previamente se deriva finalmente a número de parásitos por ml, todo lo anterior fue realizado de acuerdo al método descrito por Arias y Ferro (1988). Los resultados del número de parásitos obtenidos en cada día de estudio se expresaron como el promedio de parasitemia del grupo, más la desviación estándar correspondiente.

Estudio histopatológico

La presencia y el daño ocasionado y/o inducido en los tejidos por el parásito fue evaluado realizando un análisis histopatológico de tejido cardíaco,

músculo esquelético e intestino, analizando en cada uno de ello distintas estructuras. En el caso del corazón se analizó por separado, miocardio y pericardio; en el músculo esquelético se observó únicamente las fibras musculares y en el caso de intestino se analizó mucosa, submucosa y la capa muscular.

Dos ratones de cada grupo fueron sacrificados a los 7, 17 y 27 días p.i. En cada uno de estos momentos se extrajo el corazón, intestino y músculo esquelético de cada animal. Los tejidos fueron fijados en formalina al 10% e incluidos en parafina, según métodos convencionales y cortados en micrótomos de rotación (Leitz) de 5 μm de espesor. Luego fueron teñidos con las técnicas Hematoxilina-Eosina (HE) y Van Giesson (VG) (López *et al.*, 1982).

La intensidad de las lesiones en los diferentes tejidos fue representada de acuerdo al siguiente criterio: (-) Tejido normal preservado; (+) Lesiones mínimas o discretas; (++) Lesiones moderadas y (+++) Lesiones severas.

La presencia de pseudoquistes fue evaluada en 10 campos microscópicos de cada corte de tejido, examinado con aumento de 600 x en un microscopio Nikon modelo Eclipse 600 y representado de la siguiente manera: (-) Negativo, ausencia de pseudoquistes; (+) Leve, con presencia de 1 - 5 pseudoquistes; (++) Moderado, con presencia de 6-10 pseudoquistes y (+++) Severo, con presencia de más de 10 pseudoquistes. Este análisis se llevó a cabo en el laboratorio de Histología de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Chile.

RESULTADOS

En el gráfico 1 se muestra el desarrollo de la infección en las cepas de ratones ACA, A.Sw y C57BL/6 infectadas con 2.000 tripomastigotes sanguíneos del clon Dm 28c de *T. cruzi*. El periodo de prepatencia, en sangre, fue de 4 días para las tres cepas. La cepa ACA presentó un nivel máximo de parasitemia de 2.2×10^6 parásitos/ml mientras la parasitemia de la cepa A.Sw se obtuvo un máximo de 2.5×10^6 parásitos/ml, ambas alcanzadas al día 8 postinfección (p.i.) y finalmente la cepa C57BL/6 sólo alcanzó un nivel máximo de 4.5×10^5 parásitos/ml al día 10 p.i.. Tanto, la cepa A.Sw, como la cepa ACA presentaron parasitemias evidentes hasta el día 18 p.i., sin embargo, en la cepa C57BL/6, a pesar de presentar los niveles más bajos de parasitemia, se detectaron parásitos circulantes hasta el día 24 p.i..

Como todos los animales se infectaron, se utilizó la muerte o sobrevivencia como criterio de susceptibilidad o resistencia. A este respecto, los resultados mostraron que la cepa ACA se comportó como altamente susceptible, muriendo el 100 % de los animales al día 18 p.i. y con un 50 % de mortalidad acumulada al día 15 p.i.. Las cepas A.Sw y C57BL/6 se comportaron como resistentes, con una sobrevivencia del 100 % de los animales infectados pasados los 6 meses p.i.. A pesar de que en los primeros días p.i., estos animales mostraron decaimiento, pelo erizado y disminución de peso, lograron recuperarse y volver, prácticamente, a su estado inicial.

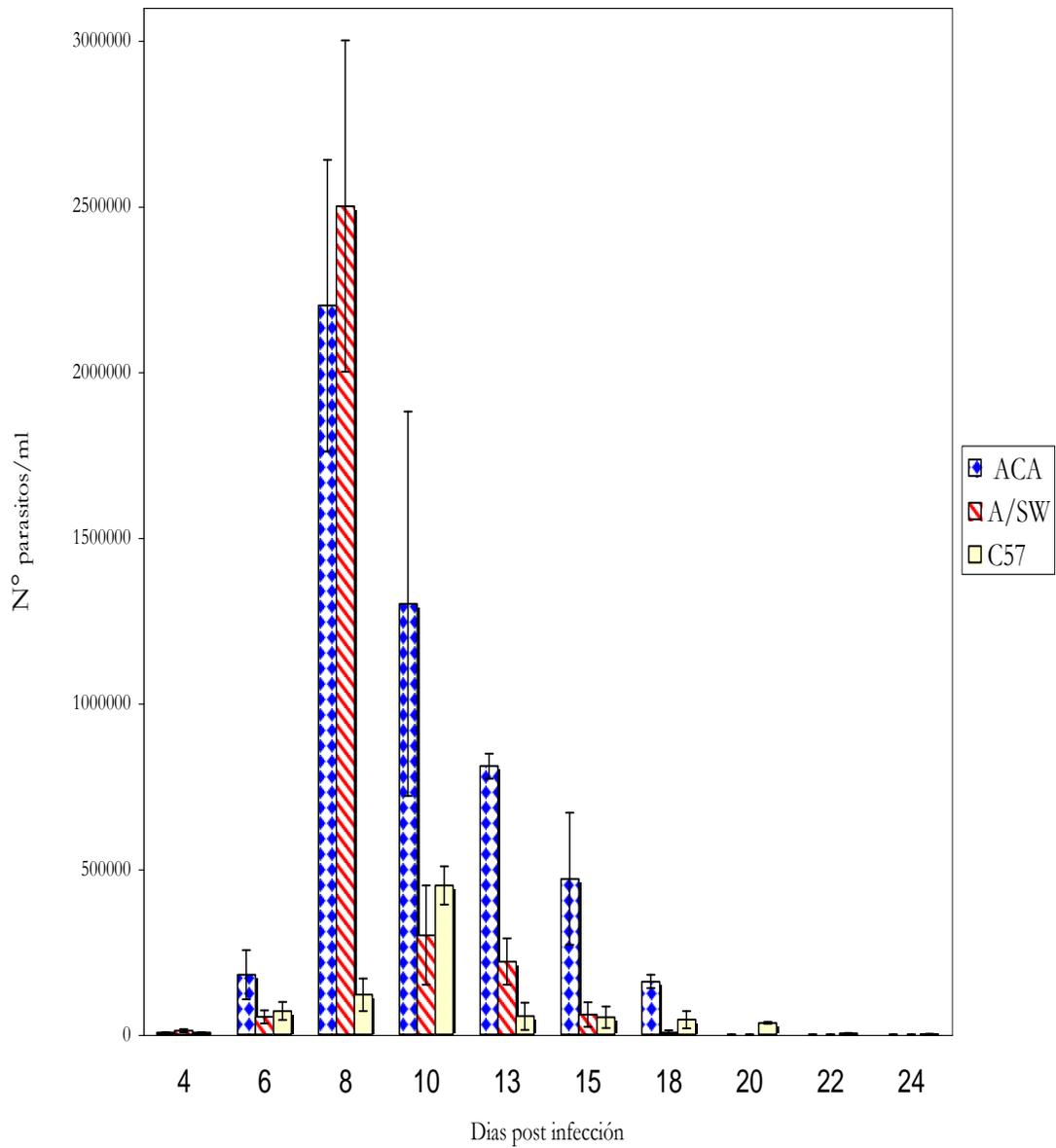


GRAFICO 1

Niveles de parasitemia en tres cepas puras de ratones (A.Sw, ACA y C57BL/6) infectados con 2.000 trypomastigotes sanguíneos de *T. Cruzi*.

En el cuadro 1 se muestran los resultados obtenidos del análisis histopatológico en pericardio y miocardio en los tres días de muestreo. En las muestras obtenidas al séptimo día p.i., analizando pericardio, se observó en los tejidos de las tres cepas sólo una escasa infiltración, además de una hiperemia leve. En los demás parámetros evaluados las tres cepas presentaron resultados negativos. En las muestras obtenidas en la segunda semana p.i. se observó, que la infiltración resultó ser moderada en los ratones de las cepas ACA y C57BL/6 y para la cepa A.Sw resultó ser entre moderada / severa. Comparado con el muestreo anterior, no hubo cambios evidentes salvo en el caso de la cepa A.Sw, la cual presentó hemorragia leve. Para el día 27 p.i. todos los animales de la cepa ACA habían muerto. En este día, los ratones de la cepa A/Sw presentaron infiltración moderada mononuclear e hiperemia leve y los de la cepa C57BL/6 presentaron sólo infiltración y hemorragia leve.

Los resultados, al analizar miocardio, mostraron alteraciones un poco más evidentes que el caso anterior. En el día 7, se observaron lesiones inflamatorias leves sólo en los ratones de las cepas ACA (Figura 1) y C57BL/6 (Figura 5). Las lesiones hiperémicas observadas fueron leves en las cepas ACA y C57BL/6 en cambio los tejidos de la cepa A.Sw presentaron una hiperemia moderada. El edema observado fue leve para la cepa C57BL/6 (Figura 5), moderado para la cepa ACA (Figura 1) y para la cepa A.Sw se mostró entre moderado a severo (Figura 3), además, esta alteración se observó con mayor importancia en el apex cardíaco. Las lesiones hemorrágicas fueron leves para los ratones de las cepas ACA (Figura 1) y moderados para la cepa A.Sw, por el contrario, los tejidos de la cepa C57BL/6 no presentaron lesiones hemorrágicas. Fibrosis se observó sólo en la cepa C57BL/6 y de carácter leve. Los ratones de las cepas ACA y

C57BL/6 (Figura 5), mostraron lesiones leves de necrosis. En la cepa ACA se observaron cambios degenerativos leves y para las cepas C57BL/6 y A.Sw moderada (Figura 3 y 5, respectivamente). En ninguno de los cortes de las tres cepas se encontraron pseudoquistes.

Al día 17, el miocardio presentó lesiones inflamatorias de tipo moderada en los ratones de las cepas ACA y C57BL/6 (Figura 11) y lesiones severas en la cepa A.Sw (Figura 9). En las tres cepas se observó, en el tejido adiposo, lesiones inflamatorias severas con predominio de mononucleares. La hiperemia alcanzó niveles leves en las cepas ACA y C57BL/6 (Figura 11) y moderada en la cepa A.Sw. El edema fue más evidente en las cepas resistentes, ya que en los ratones ACA fue leve y en las cepas C57BL/6 A.Sw moderado. Al igual que en las muestras del día 7 p.i., el edema se localizó con mayor intensidad en el apex cardíaco. Lesiones de carácter hemorrágico sólo se evidenciaron en forma leve en el miocardio de los ratones de la cepa A/Sw. En ninguna de las tres cepas se observó fibrosis. Necrosis leve se encontró en los ratones de la cepa A.Sw (Figura 9), en la cepa ACA se calificó las lesiones como moderadas al igual que en la cepa C57BL/6 (Figura 11). Células con alteraciones degenerativas, se encontraron en cantidad leve en la cepa A.Sw (Figura 9) y moderado en la ACA (Figura 7) y la cepa C57BL/6. No se encontraron pseudoquistes en las muestras analizadas de las cepas A.Sw ni C57BL/6, sin embargo, en la cepa ACA se pudieron observar más de 100 pseudoquistes (Figura 7).

Finalmente, en el último día de muestreo, con casi cuatro semanas p.i., los tejidos de los animales sobrevivientes mostraron lesiones inflamatorias moderadas en la cepa A.Sw (Figura 13) y leves en la cepa C57BL/6 (Figura 15). La hiperemia fue severa en los animales A.Sw y leve para los de la cepa C57BL/6.

El edema observado, al igual que el caso anterior, fue severo para A.Sw (Figura 13) y leve para los C57BL/6 (Figura 15). Las lesiones hemorrágicas encontradas fueron moderadas en la cepa A.Sw y leves en la C57BL/6. Se observó una fibrosis leve sólo en los tejidos de la cepa C57BL/6. Se encontraron focos necróticos de carácter leve (Figura 13) en las dos cepas sobrevivientes. Cambios degenerativos leves se detectaron en los ratones A.Sw y leve a moderadas en los C57BL/6. Como en todas las situaciones anteriores, no se observaron pseudoquistes en los tejidos de estas dos cepas de ratones.

Los resultados obtenidos al analizar los cortes de músculo estriado esquelético se muestran en el cuadro 2, en el cual se puede apreciar, que en el día 7 p.i., solamente la cepa A.Sw presentó hiperemia leve, pero las tres cepas mostraron lesiones inflamatorias de carácter leve (Figuras 2, 4 y 6). El edema fue leve en los tres casos experimentales (Figuras 2 y 6). Focos hemorrágicos fueron observados en forma leve sólo en la cepa A.Sw. En las cepas A.Sw (Figura 4) y ACA se detectaron lesiones necróticas leve. Células de aspecto degenerativo leve se presentó en la cepa ACA y moderada en las dos restantes (Figuras 4 y 6). En ninguna de las tres cepas de ratones se observaron pseudoquistes en este tejido.

CUADRO N° 1

Estudio histopatológico de músculo cardíaco, en tres cepas puras de ratones infectadas con 2.000 tripomastigotes sanguíneos del clon Dm 28c de *T. cruzi*.

	Días post Infección							
	7			17			27	
	Cepas de ratón							
	ACA	A/SW	C57BL/6	ACA	A/SW	C57BL/6	A/SW	C57BL/6
Pericardio								
Infiltración	+	+	+	++	+++	++	++	+
Hiperemia	+	+	+	+	+	+	+	-
Edema	-	-	-	-	-	-	-	-
Hemorragia	-	-	-	-	+	-	-	+
Fibrosis	-	-	-	-	-	-	-	-
Necrosis	-	-	-	-	-	-	-	-
Cambios degenerativos	-	-	-	-	-	-	-	-
Pseudoquistes	-	-	-	-	-	-	-	-
Miocardio								
Infiltración	+	-	+	++	+++	++	++	+
Hiperemia	+	++	+	+	++	+	+++	+
Edema	++	+++	+	+	++	++	+++	+
Hemorragia	+	++	-	-	+	-	++	+
Fibrosis	-	-	+	-	-	-	-	+
Necrosis	+	-	+	++	+	++	+	+
Cambios degenerativos	+	++	++	++	+	++	+	++
Pseudoquistes	-	-	-	+++	-	-	-	-

En el segundo día de análisis (17 p.i.), las lesiones inflamatorias se manifestaron con un grado moderado en la cepa ACA (Figura 8) y severo en las otras dos cepas (Figuras 10 y 12). Los ratones C57BL/6 presentaron hiperemia leve. El edema se manifestó como moderado en la cepa ACA, en cambio fue severo en la cepa A.Sw y C57BL/6 (Figuras 10 y 12, respectivamente). Se observó una fibrosis leve sólo en los tejidos de las cepas A.Sw y C57BL/6. En relación a las lesiones necróticas, los niveles alcanzados en la cepa ACA fueron leves (Figura 8), y severas en tejido muscular de los ejemplares de la cepa A.Sw (Figura 10) y C57BL/6 (Figura 12). Los cambios degenerativos fueron moderada en los ratones ACA (Figura 8), leves en la cepa A.Sw (Figura 10) y moderados a severos en la C57BL/6 (Figura 12). Sólo se observó la presencia leve de pseudoquistes (3) en las muestras de las cepas ACA (Figura 8) y C57BL/6.

Para el último día de muestreo (27 p.i.) la infiltración, el edema y la necrosis presentaron características moderadas, en las dos cepas sobrevivientes (Figuras 14 y 16). Hiperemia alcanzó niveles leves en la cepa C57BL/6. La degeneración celular alcanzó niveles leves en las dos cepas de ratones (Figura 14). No se encontró presencia de pseudoquistes en ninguna de las dos cepas.

CUADRO N° 2

Estudio histopatológico de músculo estriado esquelético, en tres cepas puras de ratones infectadas con 2.000 tripomastigotes sanguíneos del clon Dm 28c de *T. cruzi*.

	Dias post Infección								
	7			17			27		
	Cepas de ratón								
	ACA	A/SW	C57BL/6	ACA	A/SW	C57BL/6	A/SW	C57BL/6	
músculo estriado									
Infiltración	+	+	+	++	+++	+++	++	++	
Hiperemia	-	+	-	-	-	+	-	+	
Edema	+	+	+	++	+++	+++	++	++	
Hemorragia	-	+	-	-	-	-	-	-	
Fibrosis	-	-	-	-	+	+	-	-	
Necrosis	+	+	-	+	+++	+++	++	++	
Cambios degenerativos	+	++	++	++	+	++	+	+	
Pseudoquistes	-	-	-	+	-	+	-	-	

Al analizar los cortes de intestino, no se observaron lesiones manifiestas en ninguna de las tres cepas de ratones infectados en los tres días p.i. estudiados. En la mucosa intestinal, sólo se pudo apreciar infiltración mononuclear y principalmente plasmocítica, que alcanzó a ser moderada al día 17 p.i. en la cepa A.Sw y con dilatación de los capilares linfáticos. En el día 27 p.i. se observó una infiltración moderada en la cepa A.Sw y leve en la cepa C57BL/6.

En submucosa, al día 7 p.i., no se observó lesiones de consideración en ninguna de las tres cepas. En el día 17 p.i. sólo los tejidos de la cepa A.Sw presentaron una hiperemia de carácter leve y con leve aumento de infiltración celular. Al día 27 p.i. las dos cepas presentaron lesiones de tipo infiltrativo de carácter leve y en relación a la cepa C57BL/6, también, se observó una hemorragia leve y células plasmocíticas aumentadas en forma moderada.

En la capa muscular del intestino el día 7 p.i la cepa ACA no se presentan alteraciones, al igual que en la cepa A.Sw. Para la cepa C57BL/6 se vio que la hiperemia y hemorragia alcanzaban un carácter leve. Para el segundo día de muestreo se observó, que la capa muscular se encontraba más delgada que los días anteriores y las fibras presentaron un aspecto desorganizado en la cepa ACA. Para la cepa A.Sw hubo leve aumento de la infiltración y la cepa C57BL/6 se caracterizó por continuar presentando hiperemia y hemorragia leve. Para el día 27 p.i. la cepa A.Sw esta capa presentó un aspecto normal en cambio en la cepa C57BL/6 aún se observó edema, hemorragia y fibrosis leve y cambios degenerativos celulares de leves a moderados. El tejido adiposo, siempre se observó con distintos grados de infiltrado, principalmente, mononuclear.

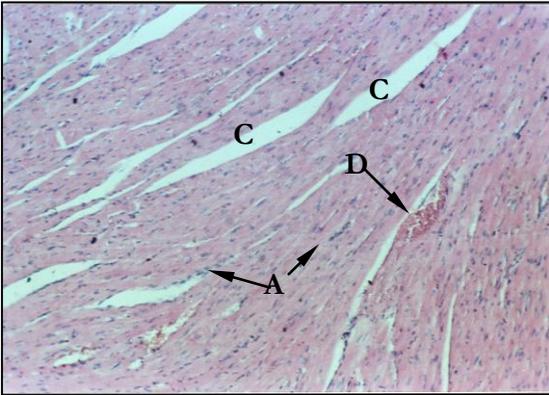


Figura 1: ratones ACA, día 7 p.i., músculo cardíaco, aumento 10x: A- infiltración; C-edema; D-hemorragia

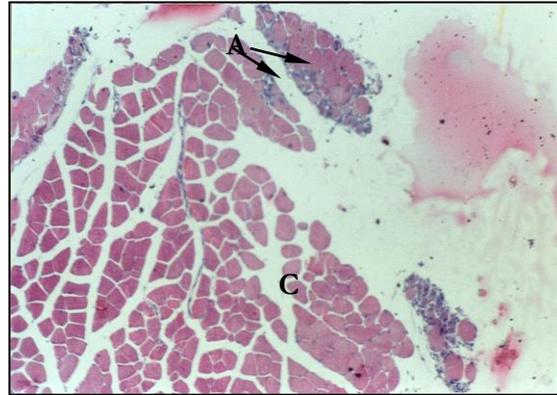


Figura 2: ratones ACA, día 7 p.i., músculo esquelético, aumento 10x: A-infiltración; C-edema.

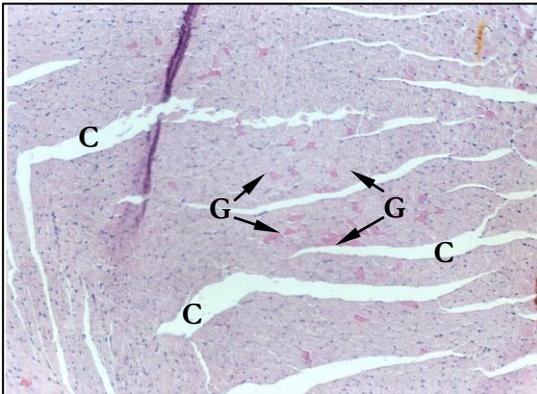


Figura 3: ratones A.Sw, día 7 p.i., músculo cardíaco aumento 10x: C-edema; G-cambios degenerativos.

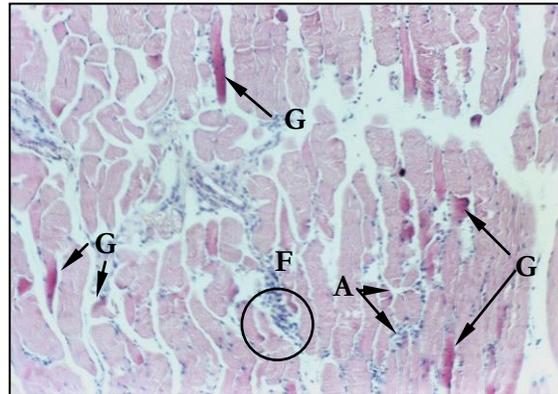


Figura 4: raton A.Sw, día 7 p.i., músculo esquelético, aumento 10x: A-infiltración; F-necrosis; G-cambios degenerativos.

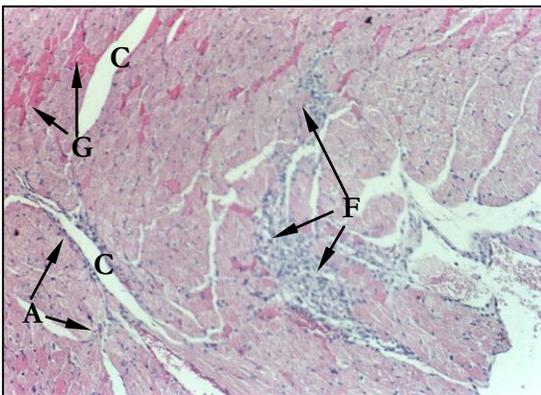


Figura 5: ratones C57BL/6, día 7 p.i., músculo cardíaco, aumento 10x: A-infiltración; C-edema; F-necrosis; G-cambios degenerativos.

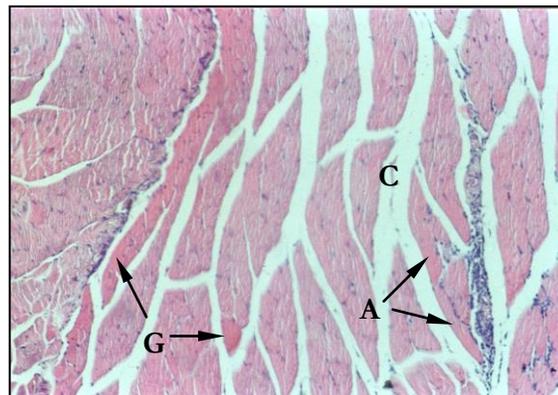


Figura 6: ratones C57BL/6, Día 7 p.i., músculo esquelético, aumento 10x: A-infiltración; C-edema; G-cambios degenerativos.

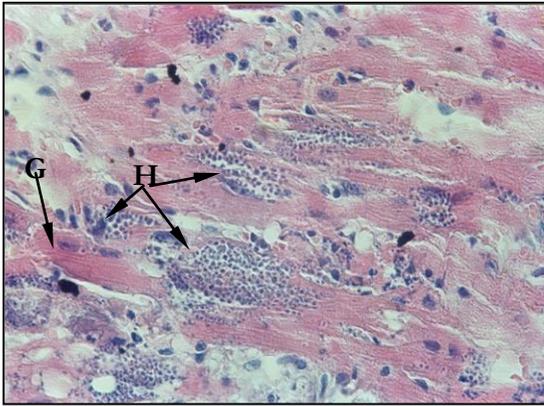


Figura 7: ratones ACA, día 17 p.i., músculo cardíaco, aumento 40x: G-cambios degenerativos; H-Pseudoquistes.

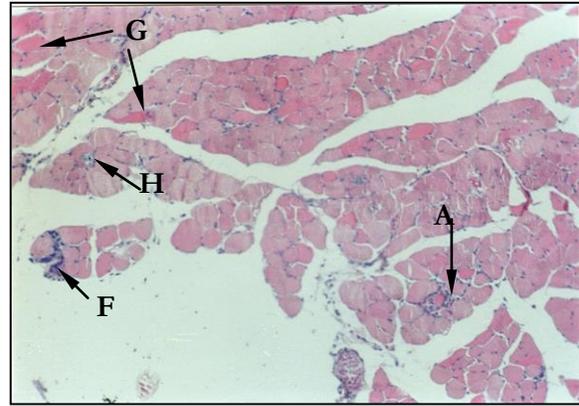


Figura 8: ratones ACA, día 17 p.i., músculo esquelético, aumento 10x: A- infiltración; F-necrosis; G-cambios degenerativos; H-pseudoquistes.

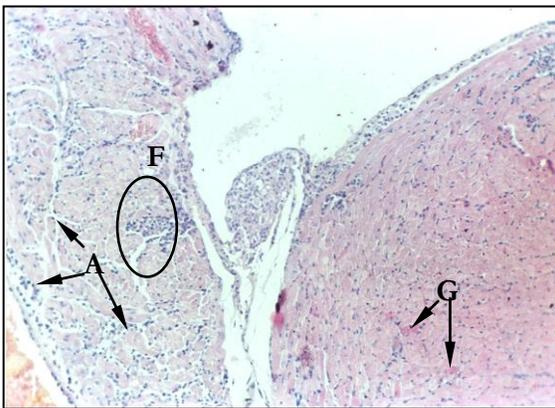


Figura 9: raton A.Sw, día 17 p.i., músculo cardíaco, aumento 10x: A-infiltración; F-necrosis; G-cambios degenerativos.

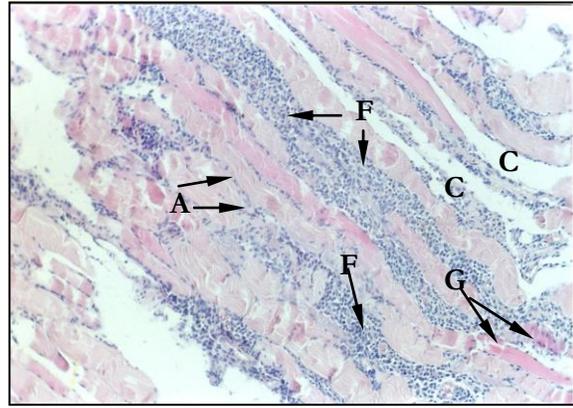


Figura 10: raton A.Sw, día 17 p.i., músculo esquelético, aumento 10x: A-infiltración; F-necrosis; c-edema; G-cambios degenerativos.

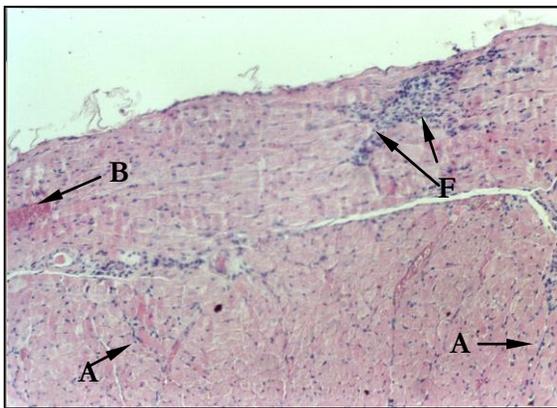


Figura 11: ratones C57BL/6, Día 17 p.i., músculo cardíaco, aumento 10x: A-infiltración; B-hiperemia; F-necrosis.

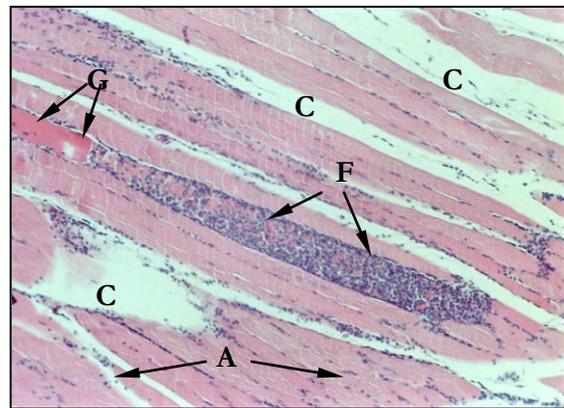


Figura 12: ratones C57BL/6, Día 17 p.i., músculo esquelético, aumento 10x: A-infiltración; C-edema; F-necrosis; G-cambios degenerativos.

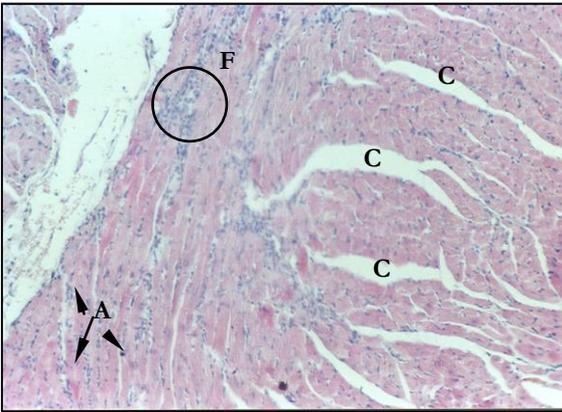


Figura 13: raton A.Sw, día 27 p.i., músculo cardíaco, aumento 10x: A-infiltración; C-edema; F-necrosis.

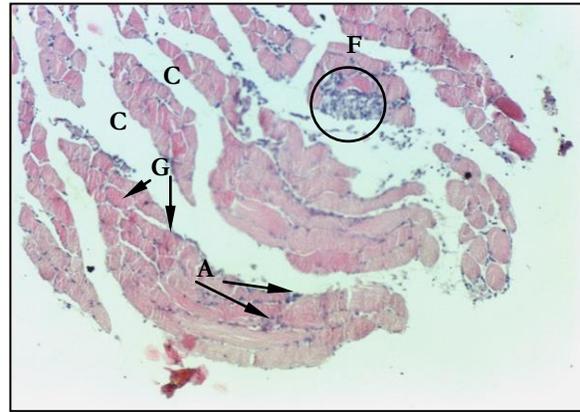


Figura 14: raton A.Sw, día 27 p.i., músculo esquelético, aumento 10x: A-infiltración; C-dema; F-necrosis; G-cambios degenerativos.

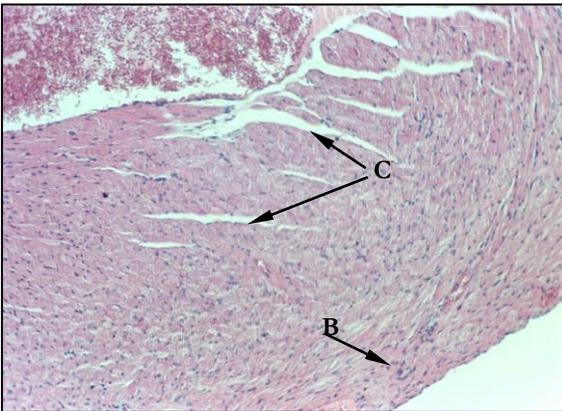


Figura 15: ratones C57BL/6, Día 27 p.i., músculo cardíaco, aumento 10x: B-hiperemia; C-edema.

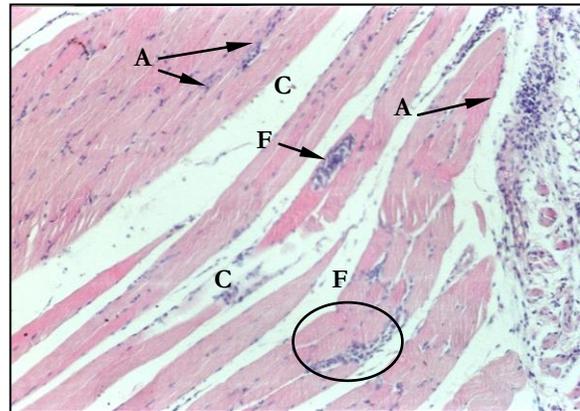


Figura 16: ratones C57BL/6, Día 27 p.i., músculo esquelético, aumento 10x: A-infiltración; C-edema; F-necrosis.

DISCUSIÓN

En esta memoria de título se analizó el desarrollo de la infección con el clon Dm 28c de *T. cruzi* en tres cepas puras de ratones, usando una carga inicial de infección de 2.000 parásitos.

En el presente trabajo, las cepas ACA y A.Sw de ratones se mostraron como susceptible y resistente, respectivamente, al infectar los animales con una dosis de 2.000 tripomastigotes sanguíneos del clon Dm 28c de *T. cruzi*. Trabajos previos (Juri *et al.*, 1990; Zúñiga *et al.*, 2002) mostraron que ratones de las cepas A.Sw y ACA se comportaron también como resistentes y susceptibles, respectivamente, a la infección con 10^4 tripomastigotes sanguíneos de la cepa Tulahuen de *T. cruzi*.

Las cepas A.Sw y ACA son congénicas, es decir, sólo difieren en el cromosoma 17, donde se ubica el Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) (Klein *et al.*, 1983). Se sabe que algunos genes MHC codifican para moléculas importantes en la activación de poblaciones de linfocitos T CD4 y CD8 (Vergara *et al.*, 2002), por lo tanto, una determinada combinación de genes MHC le permite al individuo comportarse como un alto o un bajo respondedor frente a un determinado antígeno. Probablemente los genes ligados al haplotipo H2^S de la cepa A.Sw le permiten un control más adecuado de la infección, cosa que no ocurriría en relación al haplotipo H2^f de la cepa ACA. Los resultados anteriores parecen demostrar que genes ubicados en este complejo génico son importantes para determinar el desarrollo de la infección con *T. cruzi*, al menos en el modelo murino.

Como se ha planteado, que la posible causa de muerte de los animales infectados con *T. cruzi* estaría relacionada con la aparición de fenómenos autoinmunes, inducidos por el parásito (Minoprio *et al.*, 1989), los mecanismos protectores podrían también estar relacionados con la no estimulación de esta autoinmunidad cruzada, lo que sería evidente en las cepas resistentes, considerando que las moléculas de presentación antigénica MHC, pueden presentar moléculas propias y extrañas (Vergara *et al.*, 2002).

La cepa C57BL/6 portadora del haplotipo H2^b, también se comportó como resistente a la infección. Otras cepas de ratones que comparten el haplotipo H2^b con la cepa C57BL/6, pero difieren en el resto de los cromosomas, como las cepas B10 y LP, se han descrito como resistentes a la infección con la cepa Tulahuen de *T. cruzi* (Juri *et al.*, 1990 ; Zúñiga, 1995) lo que estaría apoyando la importancia de determinados genes MHC involucrados en el fenómeno de resistencia a la infección con *T. cruzi*, en este caso ligados al haplotipo H2^b. Las cepas A.Sw y C57BL/6 no comparten el mismo haplotipo MHC, lo que nos indicaría que no es un solo tipo de combinación de genes la que estaría induciendo la resistencia a la infección con *T. cruzi*.

En la presente memoria, el clon Dm 28c de *T. cruzi* se comportó como altamente virulento para la cepa de ratón ACA y como no virulento para las cepas A.Sw y C57BL/6. El clon Dm 28c de *T. cruzi* fue originalmente clasificado como no virulento en ratones Balb/c (Contreras *et al.*, 1988) y en otro estudio, como medianamente virulento pues causaba la muerte sólo al 50% de los animales Balb/c infectados (Sanchez, 1992). Sin embargo, habría que considerar que los trabajos anteriores se realizaron utilizando parásitos obtenidos de cultivos axénicos (predominancia de formas epimastigotes), a diferencia de este

trabajo, en el cual se usaron tripomastigotes sanguíneos y esta diferencia podría ser relevante para determinar el desarrollo y grado de la infección.

De lo anteriormente desarrollado, se podría desprender que en relación a los conceptos de resistencia o susceptibilidad a la infección, no se puede generalizar, ya que estas características pueden depender de una amplia variedad de factores. Así, se podría entender más fácilmente porque una misma cepa de ratón puede ser resistente a varias cepas de *T. cruzi* y susceptible a otras. Habitualmente, el fenómeno de resistencia/susceptibilidad será efectivo sólo en relación a una cepa de ratón y a una cepa de parásito en particular.

Al considerar los niveles máximos de parasitemia alcanzados y comparar lo obtenido con la cepa susceptible ACA ($2,5 \times 10^6$ parásitos/ml.) con lo obtenido con la cepa resistente C57BL/6 ($4,5 \times 10^5$ parásitos/ml.) se podría deducir que el fenómeno de resistencia está asociado al menor número de parásitos circulantes en el individuo. Sin embargo, la cepa A.Sw, también resistente presentó un nivel máximo de parasitemia ($2,2 \times 10^6$ parásitos/ml.) muy semejante a la cepa susceptible. Estos resultados parecen apoyar la idea que no existe una relación directa entre los niveles de parasitemia alcanzados y la susceptibilidad o resistencia a la infección, coincidiendo con lo informado por otros autores (Minoprio *et al.*, 1989; Russo *et al.*, 1989).

En algunas situaciones las cepas de ratones resistentes pueden desarrollar niveles de parasitemia mucho más altos que los alcanzados por las cepas susceptibles a una misma cepa de parásito (Zúñiga, 1995; Zúñiga *et al.*, 1998;

Zúñiga *et al.*, 2002) e incluso ratones infectados con *T. rangeli*, tripanosoma no virulento, pueden alcanzar niveles de parasitemia más altos que al ser infectados con una cepa virulenta de *T. cruzi* (Zúñiga *et al.*, 1997c). Por lo tanto, al parecer, los niveles de parásitos circulantes son sólo un parámetro más a considerar en la infección con *T. cruzi*, pero no parece ser determinante en la muerte o sobrevivencia del individuo infectado (Minoprio *et al.*, 1989). Lo anterior indicaría que no es el nivel de parasitemia lo que desencadena los mecanismos que terminan con la vida del individuo susceptible, sino más bien, sería la presencia del parásito la que estimularía la aparición de mecanismos, probablemente autoinmunes, que terminan con la vida del individuo.

Al analizar los resultados de la histopatología se puede ver que en las muestras de corazón, músculo estriado esquelético e intestino, las tres cepas de ratones presentaron lesiones de distinta consideración, tanto en las cepas resistentes como en la cepa susceptible, esto indica, que a pesar que las cepas A.Sw y C57BL/6 se comportaron como resistentes, también presentan lesiones a nivel tisular (Zúñiga *et al.*, 1998) y que la diferencia estaría en que las cepas resistentes son capaces de recuperarse paulatinamente mientras que las cepas susceptibles, luego de desencadenar determinados fenómenos no bien determinados, avanzan inexorablemente hacia la muerte. Al analizar la cepa ACA por separado, se puede observar una tendencia al aumento en la magnitud de las lesiones en el día 17 p.i., lo que también se puede observar en las otras dos cepas, pero con la diferencia, que la tendencia cambia en el día 27 p.i., en donde las cepas resistentes disminuye la severidad de las lesiones en casi todos sus parámetros, lo que indicaría la capacidad de recuperación de las cepas resistentes luego de pasada las etapas más graves de la enfermedad.

En el miocardio se pudo observar que las tres cepas presentaron alteraciones de diversa magnitud y sólo se encontró fibrosis leve en algunos de los individuos y en poca cantidad, esto se debería a que las muestras obtenidas son de la etapa aguda de la enfermedad y la reparación se presentaría en estadios más crónicos. Sólo en la cepa ACA, en el día 17 p.i., se observaron pseudoquistes, y en gran cantidad, esta es la diferencia más notable entre las tres cepas comparadas, esto se debería probablemente a una posible deficiencia en la respuesta inmune humoral de las cepas susceptibles (Araujo, 1986; Alves *et al.*, 1986), las cuales al no poder eliminar inicialmente los parásitos circulantes, lleva a que estos tengan más tiempo para poder infectar un mayor número de células y formar pseudoquistes.

Al analizar la histopatología del músculo estriado esquelético se pudo observar la presencia de pseudoquistes sólo en el día 17 p.i., tanto en las cepas ACA como C57BL/6, aunque en menor número en comparación a los encontrados en miocardio, de todas maneras estos resultados indican una preferencia del parásito por tejido muscular.

En intestino no se encontraron mayores alteraciones, esto se podría deber a que las muestras obtenidas en nuestro trabajo fueron de intestino delgado, lo que coincidiría con lo descrito en otros trabajos, que aunque el daño durante la infección afectaría todo el tracto digestivo, estas lesiones serían más evidentes en el intestino grueso y recto (Aragort *et al.*, 2000).

Finalmente, al comparar los distintos tejidos se puede observar que el clon Dm 28c de *T. cruzi* produce lesiones con mucha más intensidad en miocardio. Esto estaría en relación a lo descrito en otros trabajos que indican que *T. cruzi*

presenta tropismo por determinado tipo de tejido dependiendo de la cepa de parásito que se esté evaluando (Aragort *et al.*, 2000). También se puede inferir, que la ausencia de pseudoquistes a nivel tisular no implica ausencia de daño en el tejido, esto dado porque como se mencionó anteriormente, al parecer, basta un pequeño número de parásitos para inducir los fenómenos de daño tisular, probablemente en relación a la inducción de mecanismos autoinmunes. Estos fenómenos autoinmunes podrían estar inducidos por a) una reacción cruzada entre epitopos del parásito y determinantes propios del hospedero (mimetismo molecular); b) exposición de determinantes propios secuestrados y expuestos debido al daño tisular; c) exacerbación en la activación y cooperación linfocitaria, llevando a la estimulación de células autoreactivas que han escapado a la delección clonal central (Minoprio *et al.*, 1989; Brener y Gazzinelli, 1997).

CONCLUSIONES

- Las cepas A.Sw y C57BL/6 se comportaron como resistentes y la cepa ACA como susceptible a la infección con 2.000 tripomastigotes sanguíneos del clon Dm 28c de *T. cruzi*
- El clon Dm 28c de *T. cruzi* se comportó como altamente virulento sólo al infectar ratones de la cepa ACA
- El nivel de parasitemia alcanzado por los animales infectados no siempre se relaciona con la susceptibilidad o resistencia a la infección con *T. cruzi*
- El haplotipo MHC de cada cepa de ratón determinaría la susceptibilidad o resistencia frente a la infección con *T. cruzi*.
- Los ratones portadores del haplotipo H2^f se comportaron como susceptibles y los ratones que portaban los haplotipos H2^b y H2^s como resistentes, a la infección con 2.000 tripomastigotes sanguíneos del clon Dm 28c de *T. cruzi*.
- En este modelo experimental, el clon Dm 28c de *T. cruzi* mostró un tropismo preferencial por músculo cardíaco. El que se manifestó con un mayor daño y gran presencia de pseudoquistes.

BIBLIOGRAFIA

- **Acuña, M.** 2002. La vinchuca silvestre : ¿ Una amenaza latente ?. Tecnovet 2 : 14 – 18.

- **Aguilera, X.; Apt, W.; Reyes, H.; Sandoval, J.; Salgado, R.; Carranza, G.; Figueras, E.; Reyes, J.; Corral, E.** 1988. Enfermedad de Chagas congénita : Estudio prospectivo de dos localidades hiperendémicas de la IV Región de Chile. Parasitol. al Día 12 : 19 – 25.

- **Alves, M.J.; Albuin, G.; Kuwajima, V.; Colli, W.** 1986. Partial inhibition of trypomastigote entry into cultured mammalian cells by monoclonal antibodies against surface glycoprotein of *Trypanosoma cruzi*. Mol. Biochem. Parasitol. 21: 75-82.

- **Apt, W.; Reyes, H.** 1986. Aspectos epidemiológicos de la enfermedad de Chagas en Chile. Parasitol. al Día 10 : 94 – 101.

- **Aragot de Rossell, R.; , Rodríguez, A. M.; , De Jesús, R.** 2000 . Tripomastigotes de sangre y de cultivo celular de *Trypanosoma cruzi* Y. II.- Patología de la enfermedad de Chagas en ratones Balb/c. Parasitol. al Día 3-4 : 79-87

- **Araujo. F.G.** 1986. Analysis of *Trypanosoma cruzi* antigens bound by specific antibodies and by antibodies to related trypanosomatids. Infect. Immun. 53: 179-183.

- **Arias, A.; Ferro, E.** 1988. Quantification of *Trypanosoma cruzi* parasitemia by direct micromethod. Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg. 82 : 248.

- **Atías, A.; Apt, W.** 1991. Enfermedad de Chagas. En : Parasitología Clínica. 3ª edición. Ed. Mediterráneo, Santiago. pp 255 – 268.

- **Basombrío, M.; Arredes, H.; Uncos, D.; Rossi, R.; Alvarez, E.** 1987. Field trial of vaccination against american tripanosomiasis (Chagas disease) in american Guinea pigs. Am. J. Trop. Med. Hyg. 37 : 57 – 62.

- **Basombrío, M.; Schofield, C.; Rojas, C.; Del Rey, E.** 1998. A cost-benefit analysis of Chagas disease control in North-West Argentina. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 92 : 137 – 143.

- **Botero, D.; Restrepo, P.** 1992. Parasitosis Humanas. Ed. Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB). Medellín , Colombia. pp 191 – 206.

- **Brener, Z. ; Gazzinelli, R.** 1997. Immunological control of *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas' disease. Int.Arch.Allergy Immunol. 114 : 103 – 110.

- **Burleigh, B.; Andrews, N.** 1995. The mechanism of *Trypanosoma cruzi* invasion of mammalian cells. Ann. Rev. Microbiol. 49 : 175 – 20

- **Canals, M.; Cattán, P.** 1992. Dynamics of Chagas infection transmission in Chile : model and simulation. Rev. Med. Chile 120 : 1359 – 1365.

- **Canals, M.; Solís, R.; Tapia, C.; Ehrenfeld, M.; Cattan, P.** 1999. Comparison of some behavioral and physiological feeding parameters of *Triatoma infestans*, Klug 1834, and *Mepraia spinolai*, Porter 1934 vectors of Chagas disease in Chile. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 5 : 687 – 692

- **Contreras, V.; Araujo-Jorge, T.; Bonaldo, M.; Thomaz, N.; Barbosa, H.; Meirelles, M.; Goldenberg, S.** 1988. Biological aspects of the Dm 28c clone of *Trypanosoma cruzi* after metacyclogenesis in chemically defined media. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 83 : 123 – 133.

- **Coura, J.; Junqueira, A.; Fernandes, O.; Valente, S.; Miles, M.** 2002. Emerging Chagas disease in Amazonian Brasil. Trends Parasitol. 18 : 171 – 176.

- **De Lana, M.; Chiari, E.; Tafuri, W.** 1992. Experimental Chagas disease in dogs. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 87 : 59 – 71.

- **Dias, J.; Silveira, A.; Schofield, A.** 2002. The impact of Chagas disease control in Latin America – A Review. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 97 : 603 – 612.

- **Diotaiuti, L.; Pereira, A. ; Loiola, C. ; Fernandes, A. ; Schofield, C. ; Dujardin, J.; Dias, J.; Chiari, E.** 1995. Interrelation of sylvatic and domestic transmission of *Trypanosoma cruzi* in areas with and without domestic vectorial transmission in Minas Gerais, Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 90 : 443 – 448.

- **Fernandes, A.; Vitor, R.; Dias, J.** 1994. Avaliação parasitológica e sorológica de caprinos inoculados experimentalmente pelo *Trypanosoma cruzi*. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo 36 : 11 – 17.

- **Frías, D.; Henry, A.; Gonzalez, C.** 1998. *Mepraia gajardoi* : a new species of Triatomidae (Hemiptera : Reduviidae) from Chile and its comparison with *Mepraia spinolai*. Rev. Chile Hist. Nat. 71 : 178 – 188.

- **Juri, M. ; Ferreira, A.; Ramos, A.; Hoecker, G.** 1990. Non-lytic antibodies in H-2 controlled resistance to acute infection with *Trypanosoma cruzi* . Braz.J.Med. Biol. Res. 23 : 685 – 695.

- **Klein, J.; Figueroa, F.; David, C.** 1983. H -2 haplotypes. Genes and antigens. Second listing. Immunogenetics 17 : 553 – 596.

- **López, M.; Leyton, C.; Graf, M.** 1982. Técnicas de Histología y Citología. 2ª edición. Depto. Biología celular y Genética. Facultad de Medicina, Universidad de Chile. pp 242 – 243.

- **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.

- **Montenegro, V.; Jimenez, M.; Pinto-Dias, J.; Zeledón, R.** 2002. Chagas disease in dogs from endemic areas of Costa Rica. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 97 : 491 – 494.

- **Muñoz, P.; Bergen, A.; Alvarez, P.; Atías, A.** 1990. Un caso de enfermedad de Chagas congénita de curso fatal e importancia del estudio del grupo familiar. Parasitol. al Día 14 : 41 – 45.

- **Paláu, M. T. ; Mejía, J. ; Vergara, U. ; Zúñiga, C.** 2003. Action of *Trypanosoma rangeli* in infections with virulent *Trypanosoma cruzi* populations. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 4 : 543 – 548.

- **Ramirez, L.; Brener, Z.** 1987. Evaluation of the rabbits as model for Chagas disease. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 82 : 531 – 536.

- **Revelli, S.; Moreno, H.; Berra, H.; Velenti, J.; Nocito, A.; Amerio, N.; Morini, J.** 1985. Efectos de extractos ricos en ARN inmune sobre algunos parámetros inmunopatológicos de ratas infectadas con *Trypanosoma cruzi*. Bol. Chil. Parasitol. 40 : 51 – 57.

- **Rosner, J. ; Schinini, A. ; Rovira, T. ; De Arias, A. ; Velasquez, G. ; Monzon, M.; Maldonado, M.; Ferro, E., Galeano, R.** 1998. Acute Chagas disease in non human primates. Parasitemia and immunological parameters in the *Cebus apella* monkey. Trop Med Parasit 39 : 51 – 55.

- **Russo, M.; Starovinas, N.; Ribeiro dos Santos, R.; Minoprio, P.; Eisen, H.; Hontebeyrie-Joskowicz, M.** 1989. Susceptible mice present higher macrophage activation than resistant mice during infection with myotropic strains of *Trypanosoma cruzi*. *Parasite Immunol.* 11 : 385 – 389.

- **Sanchez, G.** 1992. Estudio de la variabilidad en poblaciones y clones de *Trypanosoma cruzi* por criterios biológicos , inmunológicos y bioquímicos. Tesis para optar al Grado de Doctor en Ciencias, Mención Biología. Facultad de Ciencias, Universidad de Chile. pp 3 – 8.

- **Schenone, H.; Rojas, A.** 1989. Algunos datos y observaciones pragmáticas en la epidemiología de la enfermedad de Chagas. *Bol. Chil Parasitol* 44 :66 – 86.

- **Schmunis, G.** 1994. American trypanosomiasis as a public health problem. En : Chagas' disease and the nervous system. Ed. Pan American Health Organization. Washington, D.C., U.S.A. pp 3 – 29.

- **Schofield, C.** 2000. *Trypanosoma cruzi* – the vector – parasite paradox. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 4 : 535 – 544.

- **Stevens, J.; Noyes, H.; Schofield, C.; Gibson, W.** 2001. The molecular evolution of Trypanosomatidae. *Adv. Parasitol.* 48 : 1 – 53.

- **Texeira, A.; Sadi, P.; Rebelo, E.; Algarañaz, D.; Vieira, L., Laura-Pires, L.; Nascimento, R.; Vexenant, A.; Silva, A.; Ault, S.; Costa, J.** 2001. Emerging Chagas disease : trophic network and cycle of transmission of *Trypanosoma cruzi* from palm threes in the Amazon. *Emerg. Infect. Dis.* 1 : 100 – 112.

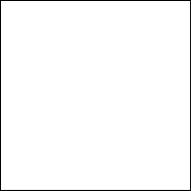
- **Trischmann, T.; Bloom, B.** 1982. Genetics of murine resistance to *Trypanosoma cruzi*. *Infect. Immun.* 35 : 546 – 551.

- **Vergara, U.; Palomo, I.; Zúñiga, C.; Navarrete, C.** 2002. Complejo Principal de Histocompatibilidad. En : *Fundamentos de Inmunología Básica y Clínica*. Ed. Universidad de Talca, Chile. pp 167 – 178.

- **World Bank.** 1993. *World development report 1993. Investing in Health*. Oxford University Press, New York, U.S.A. pp 329.

- **Wrightsmann, 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.

- **Zúñiga, C.** 1995. Evolución de la respuesta inmune en ratones infectados experimentalmente con *Trypanosoma cruzi*. Tesis entregada para optar al Grado de Magister en Ciencias Biológicas, Mención Inmunología. Facultad de Medicina, Universidad de Chile. pp 46 – 53.

- 
- **Zúñiga , C. ; Vargas , R. ; Courcelles , T. ; Vergara , U.** 1997a. Infección experimental con *Trypanosoma cruzi* en machos y hembras de tres cepas de ratones. Parasitol. al Día 21 : 85 – 91.

 - **Zúñiga, C.; Paláu, M.T.; Penin, P.; Gamallo, C.; De Diego, J.A.** 1997b. *Trypanosoma rangeli* : increase in virulence with inocula of different origins in the experimental infection in mice. Parasitol. Res. 83 : 797 – 800.

 - **Zúñiga, C.; Paláu, M.T.; Penin, P.; Gamallo, C.; De Diego, J.A.** 1997c. Protective effect of *Trypanosoma rangeli* against infections with a highly virulent strain of *Trypanosoma cruzi*. Trop. Med. Int. Health 5 : 482 – 487.

 - **Zúñiga, C.; Parra, A.; Vela, H.; Courcelles, T.; Vargas, R.; Vergara, U.** 1998. Estudio histopatológico en ratones infectados experimentalmente con *Trypanosoma cruzi*. Parasitol. al 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.