



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



“INFLUENCIA DE LA EDAD DEL HOSPEDERO EN LA
EVOLUCIÓN DE LA INFECCIÓN EXPERIMENTAL CON
Trypanosoma cruzi EN UN MODELO MURINO”

NICOLÁS MARCELO BINDER VERGARA

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

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

SANTIAGO- CHILE
2011

**“INFLUENCIA DE LA EDAD DEL HOSPEDERO EN LA EVOLUCIÓN
DE LA INFECCIÓN EXPERIMENTAL CON *Trypanosoma cruzi* EN UN
MODELO MURINO”**

**"INFLUENCE OF THE HOST AGE IN THE EVOLUTION OF EXPERIMENTAL
INFECTION WITH *Trypanosoma cruzi* IN A MURINE MODEL"**

NICOLÁS MARCELO BINDER VERGARA

Unidad de Inmunología, Departamento de Medicina Preventiva Animal

RESUMEN

Se infectaron dos grupos de ratones de la cepa Balb/c, de dos y ocho meses de edad con 2000 tripomastigotes sanguíneos del clon Dm28c de *Trypanosoma cruzi*. Los resultados mostraron que este modelo, una vez transcurrido los 4 meses post infección, provoca un 100% y 60% de mortalidad en los ratones de dos y ocho meses de edad, respectivamente. El nivel máximo de parasitemia alcanzado por el grupo de mayor edad fue de $3,2 \times 10^5$ parásitos/mL, mientras que la máxima parasitemia en los ratones de menor edad fue de $5,1 \times 10^5$ parásitos/mL. A nivel histopatológico en los ratones de ocho meses las mayores alteraciones se localizaron en tejido cardíaco, y se observó que al transcurrir el tiempo de infección, en estas lesiones se inducían fenómenos de reparación. Por otro lado, en los ratones de dos meses las mayores alteraciones se ubican en músculo esquelético y no se observó ningún tipo de reparación en el tejido dañado.

Estas diferencias observadas dentro de una misma cepa de ratón nos indica que la edad sería un factor importante en el desarrollo de la infección con *T. cruzi*, puesto que se ha postulado que la muerte del animal sería el resultado de la activación de mecanismos autoinmunes y probablemente al disminuir la efectividad del sistema inmune con la edad, se favorecería la supervivencia de los animales infectados de mayor edad.

Palabras claves: *Trypanosoma cruzi*, histopatología, edad.

ABSTRACT

Two Balb/c strain mice groups were infected, of two and eight months old, with 2000 blood trypomastigotes of Dm28c clon of *Trypanosoma cruzi*. The results showed that this infection model, after expiry of 4 months post infection, causes 100% mortality in two month mice and 60 % in of 8 month mice. Maximum parasitemia level reached by the group of older mice was $3,2 \times 10^5$ parasites/mL, while maximum level reached by the group of younger mice was $5,1 \times 10^5$ parasites/mL. At a histopathological level in eight month mice, major alterations were found in heart tissue and it was found that while infection progressed, repair events were induced in the injures . On the other hand, in two month mice, the biggest changes were found in skeletal muscle and there was no repair found in any damaged tissue.

These differences within a singular mice strain, indicate that age would be an important factor in the development of *T. cruzi* infection, since it has been indicated that the death of the animal would be the result of the activation of autoimmune mechanisms, and also probably, because of the decreased effectiveness of the immune system within age, would favor the survival of older infected animals.

Key words: *Trypanosoma cruzi*, histopathology, age.

INTRODUCCIÓN

El parásito *Trypanosoma cruzi* causa la enfermedad de Chagas en el humano, un síndrome incurable que afecta a millones de personas en Latinoamérica. La enfermedad de Chagas es una zoonosis de amplia distribución geográfica en América Latina, constituyendo un serio problema de salud pública, principalmente en Brasil, Colombia, Venezuela, Chile, Argentina, Uruguay, Bolivia, Perú, México y algunos países de Centro América (10).

Este parásito se transmite a los seres humanos y también a una gran cantidad de animales domésticos y mamíferos silvestres (principalmente roedores). El ciclo biológico de *T. cruzi* es bastante complejo, pues posee distintos estadios de desarrollo, en vectores hematófagos y hospederos vertebrados como el hombre, animales domésticos y especies silvestres que pueden actuar como reservorios (13).

Agente Etiológico.

T. cruzi pertenece al orden 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, el género es *Trypanosoma* y la especie *cruzi* (30).

Vía de transmisión.

La principal vía de transmisión del parásito a los mamíferos es mediante insectos hematófagos del orden Hemiptera, familia Reduvidae, subfamilia Triatominae, que incluye a los géneros *Rhodnius*, *Triatoma* y *Panstrongylus*, que al igual que *T. cruzi* sólo existen en América (4). Las especies de insectos vectores varían en importancia epidemiológica en los diferentes países donde existe la enfermedad (27).

En Chile, en los años 90 *Triatoma infestans* era el principal vector, por sus hábitos domésticos y una considerable proporción de insectos infectados (6), sin embargo los programas de erradicación domiciliaria de este insecto permitieron disminuir su importancia epidemiológica. Además, en Chile también se describe la presencia de *Mepraia spinolai* y *Mepraia gajardoi*, vectores de características silvestres de *T. cruzi* que por varios años se les ha dado una baja importancia en la transmisión de la enfermedad. Esto por no tener un contacto cercano con las viviendas humanas, pero al ser erradicado el vector doméstico, queda libre un nicho ecológico para los vectores silvestres (7). Esta enfermedad también puede transmitirse a

través de transfusiones de sangre, de madres a hijos durante el embarazo, o con menos frecuencia, a través de trasplantes de órganos o alimentos contaminados (22) (29).

Ciclo biológico.

Un insecto infectante es aquel que contiene en su digestivo a los tripomastigotes metacíclicos, cuando el insecto se alimenta en un hospedero defeca, depositando en las deyecciones las formas infectantes del parásito, de esta manera ingresa al hospedero a través de la piel lesionada o por mucosas a nivel ocular, nasal o bucal (20). Los tripomastigotes metacíclicos al entrar a las células del hospedero se transforman en amastigotes, éstos se multiplican y salen de la célula a la circulación sanguínea diferenciados como tripomastigotes sanguíneos, pudiendo este estadio infectar nuevas células. Un insecto sano se transforma en portador de la enfermedad al alimentarse desde un hospedero infectado, donde ingiere los tripomastigotes, estos pasan al tubo digestivo anterior como epimastigotes y se multiplican, finalmente llegan a digestivo posterior como tripomastigotes metacíclicos, quedando como portador de la enfermedad (4).

Patología.

Esta parasitosis se desarrolla en tres fases definidas: Aguda: que se presenta con fiebre, dolor de cabeza, aumento de tamaño de linfonodos, hígado y bazo. Latente: sin presentación clínica debido a que la reacción inmunológica del hospedero logra controlar la reproducción del parásito. Crónica: en la que se presentan alteraciones de diversos órganos, particularmente en el corazón y tubo digestivo (11). La enfermedad de Chagas se caracteriza por presentarse en la fase aguda como asintomática y solo el 20% a 25% de las personas infectadas tienen manifestaciones clínicas (33). En el ratón, la fase aguda es semejante al humano con la diferencia que en muchas cepas de ratones esta fase termina con la muerte del animal (39).

Diagnóstico.

El diagnóstico de la enfermedad se puede realizar a través de métodos directos como la detección de tripomastigotes sanguíneos circulantes (parasitemia) en una muestra de sangre fresca o en biopsias de tejidos donde se pueden detectar la presencia de nidos de amastigotes, siendo este método independiente de la parasitemia, a través de xenodiagnóstico y detección del DNA entre otros, y por métodos indirectos a través de pruebas serológicas (3).

Respuesta inmune frente a la infección.

Como *T. cruzi* en la fase aguda de la infección se encuentra dentro y fuera de las células el sistema inmune requiere la participación de distintas poblaciones celulares, tales como monocitos, macrófagos, células NK y linfocitos T y B (1). A lo largo de la infección aguda hay una amplia estimulación del sistema inmune con una importante activación policlonal de linfocitos periféricos. En la fase temprana de la respuesta inmune la infección es limitada o contenida por mecanismos innatos que mayormente están a cargo de los monocitos de sangre periférica y por los macrófagos residentes en los tejidos (8). Si el agente patógeno logra sobrepasar esta primera línea de defensa, se estimulan mecanismos adquiridos a cargo de linfocitos T y B, células específicas que cooperan con los macrófagos en el foco inflamatorio para resolver la infección (1).

Los mecanismos de patogenicidad de *T. cruzi* aún no son bien comprendidos, se sabe que la respuesta inmune humoral juega un rol muy importante en la resistencia y eliminación de los parásitos de circulación y que algunos epitopos del parásito pueden desarrollar una reacción cruzada con antígenos propios del hospedero, desencadenando un proceso autoinmune (21), es decir, una reacción inmune hacia antígenos propios que causan inflamación del tejido o daño celular. La autoinmunidad se da cuando fallan los mecanismos responsables de mantener la tolerancia inmunológica hacia los antígenos propios (1).

Estos mecanismos autoinmunes podrían estar inducidos por a) mimetismo molecular, donde los péptidos derivados de *T. cruzi* se asemejan a los péptidos del hospedero e inician una respuesta de células T con reacción cruzada que lleva a la activación de células T autorreactivas (12); b) exacerbación en la activación linfocitaria, resultante de una liberación significativa de antígenos propios debida a la miocitólisis mediada por el parásito (17); c) exposición de determinantes propios secuestrados y expuestos debido al daño tisular; los factores inflamatorios producen alteración en el procesamiento y presentación de los antígenos propios llevando a la estimulación de células autoreactivas (19) (5).

Modelos Biológicos.

En condiciones naturales, en el continente americano *T. cruzi* es capaz de infectar a numerosas especies de mamíferos tanto domésticos como silvestres (31). El modelo murino, es el más utilizado para el estudio de la inmunidad tanto celular como humoral ante la infección experimental con *T. cruzi*. 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 supervivencia de los animales infectados (36) (38). Se

ha descrito la influencia de varios factores tanto dependientes del hospedero como del parásito que influyen en el desarrollo de la infección, como factores genéticos, el sexo, la edad del hospedero, la dosis de inoculo inicial y la cepa de parásito, aunque la influencia de algunas de estas características no están muy bien determinadas (32).

En el presente trabajo se analizó la influencia de uno de los factores dependiente del hospedero, como es la edad del individuo infectado y se analizó si existían diferencias en la prepatencia, niveles de parasitemia, mortalidad y alteraciones histopatológicas a nivel de corazón y músculo esquelético en dos grupos etarios de ratones.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Cepa de parásitos

Las infecciones experimentales se llevaron a cabo utilizando tripomastigotes sanguíneos del clon Dm28c de *T. cruzi* (9). Esta cepa de parásito es mantenida *in vivo* en el bioterio de la Unidad de Inmunología de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile.

2. Ratones

Se utilizaron dos grupos de 13 ratones machos de la cepa Balb/c, clínicamente sanos. Un grupo de 2 meses y otro de 8 meses de edad. De cada grupo, 10 ratones se destinaron para el estudio de la prepatencia, niveles de parasitemia y mortalidad, y 3 ratones para el estudio histopatológico. Todos los ratones fueron mantenidos en igualdad de condiciones, con control de temperatura, agua, alimentación, luz y humedad. Esta cepa de ratón proviene originalmente del Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, U.S.A

3. Modelo de infección

Para la obtención de parásitos, se extrajo 0,6 mL de sangre mediante punción cardíaca de un ratón Balb/c infectado con el clon Dm28c, que fue sacrificado 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 de 10 μ L de sangre infectada en 490 μ L de 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 2000 parásitos en 0,2 mL que fue la cantidad inoculada intraperitoneal a cada ratón (39).

4. Estudio de Parasitemia

Los animales infectados se sangraron a partir del tercer día postinfección (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. Luego cada muestra fue centrifugada a 700 g por 5 minutos, dejándolo reposar por 30 minutos en estufa a 37°C y luego se midió el volumen de sangre en cada tubo. Finalmente la fracción leucoplaquetaria de cada muestra se colocó en un portaobjeto y se contaron los 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 Arias y Ferro (2).

5. Estudio histopatológico

Se sacrificó un ratón de cada grupo el día 13, 23 y 33 p.i., la elección del ratón a sacrificar fue bajo el criterio de máxima parasitemia 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 leucocitario; (++) Lesiones moderadas, con infiltrado leucocitario, hiperemia; (+++) Lesiones severas, con gran infiltración leucocitaria, hiperemia, y edema (39).

El número de parásitos intracelulares se evaluó en 10 campos microscópicos de cada corte de tejido, examinados con aumento de 600X y se representó de la siguiente manera: (-) Negativo, ausencia de células parasitadas (pseudoquistes); (+) Leve, presencia de 1-5 células infectadas, (++) Moderado, presencia de 6-10 pseudoquistes; (+++) Severo, presencia de 11 o más pseudoquistes (39).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Parasitemia.

En el gráfico N° 1 se muestra la evolución de la infección a través de los niveles de parasitemia en dos grupos etarios de ratones de la cepa Balb/c, A (8 meses) y B (2 meses) infectados aproximadamente con 2000 tripomastigotes sanguíneos del clon Dm28c de *T. cruzi*. Respecto al periodo de prepatencia visto en sangre, no hubo diferencia, siendo de 5 días para cada grupo, sin embargo al inicio de la infección el grupo de animales de mayor edad presentó niveles más altos. En relación a los niveles máximos de parasitemia, para el grupo de ratones de 8 meses fue entre el séptimo y decimo día p.i. con $3,2 \times 10^5$ parásitos/mL, a diferencia del grupo de 2 meses, donde la máxima parasitemia se alcanzó el día catorce p.i., con $5,1 \times 10^5$ parásitos/mL. En cuanto a la duración de la parasitemia no se observaron grandes diferencias pues en el grupo de ratones de mayor edad la parasitemia fue negativa el día 21 p.i. y en el de menor edad el día 19.

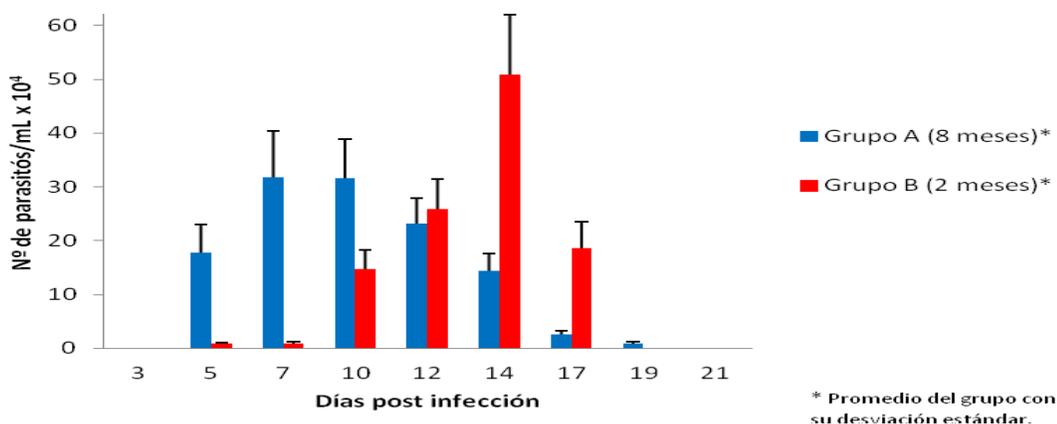


Gráfico N°1. Niveles de parasitemia de dos grupos etarios de ratones Balb/c A (8 meses) y B (2 meses), infectados con 2000 tripomastigotes sanguíneos del clon Dm28c de *T. cruzi*.

Mortalidad.

Como todos los ratones fueron infectados, se utilizó la muerte o supervivencia como criterio para determinar la susceptibilidad o resistencia del grupo de ratones frente a la infección. El gráfico N° 2 muestra el porcentaje de mortalidad para ambos grupos y se puede observar que el grupo de 2 meses presentó un 50% de mortalidad acumulada al día 15 p.i., mientras que el grupo de ratones de 8 meses sólo presentó un 10% de mortalidad en el mismo día. Al día 40 p.i. el grupo de menor edad presentó un 100% de mortalidad y el grupo de mayor edad un 60% el mismo día p.i. El 40% de los ratones de 8 meses sobrevivió pasados los tres meses p.i.

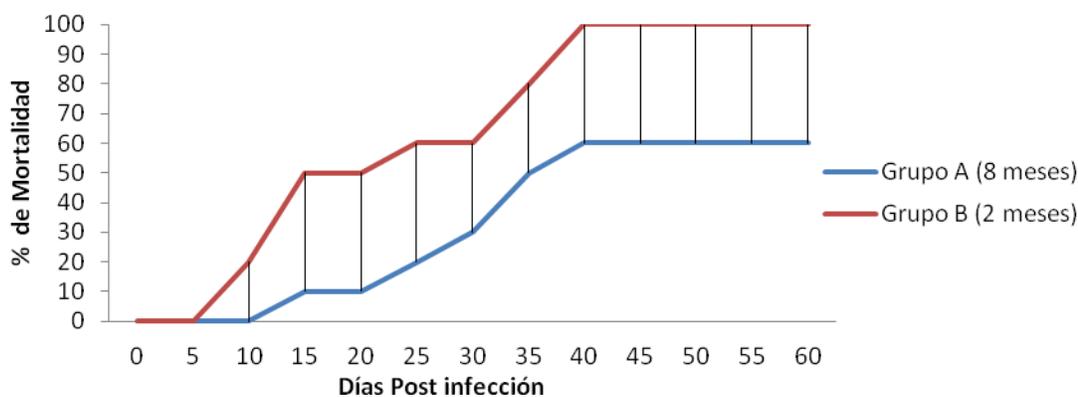


Gráfico N° 2. Mortalidad acumulada de dos grupos etarios de ratones A (8 meses) y B (2 meses), infectados con 2000 tripomastigotes sanguíneos de *T. cruzi*, medida como porcentaje en días post infección.

Estudio Histopatológico.

El efecto de la infección con *T. cruzi* fue evaluado comparando las lesiones histopatológicas de corazón y músculo esquelético en 3 ratones de cada grupo, sacrificados a los 13, 23 y 33 días p.i. (Tabla 1). Las principales lesiones inflamatorias fueron en músculo esquelético, con aumento progresivo en la inflamación y necrosis en los ratones de menor edad y una paulatina recuperación en los ratones de mayor edad. Las lesiones parasitarias en ambos grupos fueron en el tejido cardiaco, donde se observaron pseudoquistes al inicio de la infección, pero con un número considerablemente mayor en el grupo de 8 meses de edad.

Tabla 1. Estudio histopatológico de ratones Balb/c infectados con 2000 tripomastigotes sanguíneos del clon Dm28c de *T. cruzi*.

Grupo	Tejido	Lesión	Días* 13 p.i.	23 p.i.	33 p.i.
Ratones 8 meses edad	Corazón	Inflamación	+	++	+
		Pseudoquistes ⁽¹⁾	11	6	-
		Necrosis	-	-	-
	Músculo	Inflamación	-	++	+
		Pseudoquistes	-	-	-
		Necrosis	-	-	+
Ratones 2 meses edad	Corazón	Inflamación	+	+	+
		Pseudoquistes	2	-	-
		Necrosis	-	-	-
	Músculo	Inflamación	+	+++	+++
		Pseudoquistes	-	-	-
		Necrosis	-	+	+++

* Se sacrificó un ratón de cada grupo etario, a los 13, 23 y 33 días post infección

(-): Tejido preservado (++) : Lesiones moderadas (1) Número de Pseudoquistes o Células infectadas
(+) : Lesiones mínimas (+++) : Lesiones severas

El día 13 p.i., en el ratón de 8 meses de edad, a nivel de músculo cardiaco, se observaron lesiones inflamatorias de tipo mononuclear y lesiones no inflamatorias (pseudoquiste) multifocales de distribución al azar, algunos de formas redondeadas y otras alargadas (Figura 1). En el ratón de 2 meses también se observaron pseudoquistes, pero en menor cantidad y además un leve proceso inflamatorio (Figura 2).

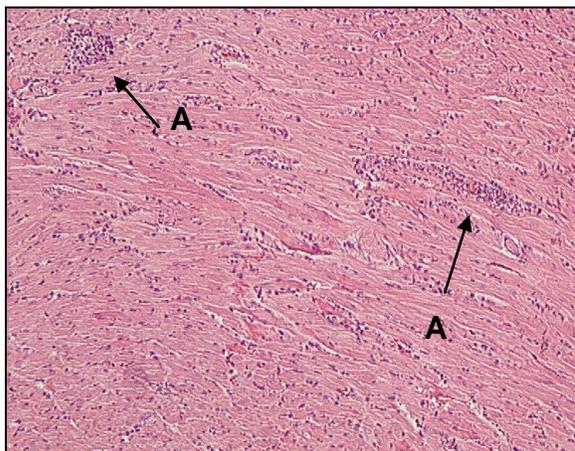


Figura 1: Corazón. HE, 100X. Ratón de 8 meses de edad, día 13 p.i. Se observa la presencia de pseudoquistes (A), los cuales presentan formas redondeadas y alargadas, y que además se ubican a nivel de todo el miocardio.

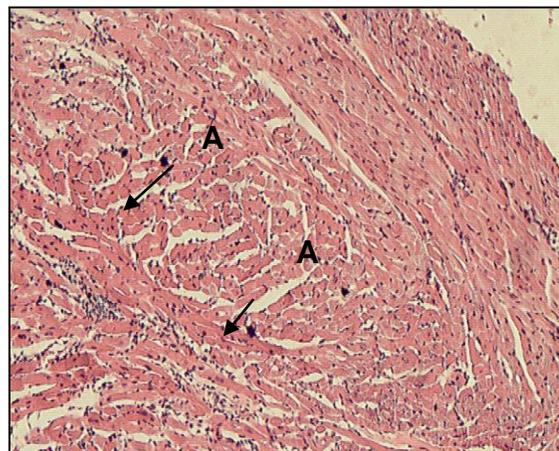


Figura 2: Corazón. HE, 100X. Ratón de 2 meses de edad, día 13 p.i. Se aprecian pequeñas lesiones inflamatorias focales (A) no delimitadas en miocardio.

Con aumento mayor se observa en el ratón de 8 meses de edad, gran cantidad de parásitos dentro de células miocárdicas (pseudoquistes) con un proceso inflamatorio mononuclear con predominio de macrófagos (Figura 3). En el ratón de menor edad también se observa inflamación pero escasos pseudoquistes (Figura 4).

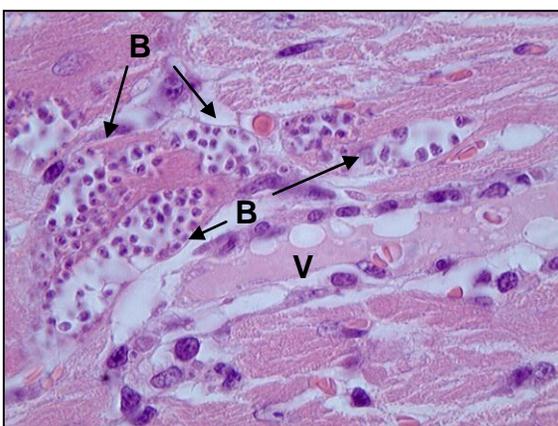


Figura 3: Corazón. HE, 1000X. Ratón de 8 meses de edad, día 13 p.i. Se observan estructuras alargadas, que corresponden a pseudoquistes, los cuales en su interior contienen estructuras de menor tamaño, de formas redondas, correspondientes a Amastigotos (B). Alrededor de estas últimas se identifica un vaso sanguíneo (V).

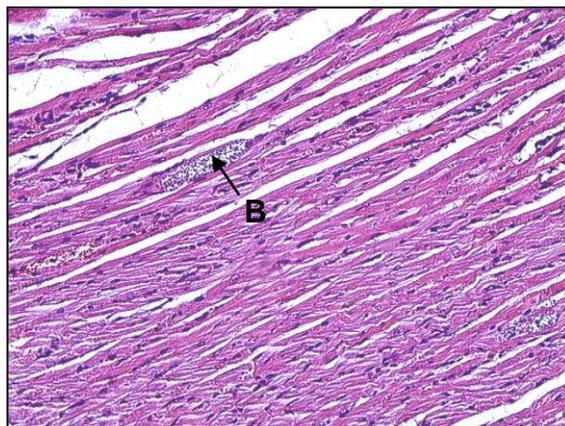


Figura 4: Corazón. HE, 200X. Ratón de 2 meses de edad, día 13 p.i. Se observa longitudinalmente la fibra muscular, interrumpida por una estructura alargada correspondiente a un pseudoquiste (B).

En el día 23 p.i. en el miocardio del animal de mayor edad se observó un aumento en la infiltración mononuclear, con lesiones inflamatorias focales diseminadas (Figura 5), y también se observaron células infectadas. El músculo cardíaco del ratón de menor edad presentó pocas lesiones, encontrándose sólo pequeños focos inflamatorios (Figura 6).

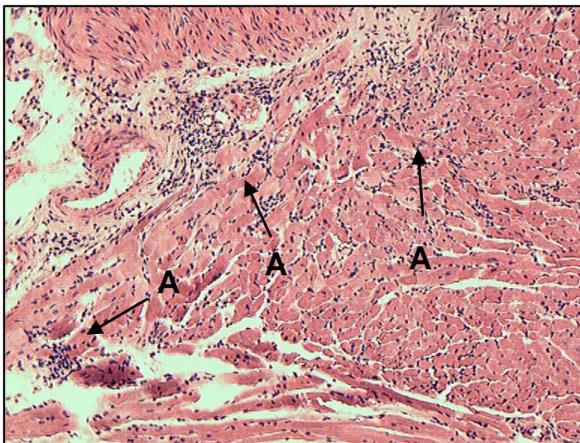


Figura 5: Corazón. HE, 100X. Ratón de 8 meses de edad, día 23 p.i. Se observa un proceso inflamatorio focal diseminado (A) en miocardio con predominio de células mononucleares.

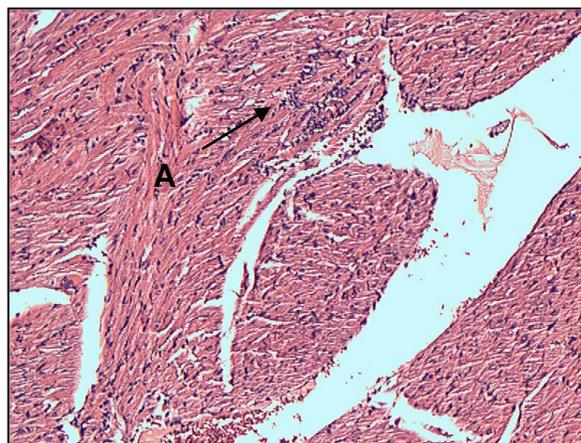


Figura 6: Corazón. HE, 100X. Ratón de 2 meses de edad, día 23 p.i. Se observa en miocardio un leve proceso inflamatorio (A) focal con presencia de células mononucleares.

Al día 33 p.i. en el miocardio del ratón de 8 meses se observaron focos inflamatorios leves, pérdida de tejido muscular con reemplazo de tejido conectivo y no se encontraron pseudoquistes (Figura 7). En el tejido cardíaco del animal de menor edad se encontró un leve proceso inflamatorio, sin lesiones mayores y tampoco se observaron pseudoquistes (Figura 8).

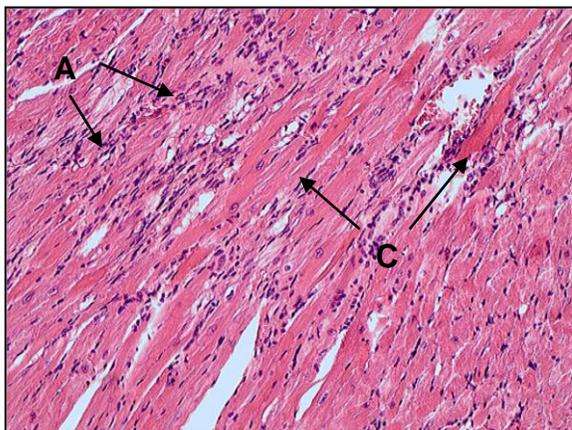


Figura 7: Corazón. HE, 200X. Ratón de 8 meses de edad, día 33 p.i. Se observa en miocardio pequeños focos inflamatorios (A). En la fibra miocárdica se observan zonas más acidofilas correspondientes a pérdida de tejido muscular y reemplazo de tejido conectivo (C)

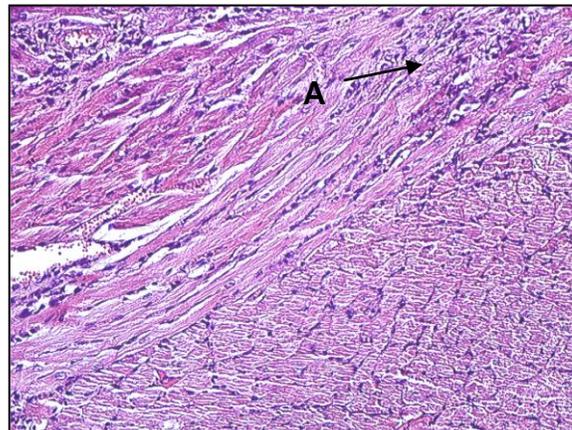


Figura 8: Corazón. HE, 200X. Ratón de 2 meses de edad, día 33 p.i. Se observa a nivel de miocardio un pequeño proceso inflamatorio focal no delimitado (A).

En el músculo esquelético con 13 días de infección en el ratón de 8 meses de edad no se observaron lesiones inflamatorias evidentes (Figura 9). Por su parte, en el ratón de 2 meses se observó un leve foco inflamatorio aislado (Figura 10).

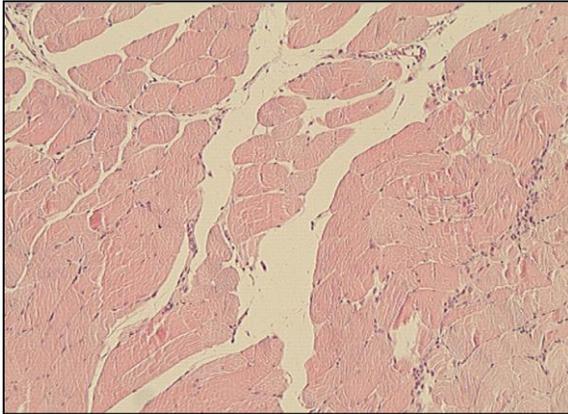


Figura 9: Músculo esquelético. HE, 100X. Ratón de 8 meses de edad, día 13 p.i. Se observan las fibras musculares conservadas.

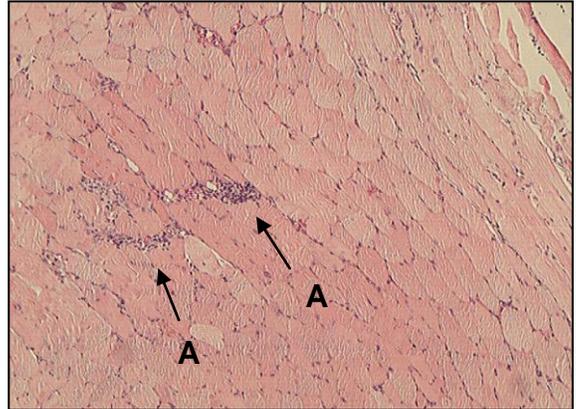


Figura 10: Músculo esquelético. HE, 100X. Ratón de 2 meses de edad, día 13 p.i. Se observa en una zona de la fibra muscular un proceso inflamatorio focal (A) con predominio de células mononucleares.

Al día 23 p.i. el tejido muscular del ratón de mayor edad presenta lesiones inflamatorias moderadas, con poca infiltración leucocitaria (Figura 11). El músculo del ratón de 2 meses, por el contrario, se aprecia un gran proceso inflamatorio severo, focal diseminado con predominio linfocitario (Figura 12) y necrosis de la fibra muscular.

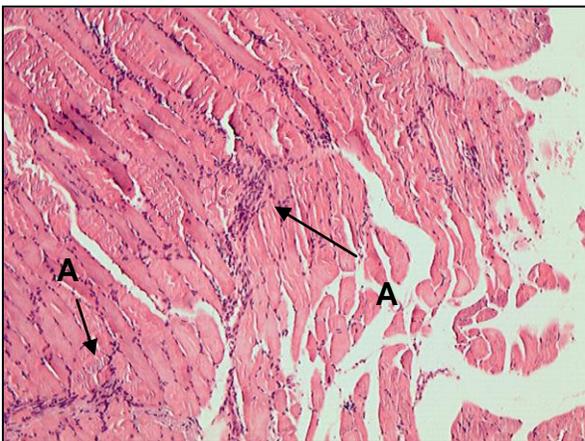


Figura 11: Músculo esquelético. HE, 100X. Ratón de 8 meses de edad, día 23 p.i. Se observa el músculo con una infiltración celular diseminada (A) entre las fibras musculares.

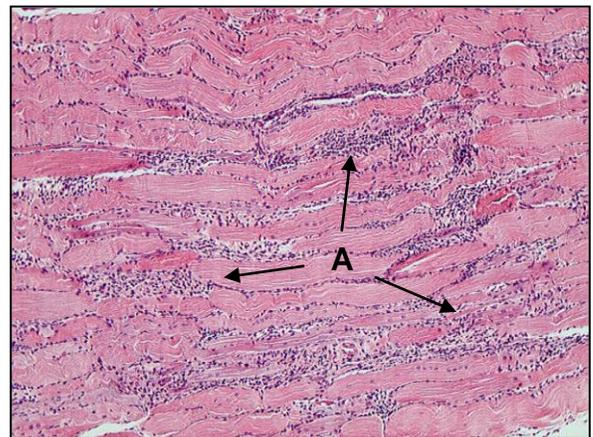


Figura 12: Músculo esquelético. HE, 100X. Ratón de 2 meses, día 23 p.i., se observa un gran proceso inflamatorio focal diseminado con infiltración mononuclear y predominio linfocitario (A).

En el día 33 p.i. el músculo del ratón de 8 meses presentó focos inflamatorios, pero en menor número que en el día 23, se observa pérdida de la estriación de la fibra muscular, reemplazo de tejido conectivo y necrosis (Figura 13), además se encontró un granuloma con gran cantidad de células inflamatorias y parásitos (Figura 15 y 16). En el ratón de 2 meses se observa el tejido muscular totalmente infiltrado y destruido con necrosis (Figura 14).

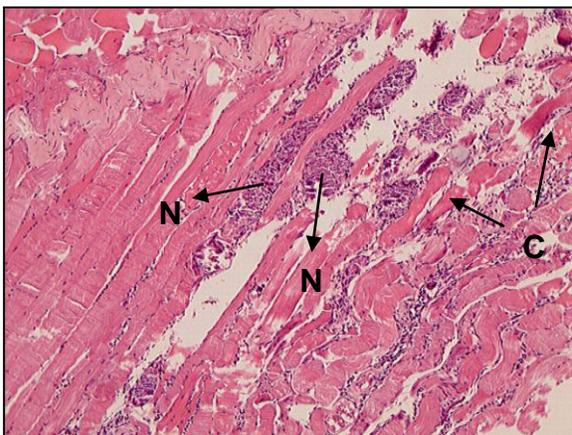


Figura 13: Músculo esquelético, HE, 100X ratón de 8 meses, día 33 p.i., se observa en el musculo pérdida de la estriación con reemplazo de tejido conectivo (C) y zonas de necrosis de la fibra muscular (N).

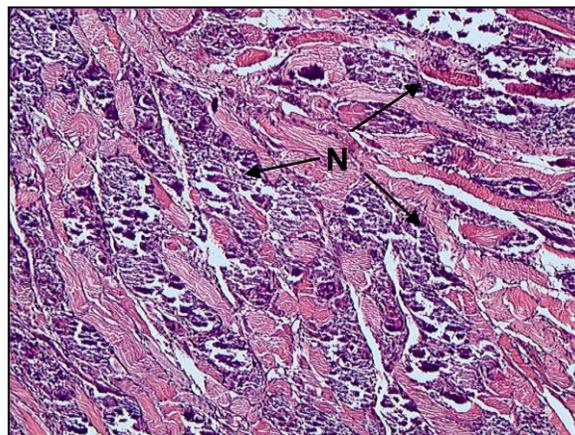


Figura 14: Músculo esquelético, HE, 100X ratón de 2 meses, día 33 p.i., se observa la mayoría del músculo totalmente destruido con amplias zonas de necrosis de la fibra muscular (N).



Figura 15: Músculo esquelético. HE, 40X. Ratón de 8 meses, día 33 p.i., se observa entre el tejido muscular (M) una estructura redondeada, bien delimitada, correspondiente a un granuloma (G).

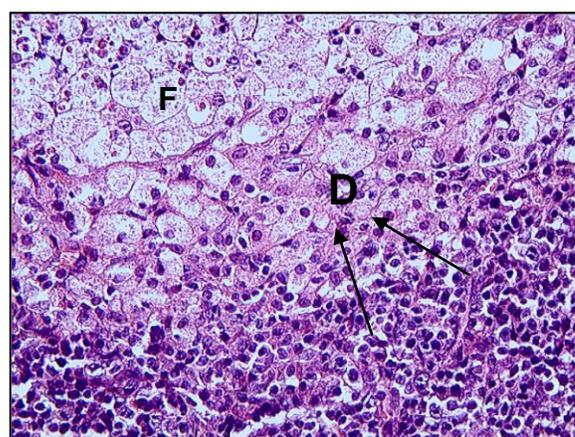


Figura 16: Granuloma. HE, 1000X. Ratón de 8 meses, día 33 p.i., se observa una transición celular, en donde la zona más basofila corresponde a una gran cantidad de células inflamatorias mononucleares con predominio de macrófagos (D) y una zona menos basófila con lisis celular y parásitos (F).

Al estudiar en conjunto las lesiones histológicas de los ratones sacrificados se observa que respecto a las lesiones de músculo cardíaco, inicialmente los ratones de mayor edad muestran un mayor daño, con una gran cantidad de pseudoquistes y con una infiltración celular moderada alrededor de las células parasitadas. Posteriormente el número de pseudoquiste disminuye, pero la infiltración celular aumenta y es generalizada. Finalmente la última muestra indicó que hay una reparación del tejido cardíaco con reemplazo de la fibra muscular por tejido conectivo y sin presencia de pseudoquistes. A diferencia de los ratones de menor edad donde el tejido cardíaco no se vio tan afectado, encontrándose sólo pequeños focos inflamatorios y muy pocos pseudoquistes. Las lesiones de músculo estriado comenzaron siendo casi inexistentes en ambos grupos, pero posteriormente el daño observado fue mayor en los ratones de 2 meses. A las tres semanas p.i. se observaron lesiones inflamatorias moderadas en los ratones de 8 meses, en cambio en los ratones de 2 meses las lesiones inflamatorias fueron severas y con necrosis de la fibra muscular. Finalmente las lesiones inflamatorias en los ratones de mayor edad terminaron siendo leves con reemplazo de la fibra muscular por tejido conectivo, lo que nos indica cierta reparación del tejido muscular, en cambio el mismo tejido en los ratones de menor edad terminó totalmente destruido con una necrosis general de toda la fibra muscular.

En las primeras semanas de infección ambos grupos de ratones presentaron diferentes comportamientos como decaimiento, inapetencia, pelaje erizado y pérdida de movilidad, características también informadas por otros autores (11) (28). Posteriormente los ratones sobrevivientes se recuperaron clínicamente y dejaron de presentar estos signos clínicos.

Aunque los niveles de parasitemia en los primeros diez días de infección fueron mucho más elevados en los ratones de mayor edad, posteriormente los animales de 2 meses desarrollaron niveles de parasitemia casi el doble de lo alcanzado por los animales de mayor edad. A pesar de que existen diversos estudios que apoyan la idea que no hay una relación directa entre los niveles de parasitemia y la susceptibilidad o resistencia a la infección con *T. cruzi*, (19) (25) (38) (39), como es el caso del estudio realizado con *Trypanosoma rangeli*, que se caracteriza por no ser virulento, pero si inducir altos niveles de parasitemia, incluso mayores a las provocadas por una cepa virulenta de *T. cruzi* (37). A pesar de esto, en este trabajo sí habría alguna relación positiva puesto que el 100% de mortalidad fue observada en el grupo que desarrolló los más altos niveles de parasitemia y a nivel de individuo se pudo observar que durante el estudio de la parasitemia los individuos que alcanzaban los niveles más altos morían.

Al analizar los resultados histopatológicos de corazón y músculo esquelético de los dos grupos de ratones, los resultados indicaron que a pesar de que en ambos grupos se presentaron lesiones de distinta consideración, en los ratones de 8 meses utilizados para el estudio histopatológico se aprecia cierta reparación del tejido dañado. Esto podría explicar de alguna manera la supervivencia del 40% de estos ratones, mientras que en los ratones de 2 meses que se usaron para la histopatología, se observa un grado severo de necrosis en músculo estriado, concordando con la paresia que presentaban y la posterior muerte del 100% de los ratones de menor edad.

Finalmente al comparar los distintos tejidos en relación al tropismo celular que posee el clon DM28c de *T. cruzi* se puede ver claramente un tropismo positivo por el tejido cardíaco, lo que coincide con lo descrito por otros autores (11) (34), pero la intensidad de las lesiones fueron mayores en el tejido muscular. Esto nos dice que la ausencia de pseudoquistes no implica necesariamente que no exista daño en el tejido, por lo que el número de pseudoquistes no tendría relación con la intensidad de lesiones en los tejidos y bastaría sólo la presencia del parásito para inducir el daño tisular.

También se pudo observar que en general los ratones de mayor edad presentaron reparación del tejido dañado, a diferencia de los de menor edad donde no hubo reparación de tejido sino necrosis severa de la fibra muscular, situación que no concuerda con lo descrito por otros autores donde los individuos jóvenes tienen mayor capacidad de reparación (15). La sugerencia más aceptada es que tales lesiones son el resultado de una agresión autoinmune, más que las causadas directamente por el parásito, disminuyendo la capacidad de reparación de los tejidos. Hay estudios en los que se transfirieron células inmunocompetentes de animales infectados a animales sanos y se encontró que en los animales sanos se producían las lesiones características de la enfermedad a pesar de estar en ausencia de parásitos (16) (14) (35), por lo que estos resultados avalarían la idea de una agresión autoinmune.

Se sabe que con la edad, disminuye la capacidad funcional del sistema inmune, por la involución del timo y el deterioro de las células madre, lo cual aumenta la ocurrencia de infecciones, de cáncer y de otras enfermedades complejas del sistema inmune (18). En el caso de la involución del timo este es un evento característico del envejecimiento tanto en humanos como en animales (26). En el ratón el máximo desarrollo del timo ocurre a las seis semanas de edad, coincidiendo con su maduración sexual, alcanzando un peso de 70 mg., luego a los seis meses el peso del timo ha disminuido a sólo 5 mg., esta reducción de tamaño y peso del

timo se debe principalmente a la pérdida tanto de linfocitos como de células estromales (24), por lo que el grupo de ratones de 8 meses de edad usados en este trabajo presentan sin duda una diferencia inmunológica respecto a los de 2 meses de edad.

El envejecimiento del sistema inmune o inmunosenescencia provoca una disminución progresiva de la respuesta inmune que afecta a todos los componentes del sistema inmunológico tanto innato como adaptativo (23). Esto puede explicar la diferencia que ocurre en la curva de parasitemia donde el inicio de la infección es mucho más marcado en los ratones de mayor edad, donde probablemente la respuesta inmune fue menos eficiente en el control de la infección, permitiendo una gran multiplicación del parásito, a diferencia de la parasitemia de los ratones de 2 meses que al inicio fue mucho menor.

Por estas razones los ratones de 8 meses no generarían, por lo menos no tan potente, una respuesta autoinmune frente a la infección con *T. cruzi* y con el tiempo serían capaces de reparar el daño tisular inicial a diferencia de lo que ocurre con los ratones de dos meses.

Los resultados mostrados en este trabajo avalarían la idea de que *T. cruzi* por si solo no sería el causante de las lesiones histopatológicas y muerte de los animales, sino que estaría asociado a mecanismos autoinmunes colaterales inducidos por el parásito.

CONCLUSIONES

- La infección con 2000 tripomastigotes sanguíneos del clon Dm28c de *T. cruzi* provocó la muerte del 100% de los ratones de 2 meses y el 60% en los ratones de 8 meses, pasado los 40 días p.i.
- A pesar de que los dos grupos se comportaron como susceptibles, se observó una mayor supervivencia en los animales de 8 meses
- En esta situación experimental el nivel de parasitemia alcanzado por los animales infectados sí se relacionó con la mortalidad.
- El clon Dm28c de *T. cruzi* mostró un histotropismo celular por músculo cardíaco, pero las mayores lesiones histopatológicas fueron en músculo esquelético.
- La edad del hospedero es un factor importante en el desarrollo de la infección con *T. cruzi* en el modelo murino.

AGRADECIMIENTOS.

En general quisiera agradecer a todas y cada una de las personas que participaron directa o indirectamente en la realización de mi memoria de título, entregando su ayuda en la ejecución del proyecto y en la posterior redacción de este documento.

Agradezco a mi profesor guía Dr. Claudio Zúñiga por su acogida, tiempo, paciencia y entrega de conocimientos, que fueron fundamental para la elaboración del proyecto.

Al Dr. Julio Larenas por su ayuda en la revisión de las lesiones histopatológicas y, junto a la Dra. Mariana Acuña por su tiempo en la corrección del presente documento.

Al funcionario Miguel Sepúlveda por la elaboración de las placas histológicas.

A mi familia que siempre estuvo ahí, a mis compañeros y amigos, y en especial a ti mi compañera de la vida.

Gracias a todos.

REFERENCIAS

- (1) **ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.** 2004. Inmunología celular y molecular 5ª ed. Ed Elsevier. Madrid, España. pp. 553.
- (2) **ARIAS, A.; FERRO, E.** 1988. Quantification of *Trypanosoma cruzi* parasitemia by direct micromethod. Trans Royal Soc Trop Med Hyg. 82:248.
- (3) **ATÍAS, A.** 2000. Enfermedad de Chagas. En: Parasitología Clínica. 3ª ed. Ed. Mediterráneo. Santiago. Chile. pp. 255–268.
- (4) **BOTERO, D.; RESTREPO, M.** 2008. Parasitosis humanas. 6ª Ed. Ed. Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB). Medellín, Colombia. pp. 506-520.
- (5) **BRENER, Z.; GAZZINELLI, R.** 1997. Immunological control of *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas`disease. Int. Arch. Allergy Inmunol. 114:103-110.
- (6) **CANALS, M.; CATTAN, P.E.; EHRENFELD, M.** 1993. Algunas estimaciones numéricas de la importancia epidemiológica de los vectores de la enfermedad de Chagas en Chile. Parasitol al Día. 17:79–86.
- (7) **CATTAN, P.E.; PINOCHET, A.; BOTTO-MAHAN, C.; ACUÑA, M.I. CANALS, M.** 2002. Abundance of *Mepraia spinolai* in a periurban zone of Chile. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz. 97 (3):285-287
- (8) **CELENTANO AM.; GONZALEZ CAPPA SM.** 1993. In vivo macrophage function in experimental infection with *Trypanosoma cruzi* subpopulations. Acta-Trop., 55:171-80.
- (9) **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.
- (10) **DIAS, JCP.; SILVEIRA, A.; SCHOFIELD, CJ.** 2002. The impact of Chagas disease control in Latin America- A review. Mem Inst Oswaldo Cruz 97:603–612.

- (11) **DÍAZ, E.; ESCALANTE, H.; JARA, C.** 2004. Niveles de parasitemia y alteraciones histopatológicas en *Mus musculus* BALB/c infectado con *Trypanosoma cruzi* obtenido de *Panstrongylus chinai* del Valle Chamán, La Libertad – Perú. *Parasitol Latinoam.* 59:153–158.
- (12) **GIRONES, N.; FRESNO, M.** 2003. Etiology of Chagas disease myocarditis: autoimmunity, parasite persistence, or both? *Trends Parasitol.*, 19:19–22.
- (13) **GUHL, F.** 2007. Epidemiología de la enfermedad de Chagas en Latinoamérica y Colombia. In: *Enfermedad de Chagas.* Sociedad Colombiana de Cardiología y Cirugía Cardiovascular. 1ª ed. Bogotá, Colombia, pp 7-14.
- (14) **HONTEBEYRIE-JOSKOWICZ, M.; SAID, G.; MILLON, G.; MARCHALL, G.; EISEN, H.** 1987. L3T4 T cells able to mediate parasite-specific delayed type hypersensitivity play a role in the pathology of experimental Chagas`disease. *Eur. J. Immunol.*17:1027-1032.
- (15) **KUMAR, V.; ABBAS, A.K.; FAUSTO, N.** 2006. *Patología estructural y funcional.* 7ª ed. Ed. Elsevier. Madrid, España. pp. 180.
- (16) **LAGUENS, R.P.; CABEZA-MECKERT, P.; CHAMBO, J.; GELPI, R.** 1981. Chronic Chagas disease in the mouse. *Med.* 41:40-45.
- (17) **LEON, J.; ENGMAN, D.** 2001. Autoimmunity in Chagas heart disease. *International Journal for Parasitology*, 31:555-561.
- (18) **LUGO, L.; RESTREPO, R.; SALINAS, F.** 2008. *Rehabilitación en salud,* 2ª ed. Ed. Univ. De Antioquia. Medellín, Colombia. pp 798.
- (19) **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.
- (20) **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.
- (21) **MONTIEL, G.; DIAZ, G.** 2002. Respuesta inmune de las células del hospedero a la infección por *Trypanosoma cruzi*. *Rev. méd. Hosp. Nac. Niños (Costa Rica)* v.37 n.1-2

- (22) **OLEA, A.** 1998. Situación epidemiológica de la Enfermedad de Chagas en Chile. Publicación Técnica, Departamento de Epidemiología, Ministerio de Salud. pp 1-6.
- (23) **PFISTER, G.; SAVINO, W.** 2008. Can the immune system still be efficient in the elderly? An immunological and immunoendocrine therapeutic perspective. *Neuroimmunomodulation*, 15 (4-6):351-364.
- (24) **PISCOYA, J.; RODRIGUEZ, J.** 1996. Inmunidad e inmunosenescencia. Anales de la Facultad de Medicina Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Vol. 57, N°4
- (25) **RUSSO, M.; STAROVINAS, N.; RIBEIRO DOS SANTOS, R.; MINOPRIO, P.; EISEN, H.; HONTEBEYRIE-JOSKOWISK, M.** 1989. Susceptible mice present higher macrophage activation than resistant mice during infection with myotropic strains of *Trypanosoma cruzi*. *Parasite Immunol.* 11: 385 – 389.
- (26) **SANSONI, P.** 2008. The immune system in extreme longevity. *Experimental Gerontology*, 43 (2), pp. 61-65.
- (27) **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.
- (28) **SCHNEUER, F.** 2003. Comparación de la infección con tres cepas de *Trypanosoma cruzi* en un modelo murino. Memoria Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. Chile, Fac. Medicina Veterinaria. 47 p.
- (29) **SCHOFIELD, C.** 2000. *Trypanosoma cruzi* – the vector – parasite paradox. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 4 : 535 – 544.
- (30) **STEVENS, J.; NOYES, H.; SCHOFIELD, C.; GIBSON, W.** 2001. The molecular evolution of Trypanosomatidae. *Adv Parasitol.* 48:1–53.
- (31) **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.

- (32) **URZÚA, C.; MORALES, M.A.; VERGARA, U.; PALÁU, M.T.; 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.* 3-4:104–109.
- (33) **VALENZUELA, L., BARRIA C., SEPULVEDA S., GALANTI N., CABRERA G.** 2010. Enfermedad de Chagas crónica: estrés oxidativo y miocarditis chagásica asociada a la persistencia parasitaria. *Av Cs Vet* 1: 35 – 44.
- (34) **VERA, A.** 2005. Desarrollo de la infección con *Trypanosoma cruzi* en tres cepas puras de ratones. Memoria Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. Chile, Fac. Medicina Veterinaria. 44 p.
- (35) **VILLELA-RIBEIRO, L., BARBOSA, A., ANDRADE, Z.** 2002. Pathology of intracardiac nerves in experimental Chagas disease. *Men Ins Oswaldo Cruz.* 5: 613-617.
- (36) **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.
- (37) **ZÚÑIGA, C.; PALÁU, M.T.; PENIN, P.; GAMALLO, C.; DE DIEGO, J.A.** 1997. Protective effect of *Trypanosoma rangeli* against infections with a highly virulent strain of *Trypanosoma cruzi*. *Trop Med Int Health* .5 : 482 – 487.
- (38) **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.
- (39) **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.



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



“INFLUENCIA DE LA EDAD DEL HOSPEDERO EN LA
EVOLUCIÓN DE LA INFECCIÓN EXPERIMENTAL CON
Trypanosoma cruzi EN UN MODELO MURINO”

NICOLÁS BINDER VERGARA

NOTA FINAL:

	NOTA	FIRMA
PROFESOR GUÍA : DR. CLAUDIO ZUÑIGA
PROFESOR CONSEJERO: DRA. MARIANA ACUÑA
PROFESOR CONSEJERO: DR. JULIO LARENAS

SANTIAGO – CHILE
2011