



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



“DESARROLLO DE LA INFECCIÓN EXPERIMENTAL CON
Trypanosoma cruzi EN HEMBRAS OVARIECTOMIZADAS DE LA CEPA
DE RATONES BALB/c”

BELEN BELLO GONZALEZ

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
2012

**“DESARROLLO DE LA INFECCIÓN EXPERIMENTAL CON
Trypanosoma cruzi EN HEMBRAS OVARIECTOMIZADAS DE LA CEPA
DE RATONES BALB/c”**

**“DEVELOPMENT OF EXPERIMENTAL INFECTION WITH *Trypanosoma cruzi* IN
OVARIECTOMIZED FEMALES FROM BALB/c MICE STRAIN”**

BELEN LIBERTAD BELLO GONZALEZ

Unidad de Inmunología, Departamento de Medicina Preventiva Animal

RESUMEN

Se realizó la infección de un grupo de ratones hembras enteras de la cepa BALB/c y de otro grupo de hembras ovariectomizadas con 2000 tripomastigotes sanguíneos del clon Dm28c de *Trypanosoma cruzi*. Los resultados obtenidos mostraron que el modelo de infección provocó 100% de mortalidad en hembras ovariectomizadas y sólo un 50% en el grupo de hembras enteras transcurridos 90 días post-infección. El nivel máximo de parasitemia se detectó en el grupo de hembras enteras y fue de $2,6 \times 10^5$ parásitos/mL, a su vez, el grupo de hembras ovariectomizadas presentó una parasitemia máxima de $1,8 \times 10^5$ parásitos/mL. En el estudio histopatológico de corazón y músculo esquelético, en relación a lesiones y número de pseudoquistes, ambos grupos presentaron alteraciones más marcadas en músculo esquelético pero en general las hembras ovariectomizadas presentaron lesiones inflamatorias más graves, mayor daño tisular y la presencia de un mayor número de pseudoquistes.

Las diferencias observadas, en cuanto a la mortalidad e intensidad de daño, en los tejidos indicaría que la presencia o ausencia de hormonas ováricas sería un factor importante en la evolución de la infección con *T. cruzi*, que se ha postulado previamente las diferencias en la susceptibilidad a la infección entre machos y hembras estaría asociada a los niveles de estrógenos, hormona que cumple un importante rol en la regulación del sistema inmune, y actuaría también como un factor clave en la supervivencia de las hembras normales.

Palabras claves: *Trypanosoma cruzi*, ovariectomía, hormonas ováricas.

ABSTRACT

Normal and ovariectomized Balb/c female mice were experimental infection with 2000 blood trypomastigotes from clone Dm28c of *Trypanosoma cruzi*. The results showed that the infection caused a 100% of mortality on ovariectomized females, while the mortality levels of the unoperated females reached a 50% after 90 days (post-infection). The maximum level of parasitemia ($2,6 \times 10^5$ parasites/mL) was detected in the unoperated females group, while the ovariectomized females showed a parasitemia of $1,8 \times 10^5$ parasites/mL. In relation to injuries and the number of pseudocysts, the histopathological study of the heart and skeletal muscle showed that both groups presented deeper alterations in the skeletal muscle, but in general, the ovariectomized females showed more serious inflammatory injuries, more tissue damage and presence of a bigger amount of pseudocysts.

The observed differences in mortality and severity of tissue damage suggest that the presence (or absence) of ovarian hormones would be an important factor in the evolution of the *T. cruzi* infection. As previously suggested, the susceptibility to *T. cruzi* differences to the infection between males and females would be explained by the estrogen's levels, hormone that fulfills an important role on the immune system's regulation, which would also act as a key factor in the survival of the normal females.

Key words: *Trypanosoma cruzi*, ovariectomy, ovarian hormones.

INTRODUCCIÓN

La Enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana, es una enfermedad parasitaria zoonótica endémica en 22 países en el Hemisferio Sur. A pesar de que en un comienzo, se encontraba restringida al continente americano, por efecto de las migraciones humanas, hoy se presenta como un tema latente tanto para la comunidad europea, como para el resto del mundo (24).

El parásito (*Trypanosoma cruzi*) no sólo infecta al humano, sino además puede infectar al menos 155 especies de mamíferos silvestres y sinantrópicos. Esto se explica por la amplia distribución del vector de la subfamilia Triatominae (Hemiptera, Reduviidae) en el ecosistema del planeta (24).

Se calcula que en el mundo existen alrededor de 10 millones de personas infectadas, las cuales se encuentran principalmente en América Latina. A su vez, existe una población de 25 millones de personas en riesgo de adquirir la enfermedad, y se estima que en el año 2008, fallecieron 10.000 personas debido a esta causa (30).

Agente Etiológico.

La enfermedad de Chagas, es producida por el protozoo hemoflagelado del orden Kinetoplastida, familia Trypanosomidae, género *Trypanosoma*, especie *cruzi*. El parásito presenta un flagelo y sólo una mitocondria, en la cual se sitúa el kinetoplasto, que corresponde a un organelo especializado que contiene ADN. *T. cruzi* presenta cuatro estadios morfológicos: tripomastigote sanguíneo y amastigote en sangre y tejidos del hospedero, respectivamente y epimastigote y tripomastigote metacíclico en el aparato digestivo del vector (14).

Ciclo biológico.

El ciclo de vida del parásito requiere la participación de un vector artrópodo hematófago, el cual ingiere los tripomastigotes sanguíneos desde un hospedero infectado. Luego en el insecto, los tripomastigotes se diferencian a la forma epimastigote en la zona anterior del intestino. Posteriormente, los epimastigotes a través de fisión binaria se replican numerosas veces y se diferencian a la forma infectante como tripomastigotes metacíclicos los que son eliminados junto a las deyecciones. Debido a que el vector al ingerir sangre simultáneamente, defeca sobre el hospedador, la forma infectante puede ingresar, ya sea a través de la zona de la picadura, de laceraciones en la piel o a través de las mucosas del hospedador. En el sitio de

la picadura, algunas veces, se estimula una reacción inflamatoria local o chagoma de inoculación principalmente en niños (20). Posteriormente, los macrófagos del hospedero fagocitan las formas infectantes, no obstante el parásito evade la capacidad lítica de los macrófagos y se diferencia hacia amastigote, que corresponde a la forma replicativa del parásito en el hospedero mamífero. Luego de varios ciclos de replicación, los amastigotes se diferencian a la forma de tripomastigote sanguíneos, la célula infectada se rompe y los parásitos liberados a sangre pueden invadir distintos tipos celulares como fibras del músculo cardíaco y células del sistema nervioso central. El ciclo se continúa si estos parásitos sanguíneos son ingeridos por un nuevo vector (29).

En América, los vectores se encuentran en el norte, desde EE.UU y México hasta Argentina y Chile en la zona sur. En Chile existen distintos vectores o vinchucas: *Triatoma infestans* como responsable del ciclo doméstico y *Mepraia spinolai* y *Mepraia gajardoi* como vectores silvestres (1). Recientemente se ha caracterizado una nueva especie en Chile, denominada *Mepraia parapatrica*, la cual se describe en la Isla de Pan de Azúcar y el borde costero de la II y III región. No obstante, esta especie no propaga la infección de *T. cruzi* debido a sus diferencias de alimentación que se encuentran enfocadas principalmente a aves (pingüino de Humboldt), en las cuales no se lleva a cabo el ciclo de vida de *T. cruzi* (9).

Vía de transmisión.

Esta enfermedad presenta diversas formas de transmisión; la más común es a través de las deyecciones de los insectos hemípteros hematófagos mencionados. Otras formas menos frecuentes corresponden a la transfusión sanguínea, trasplante de órganos de donantes infectados, transmisión congénita de madres infectadas, ingestión de sustancias contaminadas por excrementos de vectores o por accidentes de laboratorio (22).

Patología.

La enfermedad posee 2 tipos de presentación o fases, una Fase Aguda y una Fase Crónica. La fase aguda comienza con un período de incubación de 4 a 10 días, su duración es de aproximadamente 2 meses posterior a la infección y generalmente no presenta síntomas. Sin embargo, al evidenciarse una alta parasitemia cabe la posibilidad de que se desarrollen síntomas y signos transitorios tales como: fiebre, signos de puerta de entrada, edema, adenopatías satélites, hepatomegalia, esplenomegalia, anorexia, astenia, mialgias, cefalea y, ocasionalmente artralgias (30).

A su vez, la fase crónica se subdivide en período crónico indeterminado o latente y período crónico determinado. El período crónico indeterminado representa a un 50 a 70% de los pacientes. Durante este período no se presentan síntomas. Sin embargo, se detecta parasitemia y serología positiva. El período crónico determinado corresponde a la manifestación de la sintomatología, pudiendo observarse alteraciones cardíacas y del sistema digestivo principalmente con la aparición de megasíndromes. El paciente durante este período presenta una parasitemia baja y títulos elevados de anticuerpos (1). Con el transcurso de los años, la infección puede generar insuficiencia cardíaca o derivar en la muerte súbita (30).

Diagnóstico y Tratamiento

El diagnóstico de la Enfermedad de Chagas se puede obtener a través de métodos directos e indirectos (1). A su vez, el tratamiento de la enfermedad consiste en la administración de drogas tripanomicidas, que tienen una eficacia relativa y alto nivel de toxicidad (15).

Al no existir vacuna contra la enfermedad de Chagas, las medidas de prevención, para evitar la aparición de nuevos casos, se enfocan principalmente en el control del vector (17, 30). Es necesario comprender que para llevar a cabo un monitoreo adecuado de la enfermedad y su impacto, se debe implementar un sistema de vigilancia óptimo, el cual debe incluir la enfermedad e infección humana, vectores, reservorios y ambiente (17).

Factores que influyen en Infección

Se describen ciertos factores que determinan las características clínicas de la enfermedad, tales como: carga parasitaria de *T. cruzi* en la infección inicial, características biológicas de las cepas y clones infectantes, particularmente su histotropismo, y nivel de respuesta inmune celular y humoral del hospedero (20). Además, existen diferencias en el curso de la infección entre machos y hembras, debido al dimorfismo sexual, sin embargo, no existe claridad sobre cuál es el factor responsable de esta ventaja inmunológica de las hembras, aunque se ha responsabilizado principalmente a las hormonas sexuales y al cromosoma X (12).

Desde hace mucho tiempo se conoce que en los mamíferos, incluyendo al humano, las hembras habitualmente son más resistentes que los machos a diversas enfermedades infecciosas (19). Esto podría explicarse en condiciones no controladas, por las diferencias conductuales propias del género que aumentan la probabilidad de contacto de los machos con los parásitos, debido a la agresión, dispersión o agrupación entre los individuos infectados. Sin embargo, distintos estudios sugieren la existencia de diferencias, en la respuesta inmune entre

machos y hembras debido al efecto estimulador de las hormonas esteroidales, apoyando la existencia de un dimorfismo inmunológico a favor de las hembras (4, 9).

En el caso particular de infección con *T. cruzi*, estudios previos señalan que las hormonas sexuales pueden alterar la susceptibilidad a la infección parasitaria a través del incremento o supresión del sistema inmunológico (26) o influir en el crecimiento y desarrollo del parásito en el huésped por los efectos directos que ejercen sobre las células inmunes a través de receptores hormonales, siendo las hembras más resistentes a la infección por *T. cruzi* (13). Otro experimento de diferencias hormonales presentes entre sexos fue realizado por Do Prado Jr. Y colaboradores (6) en hembras *Calomys callosus* ovariectomizadas con la cepa Y del parásito, las cuáles presentaron niveles de parasitemia mayores en comparación con las hembras intactas y, paralelamente, hembras ovariectomizadas sometidas a inyecciones diarias de progesterona y estradiol mostraron niveles de parasitemia similares a las hembras intactas. Además, se realizó una contra parte del experimento, utilizando machos *C. callosus* gonadectomizados previo a la infección con cepa Y de *T. cruzi*. Los resultados demostraron que este grupo disminuyó sus niveles de parasitemia en comparación con el grupo control (no castrados), mientras que la reconstitución hormonal con testosterona revirtió este efecto (6, 7).

Las principales hormonas sexuales femeninas son estrógeno y progesterona. Los estrógenos corresponden a hormonas esteroidales de origen ovárico y que tiene como principal rol fisiológico, el control de la reproducción en las hembras. Esta función abarca una amplia gama de actividades biológicas entre las que se encuentran: desarrollo del aparato reproductor y órganos sexuales secundarios, regulación del ciclo estral, desarrollo de la glándula mamaria, control de la lactancia y control del comportamiento reproductor femenino (16). Los estrógenos participan en la regulación del sistema inmune, ya que su presencia aumenta la capacidad destructiva de los fagocitos, liberación de IL-1, producción de intermediarios reactivos del oxígeno, liberación de nitrito. Además, se ha demostrado que los macrófagos expresan receptores de estrógeno. Los estrógenos además influyen en la respuesta inmune humoral al mejorar la maduración de células B, y genera mayores niveles de anticuerpos (11, 25).

La progesterona, juega un papel crítico en la reproducción, incluyendo el mantenimiento del embarazo en los mamíferos, y la función inmune. Posee efecto tanto estimulante como supresor sobre el sistema inmune, pero generalmente se considera como inmunosupresor. Se han identificado receptores de progesterona en las células epiteliales, células cebadas, granulocitos (eosinófilos), macrófagos, y linfocitos. La progesterona suprime la respuesta inmune innata, incluyendo a macrófagos, actividad de las células NK, nitrito y producción de óxido nítrico. A elevadas concentraciones, durante el embarazo, inhibe el desarrollo de la

respuesta inmune Th1 que puede conducir a rechazo fetal y promueve la producción de la respuesta inmune de Th2, incluyendo IL-4 y IL-5. Aunque las propiedades inmunomoduladoras de la progesterona están bien caracterizados en ratones y seres humanos, los efectos en las respuestas a la infección no se han examinado adecuadamente y pueden contribuir a las diferencias que se presentan entre sexos en respuesta a infecciones parasitarias (11).

Modelos Biológicos.

Para analizar la infección experimental con *T. cruzi* se utiliza habitualmente el modelo murino, el cual se usa desde hace muchos años en variados estudios experimentales. Hoy en día, es uno de los modelos más empleados debido a características particulares, tales como: tamaño, facilidad de reproducción, existencia de cepas endogámicas caracterizadas, cepas de animales manipulados por ingeniería genética y en el caso de la infección con *T. cruzi* las semejanzas con el humano en la fase aguda de la infección (27).

En el presente trabajo se analizará el efecto de la ovariectomía y, por tanto, la eventual influencia de las hormonas sexuales en el desarrollo de la infección con *T. cruzi*, utilizando ratones hembras de la cepa Balb/c, ovariectomizadas e infectadas de manera experimental.

MATERIAL Y MÉTODOS

Cepas de parásitos

Para llevar a cabo la infección, se utilizaron tripomastigotes sanguíneos del clon Dm28c de *T. cruzi* (5). Este parásito se mantiene mediante el pasaje sucesivo en ratones Balb/c, lo cual se realiza en el Bioterio de la Unidad de Inmunología de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile.

Modelo Animal

Para efectuar el experimento se utilizaron veinte ratones hembras (*Mus musculus*) de la cepa Balb/c de 12 semanas de edad, de aproximadamente 25 gr. Los cuales fueron mantenidos en jaulas plásticas (5 hembras por jaula) con rejilla superior y cama de aserrín, con acceso a alimento comercial para ratones y agua *ad libitum*. En ambiente controlado con una temperatura promedio de 22°C.

Los ratones se dividieron en dos grupos: 10 hembras sometidas a ovariectomía (HO) y 10 hembras enteras (HE). No se utilizó como grupo control a hembras sometidas a cirugía falsa (anestesia, apertura cavidad abdominal y sutura) debido a que Do Prado y colaboradores (6) descartaron que el estrés quirúrgico aumentara la susceptibilidad del huésped a los efectos patológicos de la infección con el parásito (6, 23).

Los ratones del grupo HO, a las 8 semanas de edad se sometieron a una intervención quirúrgica en la cual se realizó la extirpación de los ovarios. Transcurridas 4 semanas post cirugía, ambos grupos, de tres meses de edad, se inocularon con 2.000 tripomastigotes sanguíneos del clon Dm28c de *T. cruzi* (33).

Procedimiento Quirúrgico

El grupo HO a las 8 semanas de edad fue trasladado a la Clínica Veterinaria “San Ignacio”. En este establecimiento se procedió al pesaje de cada hembra. Posteriormente, se elaboró el plan anestésico en base a la asociación de Ketamina (100 mg/kg) y Xilacina (10mg/kg) en razón del peso de cada ratón, que fue inoculado por vía intraperitoneal (10). Paralelamente se preparó el pabellón de cirugía y el instrumental a utilizar. A todas las hembras se les realizó la extirpación de los ovarios con disección roma y sin ligadura (3, 8). Una vez finalizada la cirugía se efectuó la limpieza de la zona abdominal con peróxido de hidrógeno, a fin de evitar que la presencia de sangre instara a las hembras a dañarse entre ellas (27).

Esta fase fue realizada en su totalidad bajo la tutela del Médico Veterinario Guillermo Silva Vásquez, y previa autorización del Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile.

Periodo Post Operatorio

Posterior a la cirugía, los ratones quedaron en observación por un periodo de 24 horas en la clínica, y luego fueron transportados hasta las dependencias del Bioterio de la Unidad de Inmunología de la Facultad, donde se mantuvieron en período post operatorio por 4 semanas, a fin de descartar el estrés ocasionado por la cirugía como un factor determinante en los resultados esperados para este experimento (15). Al concluir este período, se contaba con las todas las hembras de ambos grupos, las cuales no presentaban anomalías en el proceso de cicatrización de la incisión, ni signos o síntomas asociados a dolor o enfermedad. No presentaban pelo erizado y consumían alimento y agua en forma normal.

Modelo de Infección

Cuando los dos grupos de ratones cumplieron 12 semanas de edad, y ya habían transcurrido 4 semanas desde la cirugía, se realizó la infección con *T. cruzi*. Esto se llevó a cabo, mediante el sacrificio de un ratón infectado con el clon Dm28c de *T. cruzi*. Se le extrajeron 0,6 mL de sangre a través de punción cardíaca, la cual fue dispuesta en un frasco estéril con 0,1 mL de citrato de sodio. Posteriormente se realizó la dilución adecuada en suero fisiológico estéril, de manera de inocular, en forma intraperitoneal, a cada animal con 2.000 tripomastigotes sanguíneos de *T. cruzi*, contenidos en 0,2 mL de una dilución de sangre infectada (31).

Estudio de Parasitemia

Con el fin de determinar prepatencia (primer día en el que se logra demostrar la presencia de parásitos en sangre) y niveles de parasitemia, los animales infectados se sangraron desde la vena caudal, en tubos de microhematocrito heparinizados a partir del tercer día postinfección (p.i) y, luego, día por medio hasta que la parasitemia fue negativa. Posteriormente, se calculó el volumen de sangre contenido en cada tubo de hematocrito (a razón de porcentaje). Luego se centrifugaron los tubos a 700g por un período de 5 minutos, y se dejaron incubar por 15 minutos, en estufa a 37° C.

Considerando que la mayor concentración parasitaria se encuentra en la zona leucoplaquetaria, se procedió a cortar con un lápiz diamante este sector. Posteriormente, se colocó este volumen en un portaobjeto, cubierto por un cubreobjeto de 20 x 20 mm.

La lectura del nivel de parasitemia se realizó en un microscopio Leitz con un aumento de 400x. Se llevó a cabo el recuento de los parásitos en 50 campos elegidos al azar. Posteriormente, el número de parásitos contados se expresó como número de parásitos por mL en cada ratón, de acuerdo al método descrito por Arias y Ferro (2). Los resultados del número de parásitos obtenidos en cada día de estudio se describieron como el promedio de parasitemia del grupo, más la desviación estándar correspondiente.

Estudio Histopatológico

Para la realización del estudio histopatológico se tomaron muestras de corazón y músculo esquelético extraído de miembro posterior derecho, de una hembra de cada grupo, utilizando como criterio de selección a los ratones que presentaron el nivel de parasitemia más alto ese día, en ambos grupos. Las muestras de tejido de los ratones sacrificados los días 7,

14, 18 y 21 p.i., se incluyeron en parafina, para realizar cortes de 5 µm de espesor con un micrótopo de rotación (Leitz) que se tiñeron luego con Hematoxilina-Eosina (31).

Se consideraron tipos de lesiones como: infiltración, hiperemia, edema, hemorragia, fibrosis, necrosis, cambios degenerativos y número de pseudoquistes (células infectadas). El criterio para la evaluación de la intensidad de las lesiones, se realizó según el tipo y severidad de dichas lesiones, y fueron representadas arbitrariamente por signos, correspondiendo a: (-) tejido preservado y sin signos aparentes de inflamación; (+) lesiones inflamatorias mínimas con hiperemia e infiltración leucocitaria discreta; (++) lesiones moderadas con hiperemia, infiltración linfocitaria y edema; (+++) lesiones severas con hiperemia, infiltrado mononuclear y linfocitario, edema y necrosis.

La representación utilizada en la evaluación del tropismo tisular y número de células parasitadas (pseudoquistes) se representó, arbitrariamente, como: (-) negativo, ausencia de células parasitadas; (+) leve, presencia de 1 - 5 células infectadas (pseudoquistes); (++) moderado, presencia de 6 a 10 pseudoquistes; (+++) severo, presencia de 11 o más pseudoquistes. Se consideraron 10 campos microscópicos de cada corte de tejido, utilizando un aumento de 600x en un microscopio Nikon, modelo Eclipse 600, y los resultados fueron presentados utilizando una tabla y fotografías.

Análisis estadístico

Para analizar el nivel máximo de parasitemia alcanzado y las diferencias de parasitemia entre ambos grupos se compararon sólo sus medias en el día de máximo nivel mediante la prueba de t para muestras independientes (31).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El gráfico N°1, muestra la evolución de la infección en función de los niveles de parasitemia, a partir del tercer día post inoculación experimental; momento en el que sólo las muestras del grupo HO resultaron positivas a la presencia de tripomastigotes de *T. cruzi* en sangre. En el grupo HE la prepatencia fue a partir del día 5 post infección (p.i.).

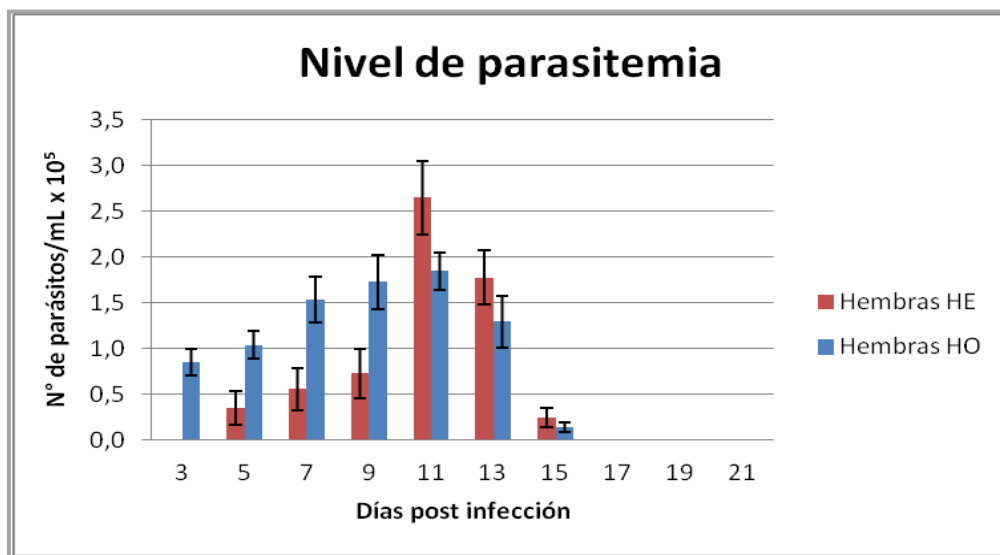


Grafico N°1: Niveles de parasitemia de ratones hembras enteras y ovariectomizadas de la cepa Balb/c infectados con 2000 parásitos del clon Dm28c de *T. cruzi*.

Al inicio de la infección se detectó un mayor número de parásitos por mL de sangre en el grupo de hembras ovariectomizadas. El grupo HO presentó niveles relativamente más altos de parasitemia durante aproximadamente 7 días p.i. (día 3 al día 11 p.i.) y luego disminuyó notoriamente al día 15 p.i.. Sin embargo, el nivel máximo de parasitemia $2,6 \times 10^5$ se detectó en el grupo de las hembras enteras en el día 11 p.i. y resultó significativamente más alto ($p < 0.05$) que el nivel máximo alcanzado por las hembras ovariectomizadas que alcanzó sólo $1,8 \times 10^5$ parásitos/mL. A partir del día 13 p.i., los niveles de parasitemia disminuyen progresivamente en ambos grupos de hembras, haciéndose negativos a partir del día 17 p.i.

El gráfico N° 2 muestra el porcentaje de supervivencia en ambos grupos de ratones experimentalmente infectados, como puede observarse, el grupo HE presentó un 60% de supervivencia al día 15 p.i., mientras el grupo HO presenta un 50% de supervivencia, al mismo día p.i.. Al día 18 p.i., ocurre el deceso del grupo de HO, presentando 100% de mortalidad, mientras el grupo HE presenta un 60% de supervivencia, lo que se mantuvo hasta los 90 días p.i. y, a pesar de que inicialmente mostraron decaimiento y pelo erizado, finalmente lograron recuperar su estado inicial de salud. Esto implica que, en la situación experimental aquí

descrita, las hembras del grupo HE se comportaron como más resistentes a la infección del clon Dm28c de *T. cruzi*, que las hembras del grupo HO.

En este estudio, las hembras HE presentaron un mayor nivel de parasitemia en relación a las hembras HO que resultaron altamente susceptibles a la infección con *T. cruzi*. Estos resultados coinciden con resultados anteriores, que sugieren que no existiría una relación directa entre los niveles de parasitemia y la mortalidad de los individuos infectados (32).

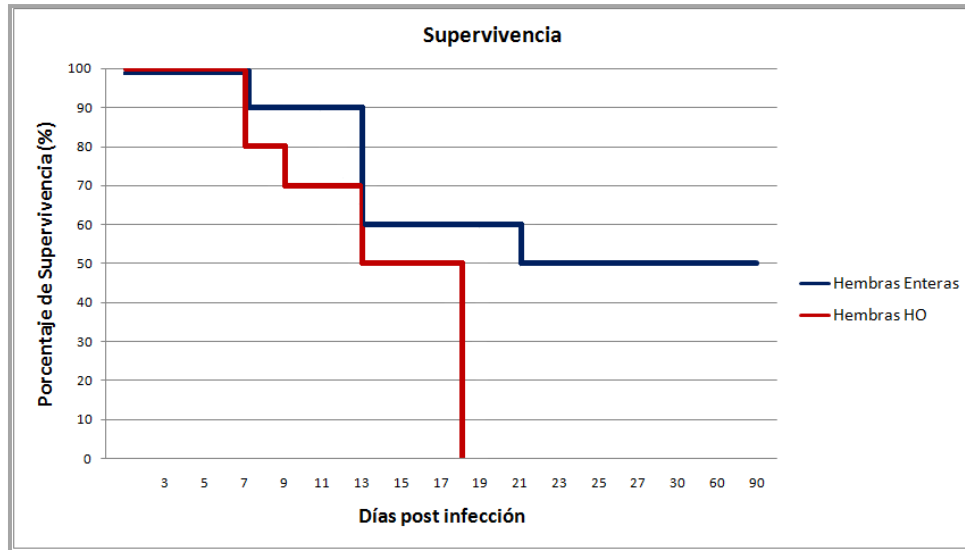


Grafico N°2: Supervivencia de ratones hembras enteras y ovariectomizadas de la cepa Balb/c infectados con 2000 parásitos del clon Dm28c de *T. cruzi*.

Estudio Histopatológico

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

Grupo	Tejido	Lesión	Día 7 p.i.	Día 14 p.i.	Día 18 p.i.	Día 21 p.i.
Hembras enteras	Corazón	Inflamación	-	+		++
		Pseudoquistes	-	-		+
		Necrosis	-	+		++
	Músculo	Inflamación	-	+		+++
		Pseudoquistes	-	+		+
		Necrosis	-	+		+++
Hembras Ovariectomizadas	Corazón	Inflamación	-	++	++	
		Pseudoquistes	-	++	+++	
		Necrosis	-	++	++	
	Músculo	Inflamación	-	++	+++	
		Pseudoquistes	-	+	+	
		Necrosis	-	++	+++	

Los resultados obtenidos en el estudio histopatológico mostraron que, al día 7 p.i., no existen lesiones evidentes en músculo cardíaco en ninguno de los ratones hembras infectados. Luego de transcurridos 14 días p.i., en el tejido cardíaco de la hembra entera se observaron lesiones leves, difusas, con zonas de necrosis y calcificación, un grado moderado de infiltración de células inflamatorias y ausencia de pseudoquistes (Figura 1). En el tejido de la hembra ovariectomizada a los 14 días p.i., se detectó lesiones inflamatorias marcadas, diseminadas y severas, con presencia de pseudoquistes (Figura 2, 3 y 4).

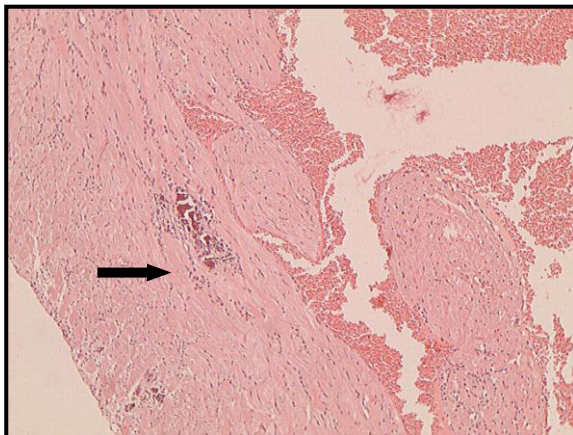


Figura 1: ratones HE, día 14 p.i., músculo cardíaco, aumento 100x. Obsérvese zona de calcificación.

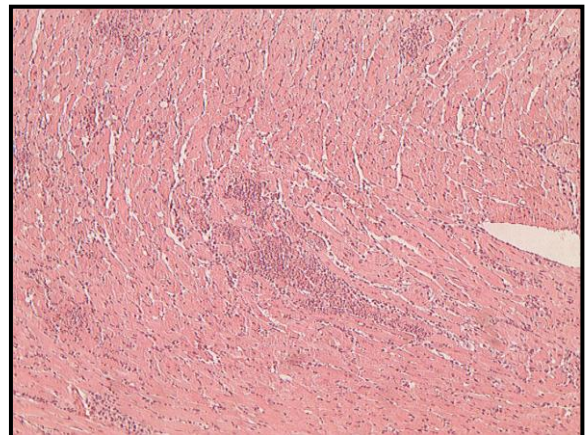


Figura 2: ratones HO, día 14 p.i., músculo cardíaco, aumento 400x. Obsérvese inflamación severa.

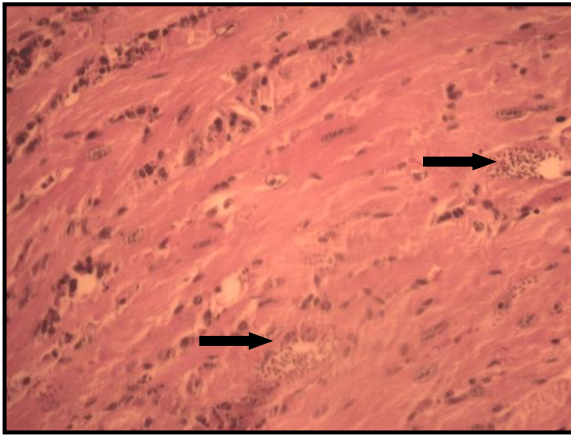


Figura 3: ratones HO, día 14 p.i., músculo cardíaco, aumento 200x. Obsérvese pseudoquistes.

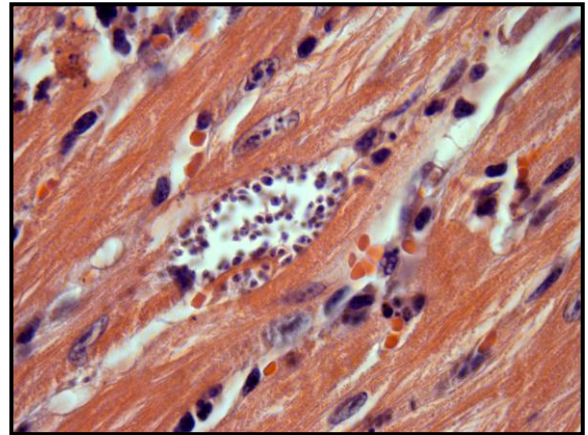


Figura 4: ratones HO, día 14 p.i., músculo cardíaco, aumento 400x. Obsérvese pseudoquiste.

Al día 21 p.i., el tejido cardíaco de hembra entera, presentó lesiones inflamatorias focalizadas y severa infiltración celular (Figura 5). Al día 18 p.i., el grupo de hembras ovariectomizadas presentó 100% de mortalidad y el estudio histopatológico de tejido mostró la presencia de numerosos pseudoquistes (Figura 6).

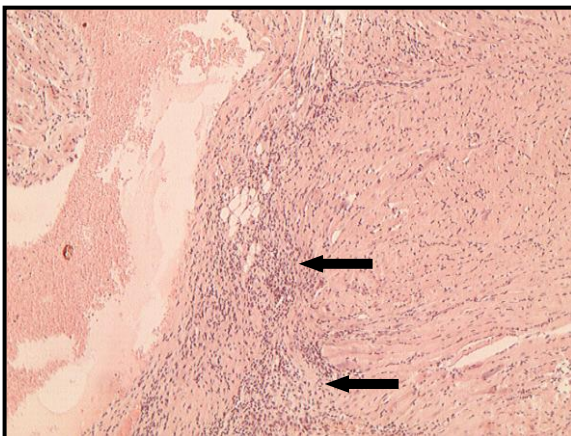


Figura 5: ratones HE, día 21 p.i., músculo cardíaco, aumento 100x. Obsérvese severa infiltración celular.

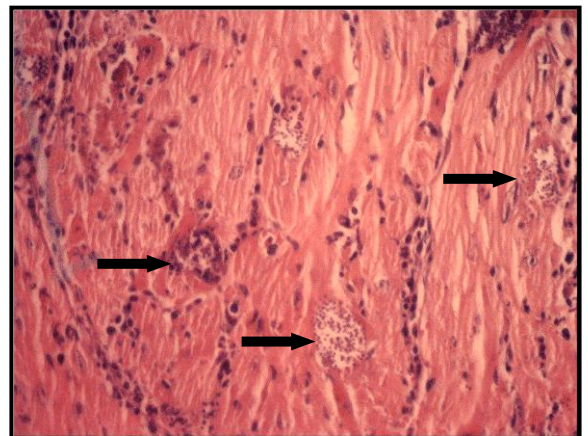


Figura 6: ratones HO, día 18 p.i., músculo cardíaco, aumento 200x. Obsérvese pseudoquistes.

En las muestras obtenidas de tejido de músculo esquelético, al día 7 p.i., tanto de hembra entera, como en el de hembra ovariectomizada, no se observaron alteraciones en la estructura normal del tejido, ni infiltración celular.

En las muestras del día 14 p.i., en el tejido de hembra entera, se observó la presencia de sólo un pseudoquiste, con moderada infiltración de células inflamatorias y leve destrucción

de la estructura tisular (Figura 7). En el tejido de hembra ovariectomizada, al día 14 p.i., se observó la presencia de infiltración severa y multifocal de células inflamatorias, con zonas de necrosis, calcificación y gran destrucción de tejido (Figura 8).

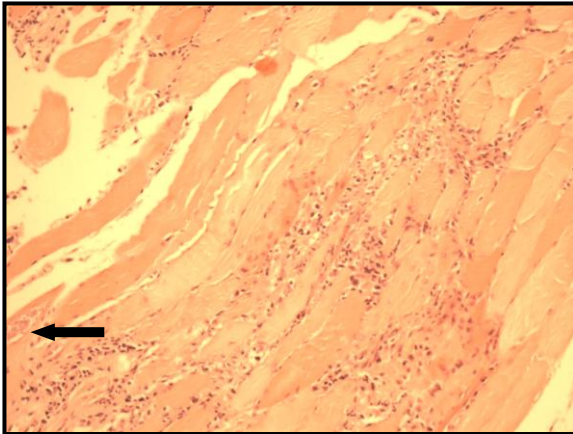


Figura 7: ratones HE, día 14 p.i., músculo esquelético, aumento 200x. Obsérvese pseudoquiste.

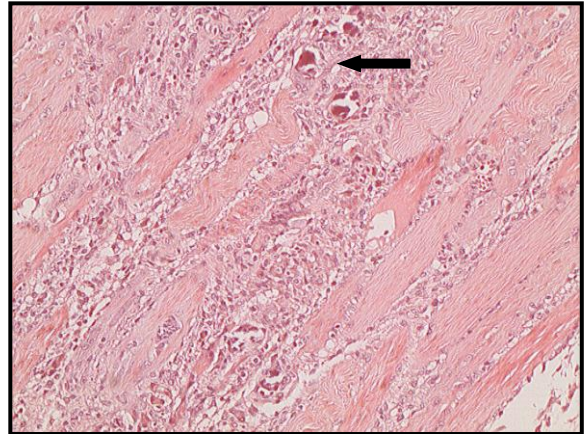


Figura 8: ratones HO, día 14 p.i., músculo esquelético, aumento 200x. Obsérvese infiltración celular moderada.

Luego de 21 días p.i., en el tejido de hembra entera se detectó variadas zonas de necrosis y destrucción de tejido (Figura 9). Al día 18 p.i., el grupo de hembras ovariectomizadas presentó 100% de mortalidad y al estudio histopatológico, de una muestra de músculo esquelético, mostró un severo proceso de infiltración de células inflamatorias, destrucción tisular, pérdida de la conformación normal de las fibrillas musculares, sectores con procesos reparativos (presencia de colágeno), formación de tejido conectivo y degeneración hialina (Figura 10).

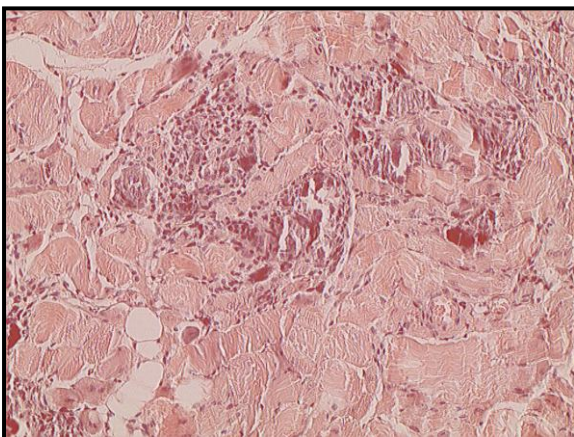


Figura 9: ratones HE, día 21 p.i., músculo esquelético, aumento 200x. Obsérvese zonas de necrosis.

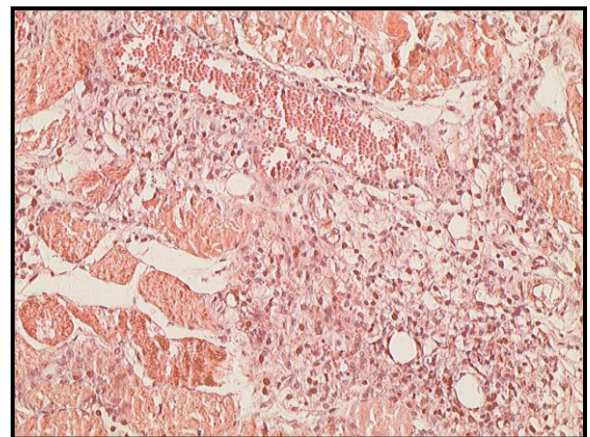


Figura 10: ratones HO, día 18 p.i., músculo esquelético, aumento 200x. Obsérvese destrucción de tejido.

Al momento de comparar los resultados de los estudios histopatológicos, se observa que el clon Dm28c de *T. cruzi* parece manifestar un marcado tropismo celular hacia el músculo cardíaco, dado que es en este tejido donde se detecta la presencia leve a moderada de pseudoquistes parasitarios. Sin embargo, cabe destacar que el daño tisular más severo se detectó en el músculo esquelético lo cual se avala con resultados similares, obtenidos en estudios previos (18, 21). Esto sugiere que la ausencia de pseudoquistes en el tejido no implica necesariamente, ausencia de lesiones tisulares y, por lo tanto, no habría relación entre el número de pseudoquistes y la severidad de las lesiones en los tejidos, aún cuando la simple presencia del parásito podría inducir la activación de mecanismos inmunológicos responsables finalmente del daño tisular, y que a pesar de que las parasitemias sean negativas, el parásito permanece de manera latente, lo que implicaría que no existe una resolución total de la infección (18).

En los primeros 9 días p.i. experimental se observó mayor presencia de parásitos en la sangre de las hembras ovariectomizadas en comparación a las hembras enteras. Esto, según Klein (11), se relacionaría con la presencia de estrógenos, los cuales modulan la función inmunológica (innata y adquirida) en las hembras a través de receptores de estrógenos que se expresan en distintas células tanto del tejido linfoide, como en linfocitos y monocitos circulantes, lo que concuerda con el estudio realizado por Tai y colaboradores que señala que la restitución en ratones hembras ovariectomizadas de los niveles fisiológicos de estrógeno aumentan significativamente el desarrollo periférico de células T reguladoras Th CD4 β y CD25 β . Los estrógenos estimulan además la síntesis de citoquinas proinflamatorias, como IL-1, IL-6 y factor de necrosis tumoral (TNF), y de factores que protegen contra la apoptosis de las células inmunes (28).

Los resultados obtenidos en este estudio concuerdan con los experimentos realizados por Santos y colaboradores, en ratones hembras enteras, con cirugía simulada y ovariectomizadas, donde el grupo de hembras ovariectomizadas presentó 100% de mortalidad y se detectó la presencia de nidos de amastigotes (pseudoquistes) en las fibras del corazón, a diferencia de lo sucedido con las hembras enteras, lo cual indicaría una respuesta inmune deteriorada, facilitando la migración del parásito y la invasión de tejidos, probablemente debido a la ablación de esteroides gonadales. Además, este estudio determinó que a pesar de que el estrógeno tiene un efecto estimulante sobre la respuesta humoral (hecho evidenciado por aumento del porcentaje de anticuerpos líticos), los anticuerpos no son suficientes para controlar la

reproducción del parásito, pero son suficientes para controlar la replicación del parásito, evitando su invasión en los tejidos del huésped (23).

En estudio similar utilizando otras especies de parásitos, como: el nematodo *Brugia malayi* y el protozoo *Leishmania mexicana* (4), se pudo observar el desarrollo de infección de manera similar a lo aquí ocurrido con *T. cruzi*. Esto podría sugerir que las hembras son más resistentes a las infecciones parasitarias; sin embargo, esto no ocurre en la infección con *Toxoplasma gondii*, donde las hembras enteras resultan más susceptibles a la infección con el parásito (4). Estos datos sugieren que el efecto de las interacciones inmunendocrinas en la respuesta a la infección parasitaria puede ser distinto para cada parásito (4). No obstante, los avances en inmunología celular, endocrinología y biología molecular, avalan la hipótesis de que las hormonas sexuales tienen efecto sobre el sistema inmune y modulan la respuesta inmunológica (11).

Es necesario aclarar que los resultados obtenidos en este trabajo fueron realizados a una edad determinada, con un clon particular del parásito y en una cepa de *Mus musculus*, razón por lo cual no se pueden descartar resultados diferentes, particularmente a lo que concierne en la variación de eventos fisiológicos controlados por la secreción hormonal de la glándula pituitaria y los ovarios (ciclo estral, preñez, menopausia)(11, 25).

CONCLUSIONES

- La infección con 2.000 tripomastigotes sanguíneos del clon Dm28c de *T. cruzi* provocó la muerte del 100% de ratones hembras BALB/c ovariectomizadas y del 40% de las hembras enteras al día 18 p.i..
- En esta situación experimental, el nivel máximo de parasitemia alcanzado por los animales infectados no muestra relación con una mayor mortalidad producto de la infección con el parásito.
- El clon Dm28c de *T. cruzi* presentó un mayor histotropismo hacia el músculo cardíaco, encontrando un mayor número de pseudoquistes en este tejido, aún cuando las lesiones histológicas fueron mayores en músculo esquelético.
- Los resultados sugieren que la presencia o ausencia de hormonas ováricas del hospedero puede constituir un factor importante en la evolución de la infección con *T. cruzi* en el modelo murino aquí utilizado.

REFERENCIAS

- (1) **APT, W.; HEITMANN, I.; JERCIC, M.I.; JOFRÉ, L.; MUÑOZ, P.; HAUCK, I.N.; SAN MARTIN, A.M.; SAPUNAR, J.; TORRES, M.; ZULANTAY, I.** 2006. Prevención y control de la enfermedad de Chagas: Guías Clínicas de la enfermedad de Chagas. Ministerio de Salud, Gobierno de Chile. Pp 30-44.

- (2) **ARIAS, A.; FERRO, E.** 1988. Quatification of *Trypanosoma cruzi* parasitemia by direct micromethod. Trans R Soc Trop Med Hyg. 82: 248.

- (3) **BENNETT, R.A.; MULLEN, H.S.** 2004. Chapter 30 Soft tissue surgery. In: Ferrets, Rabbits and rodents: Clinical Medicina and surgery. Segunda Edición. Missouri, USA. Edit. Saunders. Pp 319- 320.

- (4) **CERVANTES, C.; CARRERO, J.C.** 2008. Hormonas y la susceptibilidad a las infecciones parasitarias. Revista Médica de la Extensión Portuguesa. 2:77-86.

- (5) **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.

- (6) **DO PRADO JR., J.C.; ANSELMO-FRANCI, J.; DE ANDRADE JR., H.; KLOETZEL, J.** 1998. Influence of female gonadal hormones on the parasitemia of female *Calomys callosus* infected with the "Y" strain of *Trypanosoma cruzi*. Parasitol. Res. 2: 100-105.

- (7) **DO PRADO JR., J.C.; ANSELMO-FRANCI, J.; DE ANDRADE JR., H.; KLOETZEL, J.** 1999. Influence of male gonadal hormones on the parasitemia and humoral response of male

- Calomys callosus* infected with the “Y” strain of *Trypanosoma cruzi*. Parasitol. Res. 84: 826-829.
- (8) **FOSSUM, T.W.** 2009. Cirugía en pequeños animales. Tercera Edición. Barcelona, España. Edit. Elsevier. Pp 44-66.

 - (9) **FRÍAS, D.** 2010. A new species and karyotype variation in the bordering distribution of *Mepraia spinolai* (Porter) and *Mepraia gajardo* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) in Chile and its parapatric model of speciation. Neotrop Entomol. 39 (4):580-582.

 - (10) **GAERTNER, D.J.; HALLMAN, T.M.; HANKENSON, F.C.; BATCHELDER, M.A.** 2008. Chapter 10: Anesthesia and Analgesia for Laboratory Rodents. In: Anesthesia and Analgesia in Laboratory Animals, American College of Laboratory Animal Medicine Series. San Diego, USA. Edit. Academic Press. Pp 256-260.

 - (11) **KLEIN, S.L.** 2004. Hormonal and immunological mechanisms mediating sex differences in parasite infection. Parasite Immunol. 26: 247-264

 - (12) **LIBERT, C.; DEJAGER, L.; PINHEIRO, I.** 2010. The X chromosome in immune functions: when a chromosome makes the difference. Nat Rev Immunol. 10: 594 – 604.

 - (13) **LOURENÇO, A.M.; LEVY, A.M.; CAETANO, L.C.; CARRARO, A.M.; DO PRADO JR., J.C.** 2008. Influence sexual dimorphism on the persistence of blood parasites in infected *Calomys callosus*. Research in Veterinary Science (85) 515-521.

 - (14) **MALDONADO, A.** 2000. Identificación molecular de *Trypanosoma cruzi* en triatomíneos de tres ecótopos del estado de Colima. Tesis para obtener el grado de maestría en ciencias

médicas. Centro universitario de Investigaciones biomédicas. Facultad de Medicina, Universidad de Colima. México. Pp: 27-28.

- (15) **MUÑOZ, M.J.; MURCIA, L.; SEGOVIA, M.** 2011. The urgent need to develop new drugs and tools for the treatment of Chagas disease. *Expertos Rev contra Infect. Ther.* 9(1):5-7.

- (16) **PINEDA, M.H.; DOOLEY, M.P.** 2003. *Veterinary Endocrinology and Reproduction*. Iowa, EE.UU. Edit. Iowa State Press. Pp 283-290.

- (17) **PINTO, J.C.** 2006. Capítulo 4 Prevención, vigilancia y control de la enfermedad de Chagas en la Amazonia: Marcos generales. In: *Memorias de la 2° reunión de la iniciativa intergubernamental de Vigilancia y prevención de la enfermedad de Chagas en la Amazonía*. Centro Internacional de Investigaciones para el Desarrollo (IDRC), Canadá. Pp 11-12.

- (18) **PONZANO, P.** 2012. Evolución de la infección en dos cepas puras de ratones infectados experimentalmente con *Trypanosoma cruzi*. Tesis para obtener el grado de Médico Veterinario. Departamento de Medicina Preventiva Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile. Chile. Pp: 8-12.

- (19) **PURTILO, D.T.; SULLIVAN, J.L.** 1979. Immunological bases for superior survival of females. *Am J Dis Child.* 133: 1251 – 1253.

- (20) **RODRIGUES, J.; BORGES-PEREIRA, J.** 2010. Chagas disease: 100 years after its discovery. *Acta Trop.* 115: 5-13.

- (21) **ROMO, G.** 2012. Comparación de la infección experimental con *Trypanosoma cruzi* según sexo del hospedero en la cepa de ratón AKR. Tesis para obtener el grado de médico

veterinario. Departamento de Medicina Preventiva Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile. Chile. Pp: 5-15.

- (22) **SANMARTINO, M.** 2010. Presente, pasado y futuro de la problemática del Chagas. Bol. SEA. 21: 1-3.

- (23) **SANTOS, C.D.; LEVY, A.M.; TOLDO, M.P.; AZEVEDO, A.P.; PRADO JR., J.C.** 2007. Haematological and histopathological findings after ovariectomy in *Trypanosoma cruzi* infected mice. Vet Parasitol. Pp 222-228.

- (24) **SCHMUNIS, G.A.; YADON, Z.E.** 2010. Chagas disease: A Latin American health problem. Acta Trop. 115: 14-21.

- (25) **SCHUSTER, J.P.; SCHAUB, G.A.** 2001. Experimental Chagas disease: the influence of sex and psychoneuroimmunological factors. Parasitol Res. 87: 994-1000.

- (26) **SCHUSTER, J.P.; SCHAUB, G.A.** 2001. *Trypanosoma cruzi*: the development of estrus cycle and parasitemia in female mice maintained with or without male pheromones. Parasitol Res. 87: 994-1000.

- (27) **SUCKOW, M.A.; DANNEMAN, P.; BRAYTON, C.** 2001. The Laboratory Mouse. Washington D.C., USA. Edit. CRC Press LLC. Pp 10- 20.

- (28) **TAI, P.; WANG, J.; JIN, H.; SONG, X.; YAN, J.; KANG, Y.; ZHAO, L.; AN, X.; DU, X.; CHEN, X.; WANG, S.; XIA, G.; WANG B.** 2008. Induction of regulatory T cells by physiological level estrogen. J. Cell. Physiol (214): 456-464.

- (29) **VIGNAU, M.L.; VENTURINI, L.M.; ROMERO, J.R.; EIRAS, D.F.; BASSO, W.U.** 2005. Parasitología Práctica y Modelos de Enfermedades Parasitarias en los Animales Domésticos. Buenos Aires, Argentina. Facultad de Ciencias Veterinarias Universidad Nacional de La Plata. Pp 16- 18.

- (30) **WORLD HEART ORGANIZATION (WHO).** 2010. La enfermedad de Chagas (Tripanosomiasis americana) [en línea] <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/es/>>

- (31) **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.

- (32) **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.

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