



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

**ANÁLISIS HISTOPATOLÓGICO DE TEJIDO CARDIACO EN
RATONES EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS CON
*Trypanosoma cruzi***

ALDO CRUZ ROMERO

Memoria para optar al Título Profesional
de Médico Veterinario
Departamento de Patología Animal.

PROFESOR GUÍA: Dr. ULISES VERGARA C.

SANTIAGO, CHILE
2013



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

**ANÁLISIS HISTOPATOLÓGICO DE TEJIDO CARDIACO EN
RATONES EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS CON
*Trypanosoma cruzi***

ALDO CRUZ ROMERO

Memoria para optar al Título Profesional
de Médico Veterinario
Departamento de Patología Animal.

Nota Final(número).....(letras)....

Dr. Ulises Vergara

Dr. Julio Larenas

Dr. Claudio Zúñiga

PROFESOR GUÍA: Dr. ULISES VERGARA C.

SANTIAGO, CHILE
2013

AGRADECIMIENTOS

A quien primero debo agradecer es a la paciencia y apoyo de mi Madre, debido a que hizo los más increíbles esfuerzos para que yo lograra terminar mi carrera. A mi madre que es la persona más extraordinaria de todo el mundo. Gracias por el apoyo moral, tu cariño y comprensión que desde niño me has brindado, por guiar mi camino y estar junto a mí en los momentos más difíciles. Ya que por tu cariño, guía, persistencia y soporte, siempre me emplazaste a culminar este, uno de los primeros pasos profesionales en mi vida, que es para mí la mejor de las herencias.

Agradezco al Dr. Ulises Vergara por haber confiado en mí, por la paciencia y por la dirección en todo el transcurso de este trabajo. Al Dr. Zúñiga por los consejos y el apoyo que me brindó. Y al Dr. Julio Larenas por su paciencia, tiempo y ánimo que me mostro cada vez que lo visitaba preguntándole algo.

Además quiero agradecer a mi polola, mi pareja, mi amada compañera de vida, mi mejor amiga, Berta Acevedo, mil gracias por acompañarme en este proceso, por sobre todo, tu paciencia en todo este tiempo, por tu amor, tu comprensión y fortaleza que me permitieron, no sólo la realización de este proyecto, sino también que llegara a buen puerto. Siempre estás presente en mi mente con tu ingenuidad y forma de vivir. Amo vivir y ser contigo y amo por sobretodo saber que tu compañía se extenderá mucho más allá de este período.

A mi Hermana porque a pesar de la distancia, el ánimo, apoyo y alegría que me brinda me dan la fortaleza necesaria para seguir adelante.

A mis amigos que han seguido atentos el avance de esta tesis, para saber cuándo celebraremos, así que gracias por su paciencia y espera.

Finalmente quiero comentar que para mí este proyecto ha tenido un increíble valor pedagógico y didáctico, aun siendo una investigación modesta, me ha permitido ampliar mis conocimientos y más aún, sentirme muy bien como individuo, es por esto que puedo llegar a comprender lo apasionante que debe ser trabajar en el desarrollo de la ciencia de forma profesional, dedicarse a contribuir a la humanidad con nuevos conocimientos y a hacer que la sociedad se desarrolle gracias a lo que yo y otros de mi generación podamos llegar a imaginar.

Resumen

Ratones de la cepa ACA fueron experimentalmente infectados con 2.000 trypomastigotes sanguíneos de la cepa Tulahuén o de la cepa Munantá de *Trypanosoma cruzi* para evaluar prepatencia, niveles de parasitemia, mortalidad acumulada y establecer su eventual correlación con el número de pseudoquistes y la magnitud del daño inflamatorio, en el tejido cardiaco de los ratones así infectados. Mientras los ratones infectados con la cepa Tulahuén mostraron una prepatencia sanguínea de cinco días, con un nivel máximo de parasitemia de sólo $14,8 \times 10^5 \pm 2,21 \times 10^5$ parásitos/mL alcanzado a los 11 días y 100% de mortalidad acumulada a los 21 días post infección, los ratones infectados con la cepa Munantá mostraron una prepatencia de siete días, un nivel máximo de parasitemia de $41,57 \times 10^5 \pm 2,61 \times 10^5$ parásitos/mL ($p < 0,001$), alcanzado a los 17 días y 75% de sobrevivencia más allá de los seis meses de infección ($p < 0,0002$). El número de pseudoquistes y la magnitud del daño tisular observado en los ratones infectados con la cepa Munantá no fueron diferentes de lo obtenido en los ratones infectados con la cepa Tulahuén durante los primeros 15 días de infección. Sin embargo mientras en los ratones infectados con la cepa Tulahuén se observó un aumento significativo en el número de pseudoquistes ($p < 0,01$) y en la magnitud del infiltrado inflamatorio mononuclear y del daño tisular ($p < 0,05$) a los 19 días de infección, los ratones infectados con la cepa Munantá, mostraron no sólo una disminución en el número de pseudoquistes y de células inflamatorias mononucleares, sino también una lenta reparación del daño tisular

Palabras clave: Enfermedad de Chagas, cepas de *Trypanosoma cruzi*, estudio histopatológico, infiltrado inflamatorio

Abstract

Mice from the ACA inbred strain were experimentally infected with 2000 blood trypomastigotes from the Tulahuén or Munantá strain of *Trypanosoma cruzi* not only to evaluate prepatency, parasitemia levels and accumulated mortality, but also to establish their eventual association with the number of pseudocysts, the inflammatory cell infiltrates and the severity of tissue damage in the heart of infected animals.. While Tulahuén infected mice showed a prepatent period of five days, a maximum parasitemia level of only $14,8 \times 10^5 \pm 2,21 \times 10^5$ parasites/mL on day 11 of infection and 100% of accumulated mortality after 21 days of initial infection, the Munantá infected mice showed a prepatent period of seven days, a maximum parasitemia level of $41,57 \times 10^5 \pm 2,61 \times 10^5$ parasites/mL ($p < 0,001$), at 17 days after infection and 75% of survival longer than six months of infection ($p < 0,0002$). The

pseudocysts number and the severity of tissue damage observed in the Munantá infected mice were no different from that obtained in the Tulahuén infected mice, during the first 15 days of infection. However, in the Tulahuén infected mice a significant increase in pseudocyst number ($p < 0, 01$), the rate of inflammatory cell infiltrates and the severity of tissue damage ($p < 0, 05$) was observed on day 19 of *T. cruzi* infection, while the animals infected with the Munantá strain, showed not only a decreased number of pseudocysts and inflammatory cells, but also a long term recovery of tissue damage.

Key words: Chagas disease, *Trypanosoma cruzi* strains, histopathological study, inflammatory infiltrate.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas, constituye un importante problema de salud pública en América. Según la Organización Panamericana de la Salud (OPS), la Enfermedad de Chagas es, después de la malaria, la enfermedad parasitaria más importante en Latinoamérica, existiendo entre 16 a 18 millones de personas infectadas y cerca de 80 millones en riesgo de infección. Se estima que, dada su condición endemo-zoonótica, la enfermedad presenta un millón de nuevos casos por año y causa, anualmente, la muerte de 45.000 personas en esta región del continente americano (Morocoima *et al.* 2012, Rodríguez y Albajar, 2010).

El agente causal de la Enfermedad de Chagas, es el protozoo hemoflagelado *Trypanosoma cruzi* que, debido a la elevada diversidad genética de sus distintos aislados o cepas, muestra virulencia y patogenicidad variable para los distintos hospederos. A pesar que la enfermedad se encontraba inicialmente restringida sólo al continente americano (desde el sur los Estados Unidos, hasta el paralelo 41°, latitud sur, en Chile y Argentina), la globalización del comercio y el aumento de las migraciones, la han convertido, hoy en día, en un problema latente de salud, tanto para la comunidad europea como para el resto del mundo (Rodríguez y Albajar, 2010, Clayton 2010).

Una de las características biológicas más llamativas del parásito *T. cruzi* es la gran cantidad de insectos vectores y de hospederos mamíferos involucrados en su complejo ciclo de vida, lo que complica su control y eventual erradicación. Por otra parte, no existe todavía una vacuna efectiva que permita controlar la infección y/o la enfermedad y el tratamiento

farmacológico no es totalmente efectivo y no está exento de serios efectos secundarios que amenazan la continuidad de su administración.

En condiciones naturales, el parásito es capaz de infectar a numerosas especies de mamíferos tanto domésticos como silvestres y, desde el punto de vista experimental, el modelo murino se ha convertido en uno de los modelos más exitosos o más ampliamente utilizados. Debido al fácil manejo de los animales y porque imita en muchos aspectos de la enfermedad humana, incluyendo el daño tisular y los mecanismos efectores de respuesta inmune involucrados en el control del parásito (Andrade y Magalhaes, 1996, Andrade et al., 2002). Por otra parte, distintas cepas puras 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 parasitemia, de la naturaleza y magnitud del daño tisular y de la supervivencia de los animales infectados. Sin embargo, aun cuando se ha estudiado el rol de diversos factores dependientes tanto del parásito como del hospedero en la evolución de la enfermedad, aún no se ha logrado establecer, con certeza, los factores directamente involucrados en los fenómenos de resistencia o susceptibilidad a la infección (Zúñiga *et al.*, 2012a, b, Zúñiga *et al.*, 2007b, Andrade et al., 1999, Zúñiga *et al.*, 1998).

En el presente trabajo, se analizó la evolución de la infección en ratones ACA experimentalmente infectados con la cepa Tulahuén o la cepa Munantá de *Trypanosoma cruzi*, evaluando la prepatencia, niveles de parasitemia y mortalidad y su correlación con el número de pseudoquistes y la magnitud del daño inflamatorio, en el tejido cardiaco de los ratones infectados.

MATERIALES Y MÉTODOS

Parásitos. La infección experimental, previa al análisis histopatológico realizado en el presente trabajo, se realizó utilizando tripomastigotes sanguíneos de la cepa Tulahuén originalmente aislada de humano en la región de Coquimbo, Chile y de la cepa Munantá, aislada originalmente en 1995 del vector *Rhodnius prolixus*, en la región de Boyacá, Colombia (Zúñiga *et al.*, 2007). Estos parásitos se han mantenido *in vivo* en el bioterio de la Unidad de Inmunología de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, mediante el traspaso semanal de tripomastigotes en ratones Balb/c.

Ratones Se utilizaron dos grupos de 15 ratones hembras de 10 semanas de edad, de la cepa A.CA, que proviene originalmente de Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, U.S.A. Los

ratones Balb/c utilizados en el traspaso semanal de parásitos *in vivo*, provienen del Bioterio del Campus Occidente, de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

Modelo de infección experimental. Para la obtención de parásitos, se extrajo 0,6 mL de sangre mediante punción cardiaca de un ratón Balb/c infectado con la cepa Tulahuén o de un ratón Balb/c infectado con la cepa Munantá de *T. cruzi*, y sacrificados cumpliendo con las normas bioéticas establecidas en el Manual de Normas de Bioseguridad de la Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica (CONICYT), Chile. La sangre extraída se colocó en un tubo estéril conteniendo 0,1 mL de citrato de sodio, como anticoagulante. Luego se realizó una dilución de 10 uL de sangre infectada en 490 uL de suero fisiológico estéril y se hizo un recuento de parásitos en cámara de Neubauer. Este procedimiento permitió determinar la cantidad total de parásitos en los 0,6 mL de sangre, extraídos del ratón experimentalmente infectado. Posteriormente se realizaron las diluciones requeridas para obtener 2.000 parásitos en 0,2 mL que fue, finalmente, la cantidad y volumen inoculado por vía intraperitoneal, en cada uno de los ratones de los grupos experimentalmente infectados. Se utilizó, además, como control negativo un grupo de 5 ratones hembras de la cepa ACA de 10 semanas de edad, que fueron inoculados con 0,2 mL de sangre de ratones Balb/c no infectados y diluida similar a los grupos infectados. Estos ratones se sangraron en forma paralela a los grupos experimentalmente infectados, para establecer que las alteraciones y eventual muerte de los animales experimentales se debía a la infección con *T.cruzi* y no a variables como una eventual anemia provocada por las sucesivas sangrías.

Estudio de Parasitemia. Con el fin de determinar prepatencia (primer día de determinación de parásitos en sangre) y niveles de parasitemia, los animales infectados se sangraron, desde la vena caudal, cada dos días a partir del tercer día postinfección (p.i) y se analizaron hasta la muerte de los ratones o la negatividad en los niveles de parásitos en circulación. La sangre se recolectó en tubos de micro hematocrito heparinizados, las muestras se centrifugaron a 700 g por 5 minutos, para luego de reposar por 30 minutos en estufa a 37° C, medir el volumen de sangre en cada tubo. Finalmente, cada una de las muestras se colocó en un portaobjeto para determinar el número de parásitos en 50 campos elegidos al azar y utilizando un aumento de 400x. Los resultados se expresaron como el promedio de parasitemia del grupo y la desviación estándar correspondiente, de acuerdo al método descrito por De Arias y Ferro (1988).

Estudio histopatológico. Para analizar la severidad del daño tisular y cuantificar el número de células infectadas y el infiltrado inflamatorio mononuclear, se utilizaron muestras de tejido cardíaco de ratones sacrificados los días 7, 15 y 19 p.i. en el grupo infectado con la cepa Tulahuén y de ratones sacrificados los días 7, 15, 19 y 23 p.i., en el grupo infectado con la cepa Munantá de *T. cruzi*. Los tejidos fueron fijados en Bouin-formalina e incluidos en parafina, se utilizaron para realizar cortes de 5 μm , los que se tiñeron luego con hematoxilina-eosina. Finalmente, utilizando un aumento de 400X, se determinó la magnitud y características del daño tisular, el número de células infectadas (pseudoquistes), el número de células inflamatorias mononucleares y la eventual presencia de tejido fibroso, en 50 campos elegidos al azar (Cruz-Zetina *et al.*, 2012)

La captura y digitalización de imágenes se realizó utilizando el programa Motic Images 2.0, y la cuantificación de células se realizó a partir de las imágenes capturadas, utilizando el Programa ImageJ (NationalInstitute of Health, USA.)

Análisis estadístico. Los resultados de los niveles máximos de parasitemia, se analizaron mediante un análisis de varianza. El análisis de supervivencia se realizó de acuerdo al método de Kaplan y Meier (1958). Los resultados del análisis cuantitativo de células inflamatorias se realizaron utilizando el programa Image J.

RESULTADOS

Niveles de parasitemia y mortalidad acumulada. En la Figura 1 se muestran los niveles de parasitemia como una forma de expresión del desarrollo de la infección en los ratones de la cepa ACA, infectados experimentalmente con tripomastigotes sanguíneos de las cepas Tulahuén y Munantá de *T. cruzi*. El período de prepatencia sanguínea fue de cinco días para la cepa Tulahuén y de siete días para la cepa Munantá. En relación al nivel máximo de parasitemia, este se detectó a los 11 días post infección con la cepa Tulahuén ($14,8 \times 10^5 \pm 2,21 \times 10^5$ parásitos/mL), mientras en el grupo de ratones infectados con la cepa Munantá el nivel máximo de parasitemia se obtuvo a los 17 días post infección, alcanzando $41,57 \times 10^5 \pm 2,61 \times 10^5$ parásitos/mL.

La Figura 2 muestra que los ratones infectados con la cepa Tulahuén, presentaron un 100% de mortalidad acumulada a los 21 días p.i., mientras los ratones infectados con la cepa Munantá,

no sólo presentaron un 25% de mortalidad en el mismo período, sino que el 75% de los animales infectados tuvo una supervivencia que se extendió más allá de los seis meses post infección inicial, a pesar de los valores significativamente más altos ($p < 0,0001$) en los niveles de parasitemia, que se detectaron hasta los 41 días post infección (Figura 1).

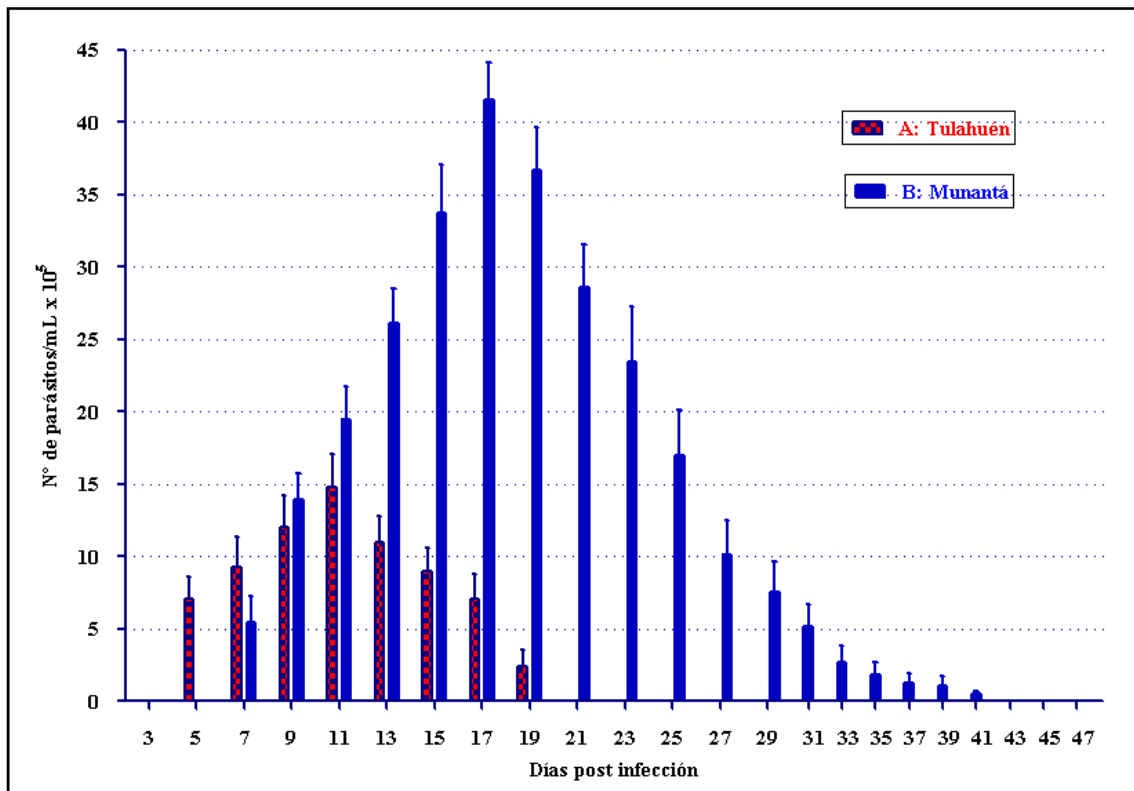


Figura 1. Evolución de los niveles de parasitemia en ratones ACA infectados con 2000 tripomastigotes sanguíneos de la cepa Tulahuén (A) y de la cepa Munantá de *T. cruzi* (B).

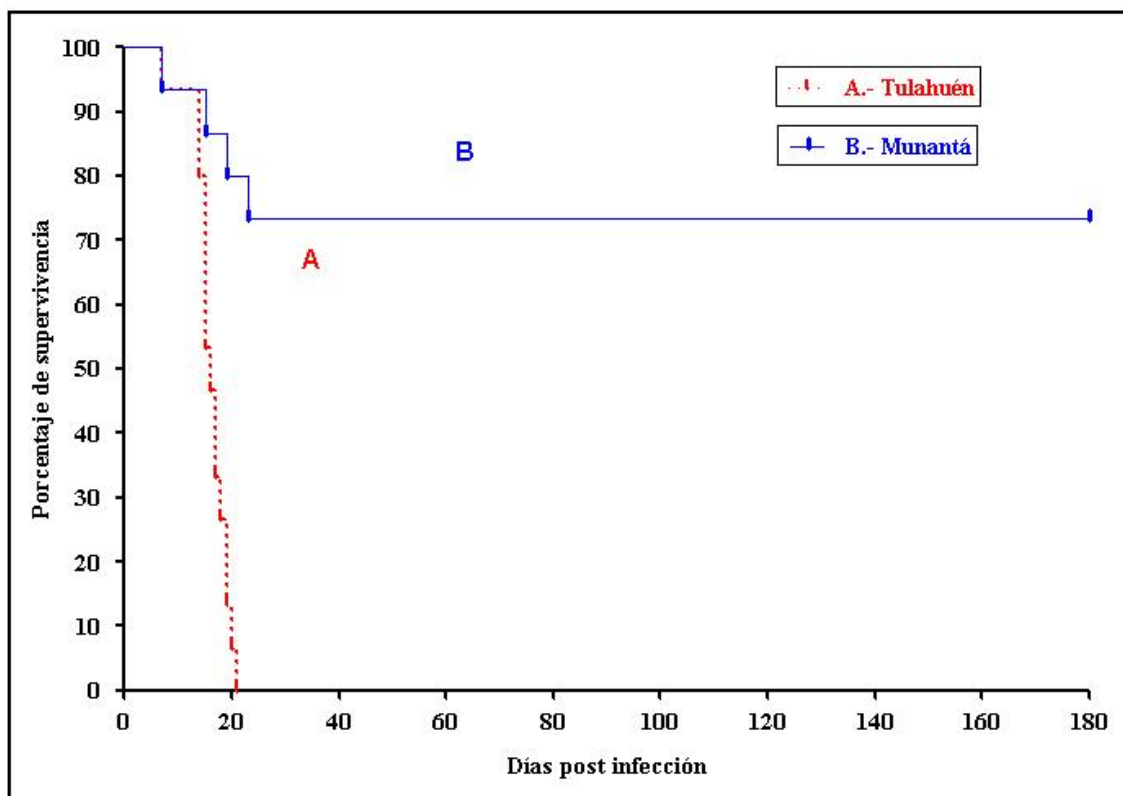


Figura 2. Porcentaje de supervivencia en ratones ACA infectados con 2000 tripomastigotes sanguíneos de la cepa Tulahuén (A) y de la cepa Munantá de *T. cruzi* (B), de *T. cruzi*. La diferencia en las curvas de supervivencia de estos grupos de ratones es estadísticamente significativa ($p < 0,0002$). Los ratones infectados con la cepa Tulahuén alcanzaron 100% de mortalidad a los 21 días post infección, mientras el 75% de los ratones infectados con la cepa Munantá, presentó una supervivencia que se extendió más allá de los seis meses de edad.

Estudio histopatológico. La magnitud del daño tisular que acompaña el desarrollo de la infección con el parásito, se evaluó mediante la comparación de las lesiones histopatológicas observadas en 50 campos elegidos al azar en las muestras de tejido cardíaco de los ratones infectados con las cepas Tulahuén y Munantá de *T. cruzi*.

Al día siete post infección (Figura 3), aun cuando ambos grupos de ratones mostraron sólo lesiones moderadas, leve inflamación, degeneración de Zenker (Matteson, 1998) y escaso número de pseudoquistes, (cuya comparación se muestra en la Figura 6), en los ratones infectados con la cepa Tulahuén se observó un mayor infiltrado inflamatorio y la degeneración de Zenker muestra leves disrupciones en las fibras musculares (Figura 3A).

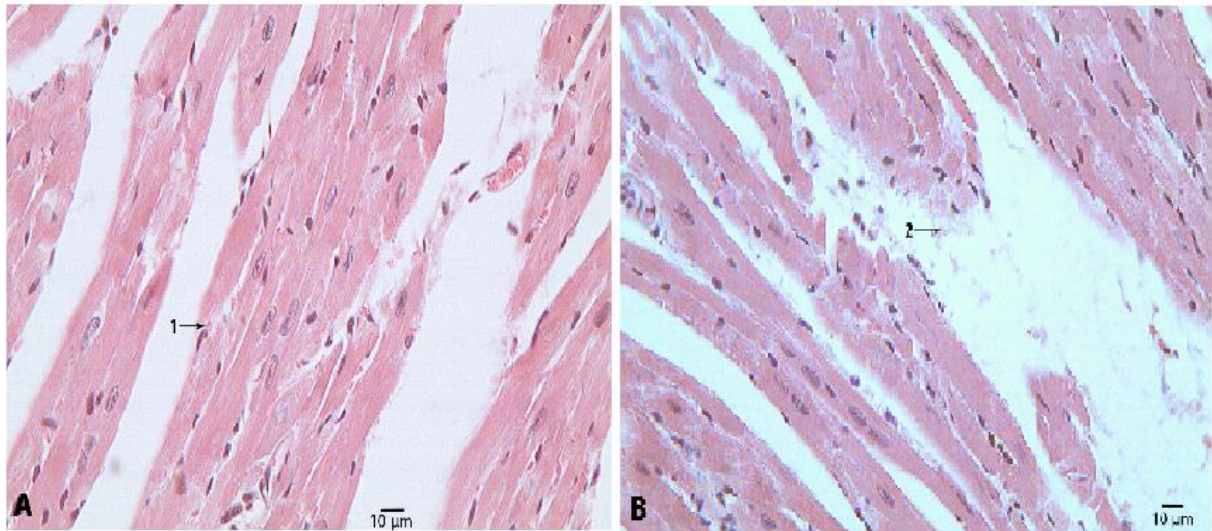


Figura 3. Tejido cardiaco de ratones ACA infectados con la cepa Munantá (A) y con la cepa Tulahuén (B), al día siete post infección inicial. En el tejido infectado con la cepa Munantá (A), se observa degeneración de Zenker de algunas fibras cardiacas (1), mientras el tejido infectado con la cepa Tulahuén (B), muestra ruptura de las fibras musculares (2). Tinción HE. Aumento 400X.

La Figura 4 muestra que los ratones infectados con la cepa Tulahuén (B), presentaron mayor daño tisular, que el tejido cardiaco de los ratones infectados con la cepa Munantá (A), de *T. cruzi*.

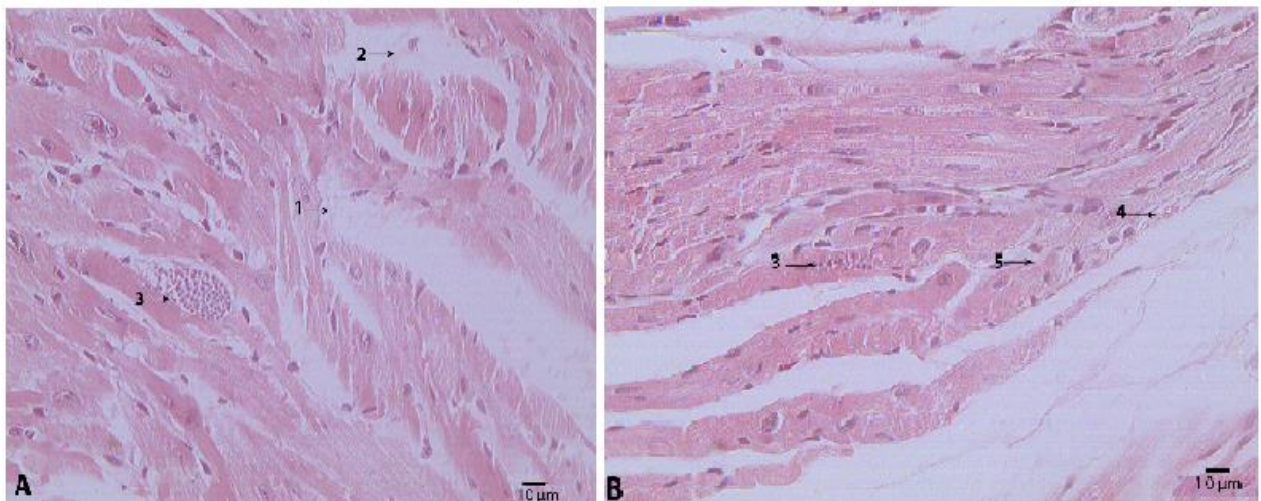


Figura 4.- Tejido cardiaco de ratones infectados con la cepa Munantá (A) y la cepa Tulahuén (B) al día15 postinfección experimental. Se observa degeneración de Zenker (1) y disrupción de fibras musculares (2) en los ratones infectados con la cepa Munantá (A), mientras los ratones infectados con la cepa Tulahuén (B), muestran un mayor número de pseudoquistes (3), neovascularización (4) y la puesta en marcha de procesos de reparación (5). Tinción HE. Aumento 400X.

Al día 19 post infección, los ratones infectados con la cepa Munantá (Figura 5A), presentaron un número significativamente más bajo de pseudoquistes ($p < 0,01$), (Figura 6), que los ratones infectados con la cepa Tulahuén (Figura 5B), los que además presentaron gran inflamación, zonas de neovascularización y fibrosis, pérdida de la continuidad estructural de las fibras cardíaca, necrosis, presencia de fibroblastos y zonas de reparación tisular (Figura 5B)

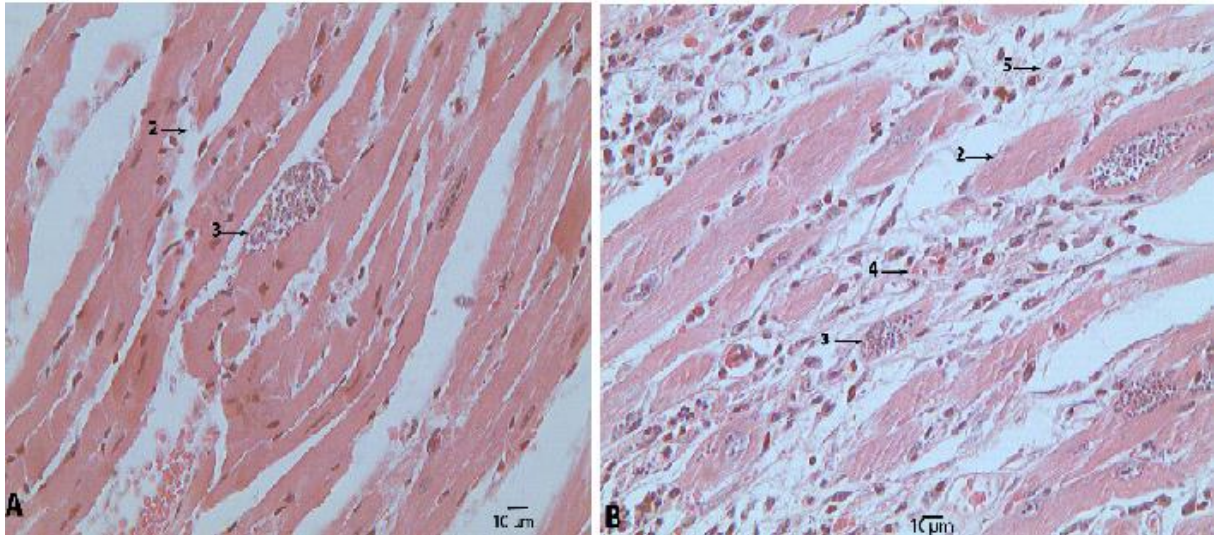


Figura 5 Tejido cardíaco al día 19 post infección. Los ratones infectados con la cepa Munantá (A), mostraron un número significativamente más bajo de pseudoquistes (3) que los ratones infectados con la cepa Tulahuén (B). En el tejido cardíaco de estos últimos se observó además de la pérdida de la continuidad estructural de las fibras cardíacas (2), necrosis y procesos reparativos con neovascularización (4) y aparición presencia de fibroblastos (5). Tinción HE. Aumento 400X.

Al día 23 sólo sobrevivían ratones infectados con la cepa Munantá y en las muestras de tejido cardíaco se observó una clara disminución en el número de pseudoquistes, alcanzando un valor promedio de $0,3 \pm 0,7$ células parasitadas, que resulta claramente inferior al número de $0,70 \pm 1,01$ pseudoquistes, alcanzado a los 7 días postinfección (Figura 6).

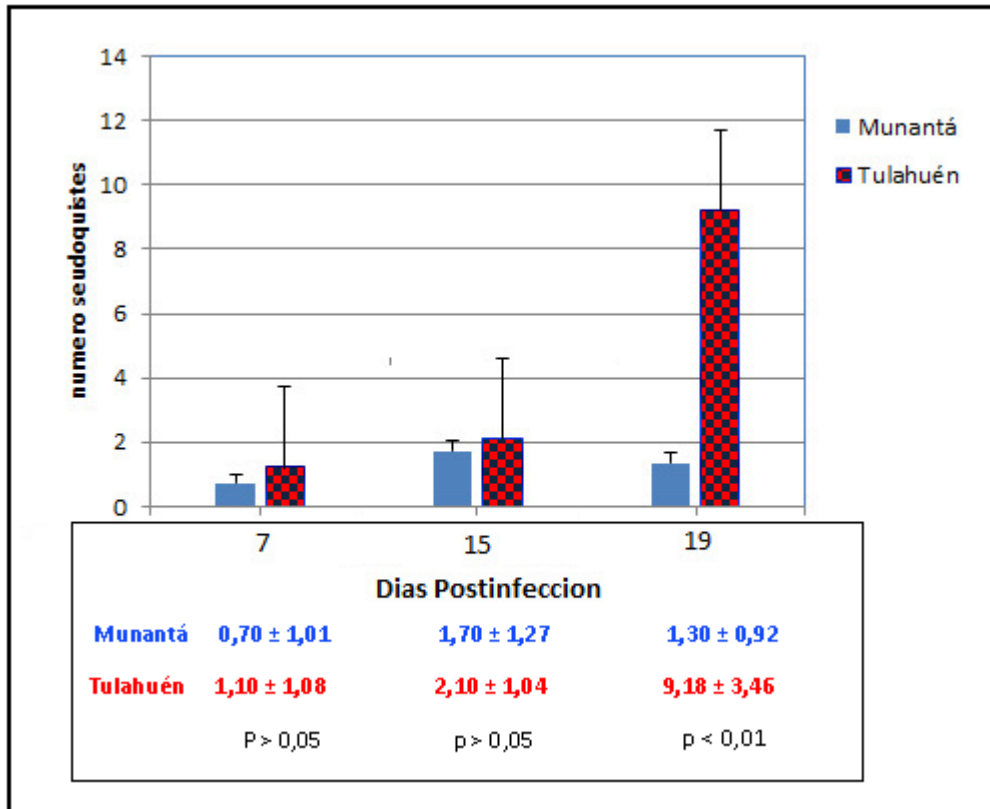


Figura 6. Evolución del número de pseudoquistes en el tejido cardiaco de ratones ACA infectados con 2.000 trypomastigotes sanguíneos de las cepas Tulahuén y Munantá de *T. cruzi*. A los días 7 y 15 post infección no existen diferencias significativas ($p > 0,05$) en el número de pseudoquistes entre ambos grupos de ratones, al Examen microscópico directo de 50 campos elegidos al azar, Sin embargo, al día 19 post infección los ratones infectados con la cepa Tulahuén presentaron un número significativamente más alto de pseudoquistes ($p < 0,01$), que los ratones infectados con la cepa Munantá

La Figura 7 muestra un corte de tejido cardiaco a los siete días de infección con la cepa Munantá de *T. cruzi*. Se observa un leve daño tisular, escaso infiltrado inflamatorio mononuclear y ausencia de pseudoquistes al examen microscópico directo (A). Sin embargo, al analizar digitalmente el mismo campo tisular utilizando el Programa Image J, se observó, como muestra el histograma, un elevado número de pseudoquistes, puesto que el programa parece identificar como tales a los núcleos celulares. Por otro lado, resultó técnicamente imposible ajustar los pixeles a valores que permitieran al programa, evitar la confusión entre pseudoquistes y núcleos celulares.

En la Figura 8 se muestran los resultados obtenidos al comparar, al examen microscópico directo, el infiltrado inflamatorio en 50 campos, elegidos al azar, en el tejido cardiaco de ratones infectados con 2.000 trypomastigotes sanguíneos de la cepa Tulahuén y de la cepa Munantá de *T. cruzi*. A los días 7 y 15 post infección no se observaron diferencias

significativas ($p > 0,05$) al comparar el número de células inflamatorias mononucleares, en ambos grupos de ratones. Sin embargo, al día 19 post infección los ratones infectados con la cepa Tulahuén presentaron un número significativamente más alto ($p < 0,01$), que los ratones infectados con la cepa Munantá.

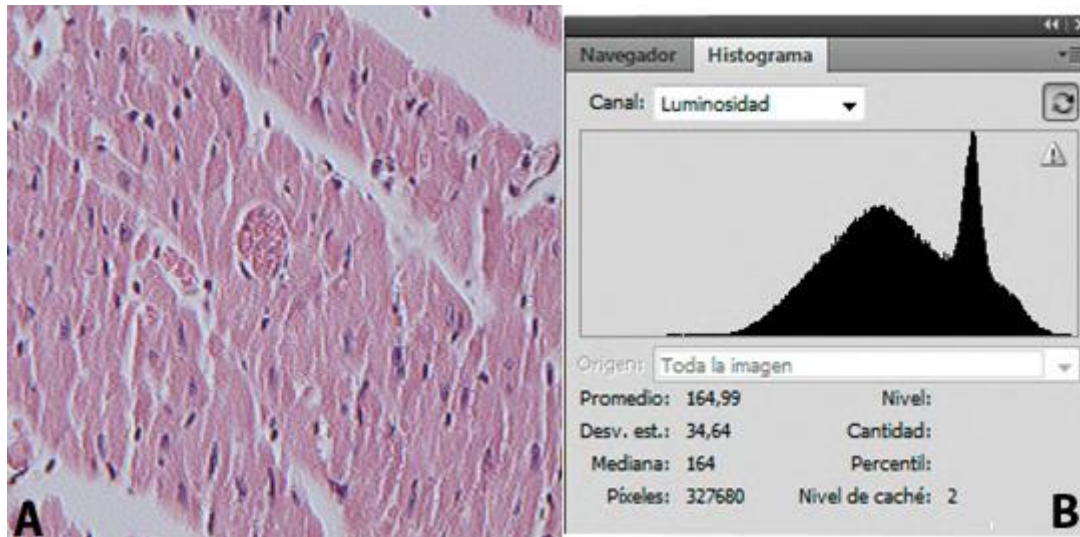


Figura 7. Corte de tejido cardiaco a los siete días de infección con la cepa Munantá de *T. cruzi*. Se observa un leve daño tisular, escaso infiltrado inflamatorio y ausencia de pseudoquistes, al examen microscópico directo (A). Sin embargo al analizar digitalmente el mismo campo tisular utilizando el Programa Image J (B), el histograma muestra un elevado número de pseudoquistes, puesto que parece identificar como tales a los núcleos celulares. Tinción HE. Aumento 400X

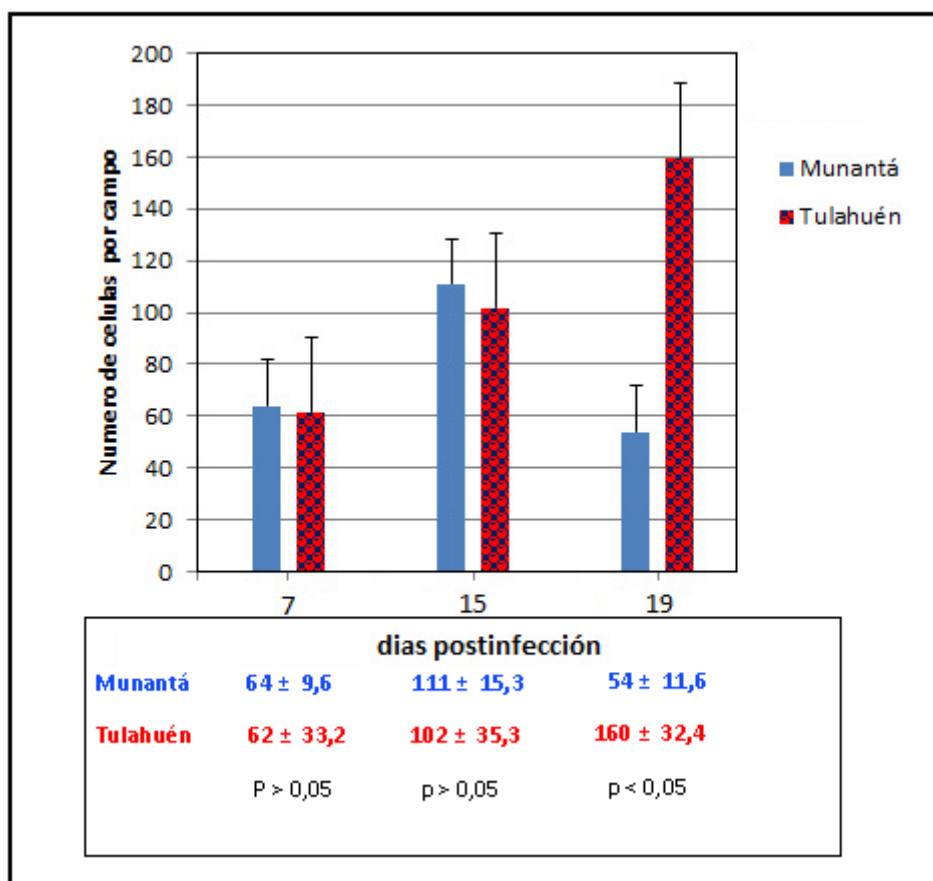


Figura 8. Evolución del infiltrado mononuclear, al examen microscópico directo, del tejido cardíaco de ratones ACA infectados con 2.000 trypomastigotes sanguíneos de las cepas Tulahuén y Munantá de *T. cruzi*. En las primeras dos semanas de infección, no se observaron diferencias significativas en el número de células inflamatorias mononucleares, en ambos grupos de ratones. Sin embargo, al día 19 post infección los ratones infectados con la cepa Tulahuén presentaron un infiltrado significativamente más elevado ($p < 0,01$), que los ratones infectados con la cepa Munantá

En la Figura 9 se muestran los resultados obtenidos al comparar digitalmente, utilizando el Programa Image J, el infiltrado inflamatorio del tejido cardíaco de ratones infectados con 2.000 trypomastigotes sanguíneos de la cepa Tulahuén y de la cepa Munantá de *T. cruzi*. A los días 7 y 15 post infección no se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$) en el número de células inflamatorias mononucleares, en ambos grupos de ratones. Sin embargo, al día 19 post infección los ratones infectados con la cepa Tulahuén presentaron un número significativamente más alto de células inflamatorias ($p < 0,01$), que los ratones infectados con la cepa Munantá.

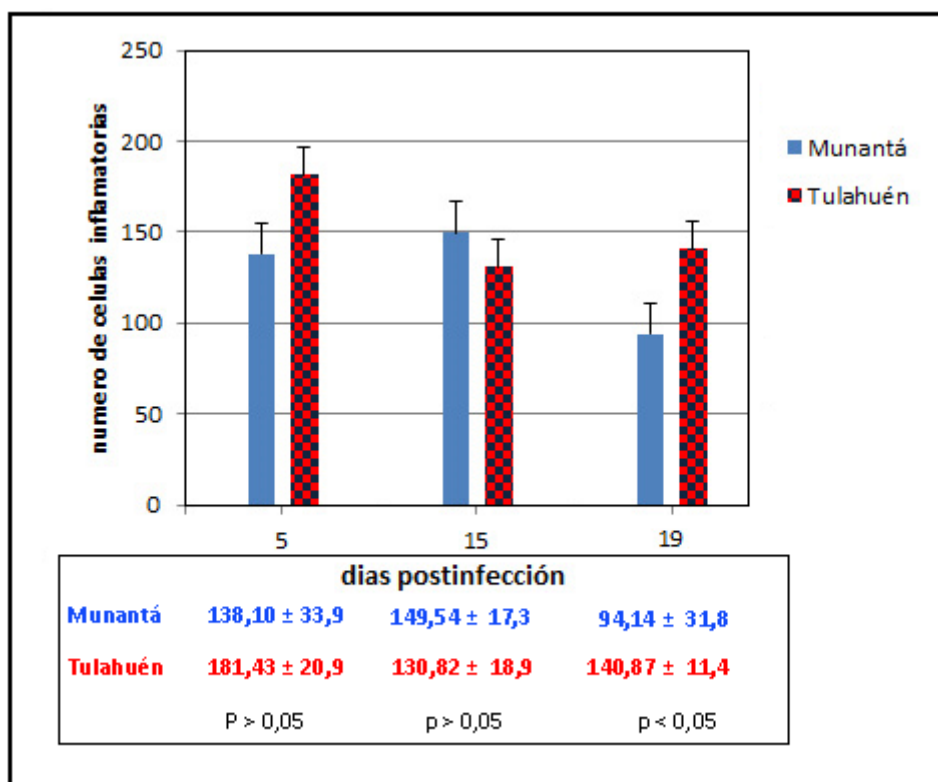


Figura 9. Análisis mediante el Programa Image J, del infiltrado mononuclear en el tejido cardiaco de ratones ACA infectados con 2.000 trypomastigotes sanguíneos de las cepas Tulahuén y Munantá de *T. cruzi*. En las dos primeras semanas de infección, no se observaron diferencias significativas en el número de células inflamatorias mononucleares, en ambos grupos de ratones. Sin embargo, al día 19 post infección los ratones infectados con la cepa Tulahuén presentaron un infiltrado significativamente más alto ($p < 0,05$), que los ratones infectados con la cepa Munantá.

DISCUSION

Desde luego, uno de los aspectos más sorprendentes de la enfermedad de Chagas es la compleja red de eventos que parece acompañar, tanto el desarrollo de una respuesta inmune protectora, como el desarrollo de una respuesta autoinmune (Kierszenbaum, 1999, Kierszenbaum, 2005), que conduce a daño tisular, a medida que progresa el curso de la infección y/o de la enfermedad. (Zúñiga *et al.*, 1998, Zúñiga *et al.*, 2012b). Así, los resultados de mortalidad acumulada en los ratones ACA aquí infectados con *T. cruzi*, muestran que la cepa Tulahuén es altamente virulenta para estos ratones, produciendo la muerte del 100% de los animales dentro de las tres semanas postinfección, a pesar que el nivel máximo de parasitemia fue significativamente más bajo ($p < 0,001$) que el nivel máximo observado en los ratones infectados con la cepa Munantá, que alcanzaron además una sobrevivencia del 75%, que se extendió más allá de los seis meses post infección.

El análisis histopatológico permitió confirmar que, como ya se ha sugerido, el parasitismo intracelular y el daño tisular producido por el infiltrado inflamatorio dependen no sólo del repertorio genético del hospedero sino también de las características biológicas del aislado o cepa del parásito utilizado en la infección experimental (Zúñiga et al., 1998). Los resultados aquí obtenidos muestran que, a pesar que en las primeras dos semanas de infección ambos grupos de ratones presentaban sólo un leve daño tisular y un escaso número de pseudoquistes y de células inflamatorias en el tejido cardiaco, los ratones infectados con la cepa Tulahuén acumulaban una mortalidad del 50%, significativamente más elevada que el escaso 13% de mortalidad acumulado en los ratones infectados con la cepa Munantá a pesar del elevado nivel de parásitos libres que ellos presentaban en circulación sanguínea en el mismo periodo. Por otro lado, los resultados sugieren que, al menos al día 19 post-infección, existiría una correlación entre el parasitismo intracelular (pseudoquistes), la magnitud del infiltrado inflamatorio mononuclear, la severidad del daño en el tejido cardiaco (pérdida de estriaciones, hiperemia y focos necróticos) y la mortalidad de los ratones infectados con la cepa Tulahuén, a pesar del bajo nivel de parasitemia, de manera tal que no siempre existe una correlación entre los niveles de parasitemia y la resistencia o susceptibilidad a la infección con *T. cruzi* (Minoprio et al. 1989, Hoft et al. 1993, Zúñiga et al. 2002).

En humanos la transición desde la fase aguda a la fase crónica, va acompañada de una disminución del número de parásitos libres en el torrente sanguíneo como consecuencia del desarrollo de una respuesta inmune relativamente eficiente que logra mantener el número de parásitos por debajo de niveles detectables en el hospedero. Sin embargo, es precisamente durante la fase crónica de la enfermedad que los pacientes desarrollan las formas más severas de la infección. De esta manera, aun cuando se desconoce qué factores determinan la severidad de las distintas formas clínicas de la enfermedad, se puede sugerir que en nuestro modelo de infección experimental en una misma cepa de ratones con dos cepas distintas de *T. cruzi*, la diferencias en la evolución y consecuencias de la infección parasitaria estaría asociada a las distintas características biológicas de las cepas Tulahuén y Munantá. Así, la infección en ratones ACA con tripomastigotes sanguíneos de la cepa Tulahuén, a pesar de inducir una respuesta inmune que logra inicialmente controlar los niveles de parasitemia, ella no sólo resulta insuficiente en el control del parasitismo tisular, sino que puede contribuir al reclutamiento y activación de las células inflamatorias asociadas al daño cardiaco y al eventual daño neuronal y fibrilación ventricular, que es la causa más frecuente de muerte

súbita en los pacientes chagásicos (Rassi Jr. et al., 2001), situación que no se produciría en los ratones aquí infectados con la cepa Munantá de *T. cruzi*.

REFERENCIAS

ANDRADE, LO, MACHADO CR., CHIARI, E, PENA, SD. MACEDO, AM. 1999. Differential tissue distribution of diverse clones of *Trypanosoma cruzi* in infected mice Mol. Biochem. Parasitol. 100:163-172.

ANDRADE, LO., MACHADO, CR., CHIARI, E., PENA, SD., MACEDO, AM. 2002. *Trypanosoma cruzi*: role of the host genetic background in the differential tissue distribution of parasite clonal populations Exp. Parasitol. 100: 269-275.

ANDRADE, S.G., MAGALHAES, J.B. 1996. Biodemes and zymodemes of *Trypanosoma cruzi* strains: correlations with clinical data and experimental pathology. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 30: 27-35.

CLAYTON J. 2010. Chagas disease 101. Nature 465: S4-S5

CRUZ-ZETINA, G., DEL RIO-RODRIGUEZ, R., RAMOS-LIGONIO, A., LOPEZ, R., MONTEON, V. 2012. Short Report. Decreased Intensity of Inflammation in Benznidazole Treated Mice Inoculated with *Trypanosoma cruzi* I Stocks from Mexico and Persistence of Circulating Parasites. Am. J. Trop. Med. Hyg. 87: 671– 674.

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

HOFT, D., LINCH, R., KIRCHOFF, L. 1993. Kinetics analysis of antigen-specific immune response in resistant and susceptible mice during infection with *Trypanosome cruzi*. J. Immunol. 151: 7038-7047.

KAPLAN, E., MEIER, P. 1958. Non parametric estimation from incomplete observations. J. Am. Stat. Assoc. 53: 457-481

KIERSZENBAUM, F. 1999. Chagas disease and the autoimmunity hypothesis Clin. Microbiol. Rev. 12: 210-223.

KIERSZENBAUM, F. 2005. Where do we stand on the autoimmunity hypothesis of Chagas disease. Trends Parasitol. 21: 513-516.

MATTESON, E. 1998. Polyarteritis nodosa and microscopic polyarteritis: translation of the original articles on classic polyarteritis nodosa by Adolf Kuddmaul and Rudolf Maier in Microscopic Polyarteritis Nodosa, edited by Friedrich Wohlwill. Rochester, Minnesota, Mayo Prees.

MINOPRIO, P., ITOHARA, S., HEUSSER, C., TONEGEAWA, A., COUTINHO, A. 1989. Immunobiology of murine *T. cruzi* infection: The predominance of parasite-nonspecific response and the activation of TCR1 cells. Immunol. Rev. 12:183-207

MOROCOIMA, A., SOCORRO, G., AVILA, R., HERNANDEZ, A., MERCHAN, S., ORTIZ, D., PRIMAVERA, G., CHIQUE, J., HERRERA, L., URDANETA-MORALES, S. 2012. *Trypanosoma cruzi*: experimental parasitism in the central nervous system. Parasitol. Res. 111: 2099-2107

RASSI JR. A., RASSI, S.G., RASSI, A. 2001. Sudden death in Chagas disease. Arq. Bras. Cardiol. 76: 75-96.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. 2010. La enfermedad de Chagas (Tripanosomiasis americana) [en línea] <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/es/>>[20-11-2012]

ZUÑIGA 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.

ZUÑIGA, 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.

ZUÑIGA, C., CEPEDA, R., PALAU, M.T., VERA, A., MEJIA, 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 39: 77-82.

ZUÑIGA, C., BINDER, N., PALAU, M.T., LARENAS, J., VERGARA, U. 2012a. Edad del hospedero en la infección con *Trypanosoma cruzi*. Rev. Ibero-Latinoam. Parasitol. 71: 23 -33.

ZUÑIGA, C.; PONZANO, P.; ROMO, G.; PALÁU, M.T.; LARENAS, J.; GARCÍA, A.; VERGARA, U. 2012b. Diagnóstico molecular de la infección con *Trypanosoma cruzi* en ratones. Rev. Ibero-Latinoam. Parasitol. 71: 117-124.