



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE MEDICINA VETERINARIA



“ESTUDIO DE LA PATOGÉNESIS PRODUCIDA POR
Trypanosoma cruzi EN UN MODELO MURINO, UTILIZANDO LA
TÉCNICA DE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA E
HISTOPATOLOGÍA EN EL ANÁLISIS DE DIVERSOS TEJIDOS”

MARÍA ANGÉLICA PAINEMAL NAHUEL

Memoria para optar al Título Profesional
de Médico Veterinario

Departamento de Medicina Preventiva
Animal

PROFESOR GUÍA: ALEJANDRO GARCÍA CARREÑO T.M Ms. Cs.

SANTIAGO - CHILE

2012



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE MEDICINA VETERINARIA



“ESTUDIO DE LA PATOGÉNESIS PRODUCIDA POR
Trypanosoma cruzi EN UN MODELO MURINO, UTILIZANDO LA
TÉCNICA DE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA E
HISTOPATOLOGÍA EN EL ANÁLISIS DE DIVERSOS TEJIDOS”

MARÍA ANGÉLICA PAINEMAL NAHUEL

NOTA FINAL:

		NOTA	FIRMA
PROFESOR GUÍA	: ALEJANDRO GARCÍA C.
PROFESOR CONSEJERO:	CARLOS NAVARRO V.
PROFESOR CONSEJERO:	CLAUDIO ZÚÑIGA M.

SANTIAGO – CHILE
2012

MEMORIA DE TÍTULO

“ESTUDIO DE LA PATOGÉNESIS PRODUCIDA POR *Trypanosoma cruzi* EN UN MODELO MURINO, UTILIZANDO LA TÉCNICA DE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA E HISTOPATOLOGÍA EN EL ANÁLISIS DE DIVERSOS TEJIDOS”

“STUDY OF PATHOGENESIS PRODUCED BY *Trypanosoma cruzi* IN A MURINE MODEL, USING TECHNIQUE REACTION OF POLYMERASE CHAIN AND HISTOPATHOLOGY IN SEVERAL TISSUE ANALYSIS”

*** María Angélica Painemal Nahuel**

*Departamento de Medicina Preventiva Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

RESUMEN

Se inocularon 18 ratones de la cepa Balb/c con 2000 tripomastigotes del clon Dm28c de *Trypanosoma cruzi*, los cuales se sacrificaron a los 7, 21 y 60 días post infección, para posteriormente estudiar cerebro, corazón, hígado, riñón, intestino y músculo esquelético a través de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), lo que permitió detectar el DNA de *T. cruzi* y por otro lado se realizó un estudio histopatológico para determinar la presencia de lesiones tisulares y pseudoquistes de *T. cruzi* en los tejidos antes mencionados.

Los resultados mostraron que los niveles de parasitemias fueron bajos durante el transcurso de la infección. Se determinó que durante la fase aguda lo más relevante fueron los procesos inflamatorios, los que no se relacionaron a la presencia de nidos de amastigotes, a diferencia de la fase crónica inicial, donde la gran presencia de pseudoquistes fue lo primordial en el estudio histopatológico, para luego desaparecer en la mayoría de los órganos durante la fase crónica propiamente tal. Respecto al daño tisular encontrado, se observó que el órgano más afectado desde el inicio de la infección fue hígado, lo cual podría estar presuntamente relacionado con la muerte de los ratones durante la fase crónica inicial. Si bien durante la fase crónica fue posible encontrar daño tisular en diferentes grados, no se pudo determinar la presencia de pseudoquistes en la mayoría de los tejidos, a diferencia de la PCR que demostró la presencia de *T. cruzi* en todos los órganos estudiados, mostrando con esto el alto nivel de sensibilidad de la técnica.

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

ABSTRACT

Eighteen Balb/c strain mice were inoculated with 2000 trypomastigotes from the Dm28c *Trypanosoma cruzi* clone. The mice were euthanized at day 7, 21 and 60 post infection, in order to carry out a further study of brain, heart, liver, kidney, bowels and skeletal muscle through technique reaction of polymerase chain (PCR) which allowed *T. cruzi* DNA detection. On the other hand, histopathology was carried out in order to detect and presence of tissue damage and pseudocysts of *T. cruzi* on the previously mentioned organs.

Results showed that the parasitemia levels were low during the course of the infection. It was determined that during acute phase, the most relevant were the inflammatory processes, which were not related to the presence of amastigotes nests, unlike at the initial chronic phase, where the presence of a significant amount of pseudocysts was the most relevant for the histopathological study. During actual chronic phase, amastigotes disappear from most of the organs. Regarding tissue damage, the most affected organ from the beginning of the infection was the liver, which could be related to the mice death during initial chronic phase. Although, during chronic phase it was possible to find tissue damage on different levels, presence of pseudocysts on most tissues was not determined, unlike PCR detection which showed presence of *T. cruzi* in all the studied organs, reflecting the high sensitivity of the technique.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*, PCR, histopathology.

1. INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas es una zoonosis parasitaria de amplia distribución geográfica en Latinoamérica, constituyendo un gran problema de salud pública. Actualmente ocupa el cuarto lugar de importancia en el continente, después de las enfermedades respiratorias, diarreas y SIDA (WHO, 2002; MINSAL, 2006).

Es producida por *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), protozoo flagelado y es transmitido a través de insectos vectores pertenecientes al orden Hemiptera, familia Reduvidae, subfamilia Triatominae, donde encontramos a *Triatoma infestans*, *Mepraia spinolai* y *Mepraia gajardoi*. Por otro lado este protozoo se caracteriza por adoptar tres formas celulares durante su ciclo biológico: Tripomastigote, forma infectante no multiplicativa, ubicado en el contenido intestinal del vector y en la sangre de mamíferos infectados; Epimastigote, forma multiplicativa localizada en el intestino medio del vector y Amastigote, forma multiplicativa intracelular, ubicada exclusivamente en las células nucleadas de mamíferos infectados (Botero y Restrepo, 2003).

Clínicamente se reconocen tres periodos de la infección: Periodo agudo, crónico indeterminado o latente y crónico secuelar (Botero y Restrepo, 2003; MINSAL, 2006). El periodo agudo presenta una intensa parasitemia y más del 90% de los casos son asintomáticos (Valenzuela *et al.*, 2010). El periodo crónico indeterminado, debido a que es asintomático, puede pasar desapercibido por años e incluso toda la vida y en general representa el 50 a 70% de los pacientes chagásicos (Botero y Restrepo, 2003; MINSAL, 2006; Ortí y Parada, 2009). El periodo crónico secuelar se caracteriza por ser sintomático, donde aproximadamente el 30% de los individuos infectados desarrollan manifestaciones clínicas (Valenzuela *et al.*, 2010). Durante la fase crónica existen oligoparasitemias, predominando el parasitismo tisular (Botero y Restrepo, 2003). Las razones de la gran variedad y gravedad de los cuadros clínicos que pueden presentarse durante las fases aguda y crónica, no están bien determinadas, aunque se han mencionado factores dependientes tanto del hospedero como del parásito (Pizzi *et al.*, 2005).

La fase aguda es la primera etapa en la cual los amastigotes de *T. cruzi* se reproducen dentro de las células y las destruyen. Los parásitos libres invaden otras células que también se rompen y causan reacción inflamatoria con infiltrado de diferentes tipos de leucocitos (Rosas *et al.*, 2007). Posteriormente los amastigotes se localizan en diferentes órganos, como bazo, médula ósea, corazón, tubo digestivo, suprarrenales, cerebro y ocasionalmente ovarios, testículos y tiroides. Los histiocitos fijos, fibras musculares, células adiposas, células gliales y en general las

células del sistema retículo-endotelial, sufren destrucción debido al crecimiento y multiplicación de los parásitos (Botero y Restrepo, 2003). La inflamación en miocardio es muy intensa, difusa y desproporcionada con relación al número de células parasitadas. En los demás órganos, la inflamación es focal o multifocal, en directa relación con las células parasitadas. Estas últimas pueden ser macrófagos, células musculares lisas y estriadas e incluso, adipocitos y células gliales en el sistema nervioso central (Rosas *et al.*, 2007; FIOCRUZ, 2012).

Después de la fase aguda ocurre una respuesta inmune que provoca disminución de la parasitemia y mantiene la infección en algunos focos selectivos (Rosas *et al.*, 2007). Los nidos de amastigotes generan infiltrado mononuclear que favorece la liberación de antígenos y sustancias tóxicas que causan edema intersticial. Se producen autoanticuerpos contra endocardio, vasos sanguíneos e intersticio del músculo estriado. Al microscopio se observan fibras miocárdicas hipertrofiadas, tumefactas y vacuolizadas. Los parásitos se encuentran en los cortes histológicos aproximadamente en el 30% de los casos (Rosas *et al.*, 2007).

El diagnóstico de la enfermedad se basa en aspectos clínicos y epidemiológicos, y su confirmación a través de exámenes de laboratorios, dependiendo de la etapa clínica del paciente. En la fase aguda, los estudios son principalmente directos, tratando de evidenciar al parásito en sangre, mientras que en la etapa crónica la búsqueda se centra en la presencia de anticuerpos circulantes contra *T. cruzi* (WHO, 2002). Actualmente, la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) se utiliza como herramienta para el diagnóstico de la enfermedad, debido a su excelente sensibilidad, especificidad y rapidez para amplificar diferentes segmentos del genoma de *T. cruzi*, como la región hipervariable del kinetoplasto (Soto, 1998).

La relación entre la presencia del parásito a nivel intracelular y las lesiones tisulares que éste genera, debido a la presencia de amastigotes intracelulares a nivel de las células del sistema retículo endotelial, tejido nervioso y tejido muscular, sumado a los mecanismos inflamatorios, autoinmunes, vasculares y de denervación en los diversos tejidos, determinan la evolución de esta enfermedad (Atias, 2000).

Es por esto que el presente trabajo pretende estudiar la patogénesis producida por *T. cruzi* en un modelo murino, para lo cual se utilizará la técnica de PCR e histopatología en el análisis de diversos tejidos.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

Cepa de *T. cruzi*

La infección experimental se llevó a cabo utilizando tripomastigotes sanguíneos de *T. cruzi* del clon Dm28c (Contreras *et al.*, 1988) y se mantuvieron en ratones BALB/c en el Laboratorio de la Unidad Docente de Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad de Chile (LDP).

Ratones

Se utilizó un grupo de 18 ratones hembras de 10 semanas, de la cepa BALB/c. Esta cepa proviene originalmente del Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, U.S.A. Los ratones fueron reproducidos y mantenidos en el LDP.

Modelo de infección y obtención de la muestra

Para obtener los parásitos, se extrajo sangre mediante punción cardíaca (0,6 mL aproximadamente) de un ratón BALB/c infectado con el Clon Dm28c del LDP, que fue sacrificado en el momento. La sangre se colocó en un frasco estéril, el cual contenía 0,1 mL de citrato de sodio, utilizado como anticoagulante. Luego se realizó una dilución de 1/50 de sangre infectada en suero fisiológico estéril, para luego realizar un recuento de parásitos en cámara de Neubauer. Este procedimiento permitió determinar la cantidad de parásitos totales en los 0,6 mL de sangre. Posteriormente se realizaron las diluciones respectivas para llegar aproximadamente a 2000 parásitos en 0,2 mL, la cual se inoculó intraperitonealmente a cada ratón, y estos se mantuvieron en el LDP.

Posteriormente, se sacrificaron seis ratones a los 7, 21 y 60 días postinfección (p.i), respectivamente. Se seleccionaron aquellos que presentaban mayores signos clínicos (erizado de pelo, paresia de miembros posteriores o compromiso estado general). En los casos de no alcanzar este número, según el criterio anterior, se completó seleccionando en forma aleatoria.

Para este estudio se utilizaron los siguientes órganos: cerebro, corazón, hígado, riñón, intestino y músculo esquelético, los cuales se obtuvieron por medio de una incisión en la línea media del ratón. Cada órgano fue lavado con PBS, pH 7,2 y luego dividido en dos fracciones iguales, donde una parte se almacenó en un tubo Eppendorf con PBS para el estudio de PCR y la otra fracción en un tubo de vidrio con formalina tamponada al 10% para el estudio histopatológico. Como control, se utilizó un ratón de la cepa Balb/c no infectado.

Estudio de Parasitemia

Las parasitemias de los animales infectados fueron estimadas en los días respectivos de sacrificio. La sangre se obtuvo de la vena caudal, en tubos de microhematocrito heparinizados. Cada muestra se centrifugó a 700 g por cinco minutos, posteriormente se midió el volumen de sangre en cada tubo y se procedió a calcular la cantidad de parásitos por mL, utilizando el método descrito por Rojas de Arias y Ferro (1988). Los resultados se expresaron como el promedio de las parasitemias del grupo de 6 ratones en diferentes días de sacrificio más la desviación estándar correspondiente.

Estudio histopatológico

Una fracción de los órganos obtenidos fue procesada en el Departamento de Anatomía Patológica del Hospital San Juan de Dios, los cuales se incluyeron en parafina según métodos convencionales y fueron cortados en micrótopo de rotación (Leitz) de 5 µm de espesor. Luego fueron teñidos con la técnica Hematoxilina-Eosina (HE). Posteriormente se llevaron al Departamento de Patología Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile.

La presencia del parásito, se determinó mediante el hallazgo de pseudoquistes de *T. cruzi* en 10 campos microscópicos de cada preparado, examinados con aumento de 600x en un microscopio Nikon (Eclipse 600) y tabulado de la siguiente manera: (-) Ausencia de pseudoquistes; (+) 1-5 pseudoquistes; (++) 6-10; (+++) 11 o más pseudoquistes (Zúñiga *et al.*, 1998).

Las lesiones fueron evaluadas con aumento de 100x y 400x. Posteriormente se determinó presencia o ausencia de lesiones, las cuales se clasificaron según cada órgano de la siguiente manera: Cerebro: Manguito perivascular, gliosis, inflamación en meninges; Corazón: Necrosis, infiltrado inflamatorio en intersticio, fibrosis; Hígado: Infiltrado multifocal, hematopoyesis extramedular, infiltrado en espacio porta, necrosis individual y necrosis extensa. Riñón: Infiltrado linfoplasmocitario perivascular, material proteináseo tubular; Intestino: Inflamación aguda, inflamación crónica. Músculo esquelético: Necrosis, células inflamatorias en fibra, células satélites en fibra, infiltrado inflamatorio en intersticio.

En el caso de los ratones muertos antes del día de sacrificio, se extrajo sus órganos de igual manera, pero sólo se realizó lectura de placas histológicas de corazón y músculo esquelético se

determinó la presencia o ausencia de pseudoquistes, debido a que los demás órganos pudieran presentar alteraciones post mortem no atribuibles a la infección por el parásito.

Reacción en Cadena de la Polimerasa

La otra fracción de los órganos obtenidos se trabajó en el LDP de la siguiente manera:

Extracción ADN

Se realizó mediante el procedimiento del Kit QIAamp® (Lab. QIAGEN, Miami-USA). Para obtener el ADN de *T. cruzi* a partir de los órganos, éstos se lavaron con PBS pH 7,2 y fueron cortados en pequeños trozos de 25 mg. Posteriormente, se depositaron en tubos Eppendorf, los cuales contenían 180 µL de tampón ATL y 20µL de Proteinasa K. Luego fueron macerados con una bagueta e incubados a 56°C toda la noche. Al día siguiente se agregó 200µL de buffer AL, se homogenizaron en vórtex por 15 segundos y luego se volvieron a incubar a 70°C por 10 minutos. A continuación, las muestras fueron centrifugadas a 800 g por 15 segundos en microcentrífuga (CAPSULE TOMY HF-120) y se le agregó 200µL de etanol 100%. La extracción continuó según protocolo del Kit QIAamp®. Se utilizó ADN de epimastigote del clon Dm28c de *T. cruzi* como control positivo (C_e(+)) y agua bidestilada como control negativo (C(-)).

Amplificación

El ADN obtenido en el proceso de extracción, se colocó en tubos de PCR que contenían el Master Mix, constituido por 10x buffer; dATP, dCTP, dGTP y dTTP 10 mM; MgCl₂ 50 mM; Taq ADN Polimerasa (2,5 U/µL); oligonucleótidos 121 (5`-AAA TAA TGT ACG GGG GAG ATG CAT GA-3`) y 122 (5`-GGT TCG ATT GGG GTT GGT GTA ATA TA-3`) 0,5 µM y H₂O bidestilada (Wincker *et al.*, 1994). Estos partidores/cebadores/"primers" generan un fragmento de 330 pb de ADN, correspondientes a un segmento de la región hipervariable del kinetoplasto de *T. cruzi* (Wincker *et al.*, 1994).

A continuación, los tubos de PCR con 80µL de Master Mix y 20µL de muestra fueron introducidos en un Termociclador Minicicler (Lab. M.J. Research, USA) programado con 1 ciclo de 94°C/5 minutos - 40 ciclos de 94°C/20 segundos - 57°C/10 segundos - 72°C/30 segundos y un ciclo final de 72°C/7 minutos. Se utilizó agua bidestilada como control negativo y ADN de epimastigotes del clon Dm28c de *T. cruzi* como control positivo (C_a(+)) (Wincker *et al.*, 1994).

Electroforesis

Para determinar la presencia del ADN de *T. cruzi*, 15µl de los amplificados fueron mezclados con tampón de corrida de PCR (glicerol 30%, azul de bromofenol 0,25%, xileno-cianol 0,25% y H₂O bidestilada csp 100mL). Los amplificados fueron sometidos a electroforesis por una hora en cámara Modelo M6U-402T a 110 Volts en gel de agarosa al 2%, embebido en buffer TBE (Tris/borato/EDTA pH 8,3) y 10µl de Bromuro de Etidio. Se utilizó 1 Kb DNA Leader, como marcador de peso molecular.

Revelado

Para identificar las 330 pb de ADN de la región hipervariable del kinetoplasto de *T. cruzi* (Wincker *et al.*, 1994), el gel de corrida se observó bajo transiluminador (TFP-10M Vilbes Lourmat), para luego fotografiar cada revelado.

Bioseguridad

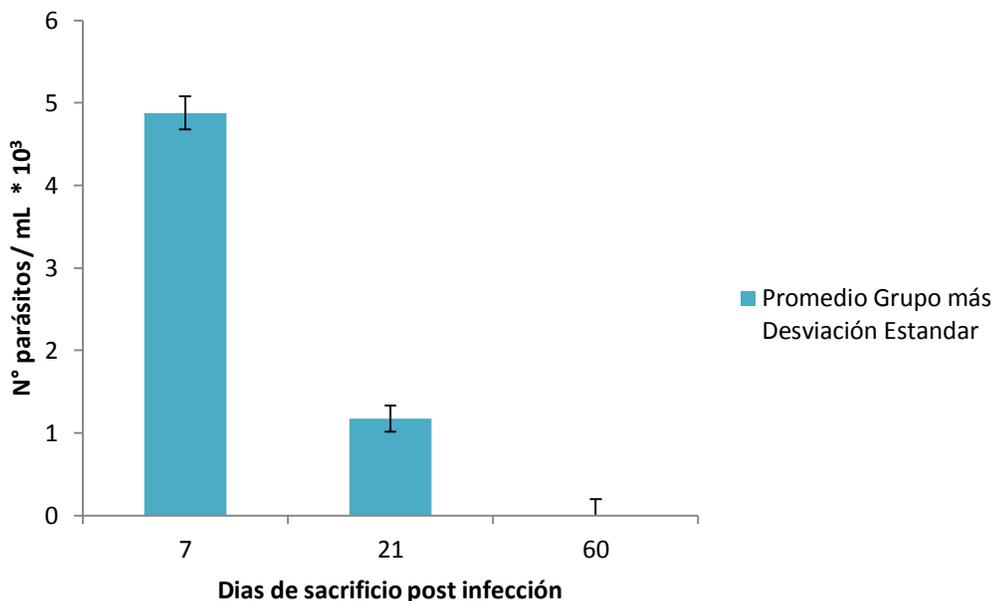
La manipulación y eliminación del material contaminado, utilizado con los ratones y en la técnica de PCR, fueron realizadas bajo el protocolo de normativa de la Unidad de Bioseguridad de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

Los ratones se sacrificaron por inhalación de CO₂ y sus cadáveres fueron eliminados en bolsas plásticas selladas y congelados a -18°C, para luego ser cremados por la empresa Stericycle S.A.

3. RESULTADOS

Parasitemia

Gráfico 1. Niveles de parasitemia promedio en tres grupos de ratones Balb/c sacrificados en distintos días p.i., infectados con 2.000 tripomastigotes sanguíneos del clon Dm28c de *T. cruzi*.



Nota: A los 7 y 60 días se utilizaron los seis ratones y a los 21 días sólo tres, ya que los otros murieron antes de ser sacrificados y no fue posible extraer su sangre.

En el Gráfico 1 se observa el promedio de parásitos por mL (p/mL), presentes en la sangre de tres grupos de ratones infectados con tripomastigotes de *T. cruzi*. A los 7 días p.i., la parasitemia promedio en los seis ratones sacrificados fue de $4,87 \times 10^3$ p/mL, a los 21 días p.i., fue de $1,17 \times 10^3$ p/mL, cálculo realizado en tres ratones, ya que los otros murieron antes de ser sacrificados, y a los 60 días, en los seis ratones estudiados no se observaron parásitos en la circulación sanguínea.

Estudio Histopatológico

Tabla I. Resultados de PCR, pseudoquistes e histopatología en cerebro de ratones sacrificados en diferentes días.

D	N°	PCR	Psq	Lesiones		
				Manguito perivascular	Gliosis	Inflamación meninges
	1	+	-	-	+	-
	2	+	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-
7	4	-	-	-	-	-
	5	+	-	+	-	-
	6	+	-	+	-	-
	ST	4	0	2	1	0
	7	+	-	+	+	+
	8	+	+	+	-	-
	9*	+	+	s/e	s/e	s/e
21	10	+	+	-	+	-
	11*	+	-	s/e	s/e	s/e
	12*	+	-	s/e	s/e	s/e
	ST	6	3	2	2	1
	13	+	-	-	-	+
	14	+	+	-	-	-
	15	+	-	-	-	-
60	16	+	-	+	-	-
	17	+	-	-	-	+
	18	+	-	+	-	+
	ST	6	1	2	0	3

D: Días de sacrificio; ST: Subtotal; Psq: Pseudoquiste (+) 1-5; (++) 6-10; (+++) 11 o más. Lesiones: (+) presencia; (-) ausencia; s/e: sin estudio histopatológico; (*): ratones muertos antes del sacrificio.

Nota: El ratón control no presentó lesiones tisulares ni presencia de pseudoquistes (Datos no mostrados)

En la Tabla I se observa que en los cerebros de los ratones sacrificados el día 7 p.i., cuatro resultaron positivos por PCR, dos presentaron manguito perivascular, sólo en un ratón se presentó gliosis y ninguno de los ratones presentó inflamación de meninges ni presencia de pseudoquistes. El día 21 p.i., los seis ratones presentaron PCR positivas y de éstos, en tres se observó entre 1 a 5 pseudoquistes. Debido a que tres ratones murieron antes del sacrificio, sus cerebros no se incluyeron en el estudio histopatológico, por las posibles alteraciones de la descomposición del tejido. De los tres ratones restantes, dos presentaron manguito perivascular, dos presentaron gliosis y un ratón presentó inflamación de meninges. De los ratones sacrificados el día 60, los seis resultaron positivos por PCR, observándose la presencia de pseudoquistes en uno de ellos, entre 1 a 5 nidos. A nivel de lesiones histopatológicas, dos ratones presentaron manguito perivascular, tres presentaron inflamación de meninges y ninguno presentó gliosis.

Tabla II. Resultados de PCR, pseudoquistes e histopatología en corazón de ratones sacrificados en diferentes días.

D	N°	PCR	Psq	Lesiones		
				Necrosis	Infiltrado inflamatorio en intersticio	Fibrosis
7	1	+	-	-	-	-
	2	+	-	-	-	-
	3	+	-	-	-	-
	4	+	-	-	-	-
	5	+	-	-	-	-
	6	+	-	-	-	-
	ST	6	0	0	0	0
21	7	+	-	-	+	-
	8	+	++	+	+	-
	9*	+	++	+	+	+
	10	+	+++	-	+	-
	11*	+	+	-	+	-
	12*	+	+	-	+	-
	ST	6	5	2	6	1
60	13	+	-	-	+	-
	14	+	-	+	+	-
	15	+	-	+	+	-
	16	+	-	-	-	-
	17	+	-	-	+	+
	18	+	-	-	-	-
	ST	6	0	2	4	1

D: Días sacrificio; ST: Subtotal; Psq: Pseudoquiste (+) 1-5; (++) 6-10; (+++) 11 o más. Lesiones: (+) presencia; (-) ausencia; (*): ratones muertos antes del sacrificio.

Nota: El ratón control no presentó lesiones tisulares ni presencia de pseudoquistes (Datos no mostrados).

En la Tabla II se observa que en los corazones de los ratones sacrificados el día 7 p.i., seis ratones fueron positivos por PCR, no presentándose en ellos alteraciones histopatológicas ni pseudoquistes. El día 21 p.i., tres ratones murieron antes del sacrificio. Los seis ratones resultaron positivos por PCR, cinco ratones presentaron pseudoquistes, dos de ellos entre 1 a 5 nidos, otros dos entre 6 a 10 nidos y sólo un ratón con más de 11 nidos. Dos de los ratones presentaron necrosis, seis infiltrado inflamatorio en intersticio y uno presentó fibrosis. De los ratones sacrificados el día 60, los seis resultaron positivos por PCR, dos ratones con necrosis, cuatro presentaron infiltrado inflamatorio en intersticio, uno fibrosis y en ninguno se observó la presencia de pseudoquistes.

Tabla III. Resultados de PCR, pseudoquistes e histopatología en hígado de ratones sacrificados en diferentes días.

D	N°	PCR	Psq	Lesiones				
				Infiltrado multifocal	Hematopoyesis extramedular	Infiltrado espacio porta	Necrosis individual	Necrosis extensa
7	1	+	-	+	-	+	+	-
	2	+	-	+	-	+	+	-
	3	+	-	+	-	-	+	-
	4	+	-	-	-	-	-	-
	5	+	-	-	-	-	-	-
	6	+	-	-	-	-	-	-
	ST	6	0	3	0	2	3	0
21	7	+	-	+	+	+	-	+
	8	+	-	-	+	+	+	-
	9*	-	-	s/e	s/e	s/e	s/e	s/e
	10	+	-	-	+	+	+	-
	11*	+	-	s/e	s/e	s/e	s/e	s/e
	12*	+	-	s/e	s/e	s/e	s/e	s/e
	ST	5	0	1	3	3	2	1
60	13	+	-	+	-	+	-	+
	14	+	-	+	-	+	+	-
	15	-	-	+	-	+	+	+
	16	+	-	+	-	+	-	+
	17	+	-	+	-	+	+	-
	18	+	-	+	-	+	+	-
	ST	5	0	6	0	6	4	3

D: Días sacrificio; ST: Subtotal; Psq: Pseudoquiste (+) 1-5; (++) 6-10; (+++) 11 o más. Lesiones: (+) presencia; (-) ausencia; s/e: sin estudio histopatológico; (*): ratones muertos antes del sacrificio.

Nota: El ratón control no presentó lesiones tisulares ni presencia de pseudoquistes (Datos no mostrados).

En la Tabla III se observa que en los hígados de los ratones sacrificados el día 7 p.i., seis fueron positivos por PCR, tres presentaron infiltrado multifocal, dos ratones presentaron infiltrado en espacio porta y tres necrosis individual, mientras que ninguno presentó pseudoquistes, hematopoyesis extramedular ni necrosis extensa. El día 21 p.i., cinco ratones presentaron PCR positivas y en ninguno se observó la presencia de pseudoquistes. Debido a que tres ratones murieron antes del sacrificio, sus hígados no se incluyeron en el estudio histopatológico, por las posibles alteraciones de la descomposición del tejido. De los tres ratones restantes, uno presentó infiltrado multifocal, tres presentaron hematopoyesis extramedular e infiltrado en espacio porta, dos ratones necrosis individual y sólo uno presentó necrosis extensa. De los ratones sacrificados el día 60, los cinco resultaron positivos por PCR y ninguno presentó pseudoquistes. A nivel de lesiones histopatológicas, seis ratones presentaron infiltrado multifocal e infiltrado en espacio porta, cuatro necrosis individual y tres ratones necrosis extensa, no observándose en ninguno de ellos hematopoyesis extramedular.

Tabla IV. Resultados de PCR, pseudoquistes e histopatología en riñón de ratones sacrificados en diferentes días.

D	N°	PCR	Psq	Lesiones	
				Infiltrado Linfoplasmocitario perivascular	Material proteinaseo tubular
7	1	+	-	+	-
	2	+	-	+	-
	3	-	-	-	-
	4	-	-	-	-
	5	+	-	+	-
	6	+	-	+	-
	ST	4	0	4	0
21	7	+	+	+	-
	8	+	-	+	+
	9*	-	-	s/e	s/e
	10	+	-	-	+
	11*	+	+	s/e	s/e
	12*	+	-	s/e	s/e
	ST	5	2	2	2
60	13	+	-	+	-
	14	+	+	+	-
	15	+	+	+	-
	16	+	-	+	-
	17	+	-	+	-
	18	+	-	+	-
	ST	6	2	6	0

D: Días sacrificio; ST: Subtotal; Psq: Pseudoquiste (+) 1-5; (++) 6-10; (+++) 11 o más. Lesiones: (+) presencia; (-) ausencia; s/e: sin estudio histopatológico; (*): ratones muertos antes del sacrificio.

Nota: El ratón control no presentó lesiones tisulares ni presencia de pseudoquistes (Datos no mostrados).

En la Tabla IV se observa que en los riñones de los ratones sacrificados el día 7 p.i., cuatro resultaron positivos por PCR, cuatro presentaron infiltrado linfoplasmocitario perivascular y ninguno presentó material proteinaseo tubular ni pseudoquistes. El día 21 p.i., cinco ratones presentaron PCR positivas y de éstos, en dos se observó presencia de pseudoquistes. Debido a que tres ratones murieron antes del sacrificio, sus riñones no se incluyeron en el estudio histopatológico, por las posibles alteraciones de la descomposición del tejido. De los tres ratones restantes, dos presentaron infiltrado linfoplasmocitario perivascular y dos material proteinaseo tubular. De los ratones sacrificados el día 60, los seis resultaron positivos por PCR y con infiltrado linfoplasmocitario perivascular, dos ratones presentaron pseudoquistes y ninguno material proteinaseo.

Tabla V. Resultados de PCR, pseudoquistes e histopatología en intestino de ratones sacrificados en diferentes días.

D	N°	PCR	Psq	Lesiones	
				Inflamación Aguda	Inflamación crónica
7	1	+	-	-	-
	2	-	-	-	-
	3	-	-	-	-
	4	+	-	+	-
	5	-	-	-	-
	6	+	-	-	-
ST		3	0	1	0
21	7	-	-	-	-
	8	+	+	-	-
	9*	-	-	s/e	s/e
	10	+	++	-	+
	11	+	-	s/e	s/e
	12*	+	+	s/e	s/e
ST		4	3	0	1
60	13	-	-	-	-
	14	-	-	-	-
	15	-	-	-	-
	16	-	-	+	+
	17	-	-	-	+
	18	-	-	-	-
ST		0	0	1	2

D: Días sacrificio; ST: Subtotal; Psq: Pseudoquiste (+) 1-5; (++) 6-10; (+++) 11 o más. Lesiones: (+) presencia; (-) ausencia; s/e: sin estudio histopatológico; (*): ratones muertos antes del sacrificio.

Nota: El ratón control no presentó lesiones tisulares ni presencia de pseudoquistes (Datos no mostrados).

En la Tabla V se observa que en los intestinos de los ratones sacrificados el día 7 p.i., tres resultaron positivos por PCR, uno presentó inflamación aguda y ninguno presentó inflamación crónica ni pseudoquistes. El día 21 p.i., cuatro presentaron PCR positivas y en tres ratones se observaron pseudoquistes. Debido a que tres ratones murieron antes del sacrificio, sus intestinos no se incluyeron en el estudio histopatológico, por las posibles alteraciones de la descomposición del tejido. De los tres ratones restantes, uno presentó inflamación crónica y ninguno inflamación aguda. De los ratones sacrificados el día 60, los seis resultaron negativos por PCR y sin presencia de pseudoquistes, un ratón presentó inflamación aguda y dos inflamación crónica.

Tabla VI. Resultados de PCR, pseudoquistes e histopatología en músculo esquelético de ratones sacrificados en diferentes días.

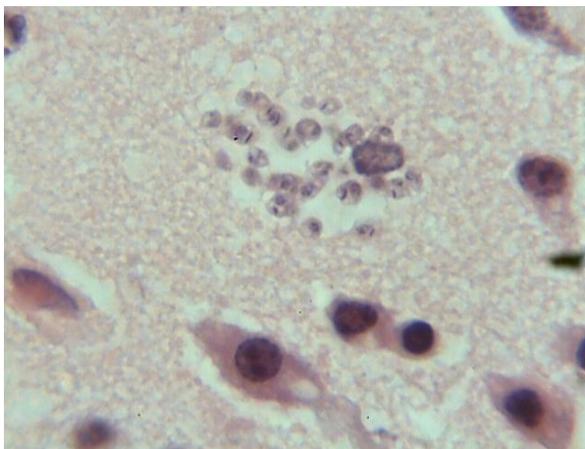
D	N°	PCR	Psq	Lesiones			
				Necrosis	Células inflamatorias en fibra	Células satélites en fibra	Infiltrado mononuclear en intersticio
7	1	+	-	-	-	-	+
	2	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-
	4	+	-	-	-	-	-
	5	-	-	-	-	-	-
	6	+	-	-	-	-	-
ST	3	0	0	0	0	0	2
21	7	+	+	+	+	-	-
	8	+	+	+	+	+	+
	9*	+	+	+	-	+	+
	10	+	++	+	-	-	+
	11*	+	+	+	-	-	+
	12*	+	+	+	-	-	+
ST	6	6	6	2	2	0	5
60	13	+	-	-	-	-	+
	14	+	-	-	-	-	-
	15	+	-	-	-	-	+
	16	+	-	-	+	-	-
	17	+	-	+	-	-	+
	18	+	-	-	-	-	+
ST	6	0	1	1	0	0	4

D: Días sacrificio; ST: Subtotal; Psq: Pseudoquiste (+) 1-5; (++) 6-10; (+++) 11 o más. Lesiones: (+) presencia; (-) ausencia; (*): ratones muertos antes del sacrificio.

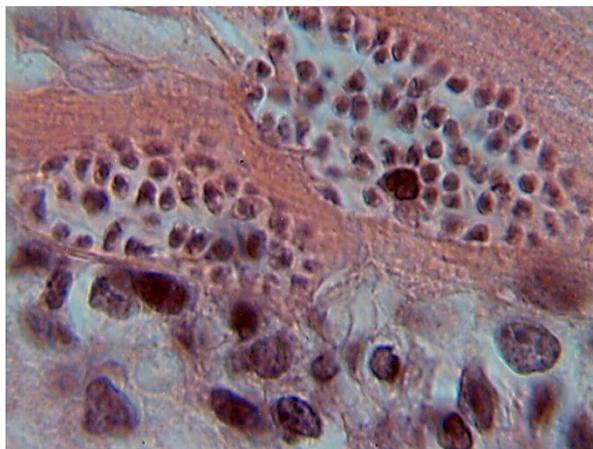
Nota: El ratón control no presentó lesiones tisulares ni presencia de pseudoquistes (Datos no mostrados).

En la Tabla VI se observa que en los músculos esqueléticos de los ratones sacrificados el día 7 p.i., tres resultaron positivos por PCR, ninguno presentó pseudoquistes y en sólo dos ratones se observó infiltrado mononuclear en intersticio. El día 21 p.i., tres ratones murieron antes del sacrificio. De los seis ratones, todos resultaron positivos por PCR, seis presentaron pseudoquistes y necrosis, dos ratones presentaron células inflamatorias en fibra, dos presentaron células satélites en fibra y cinco ratones infiltrado mononuclear en intersticio. De los ratones sacrificados el día 60, los seis resultaron positivos por PCR, un ratón presentó necrosis, uno presentó células inflamatorias en fibra, cuatro ratones presentaron infiltrado mononuclear en intersticio y ninguno presentó células satélites en fibra ni pseudoquistes.

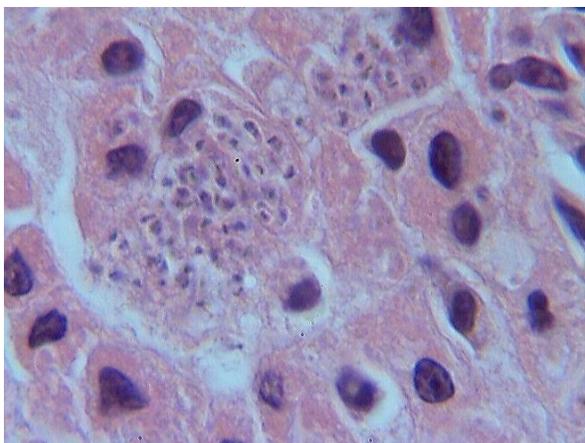
Figura 1. Fotografías de diversos tejidos de ratones infectados con *T. cruzi* y sacrificados a los 21 días p.i., observándose la presencia de pseudoquistes con amastigotes en su interior.



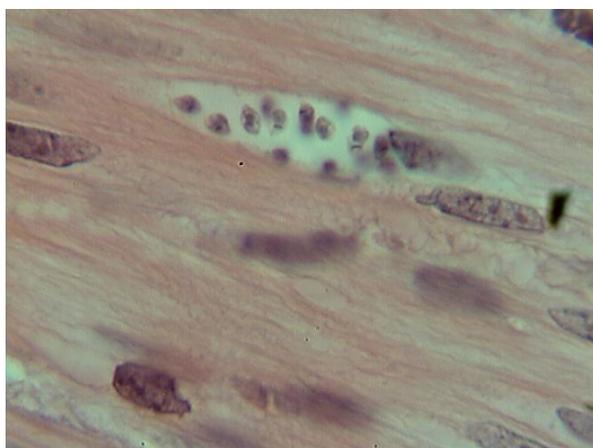
a. Cerebro. HE, 1000X.



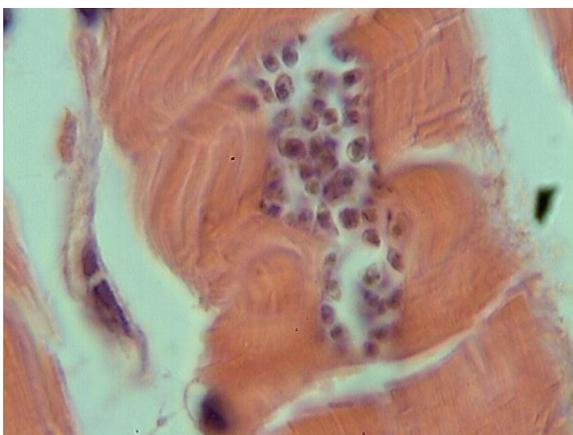
b. Corazón. HE, 1000X.



c. Riñón. HE, 1000X

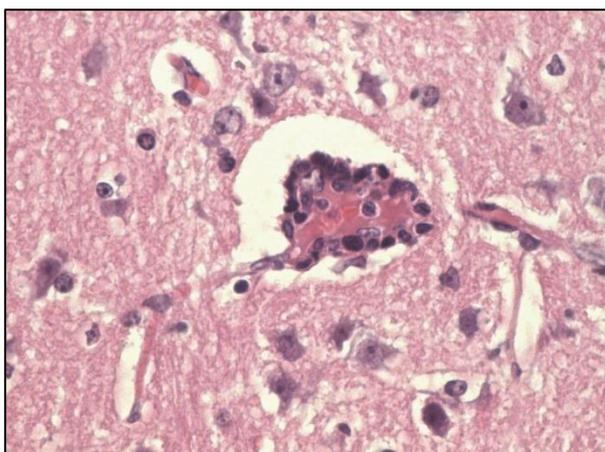


d. Intestino. HE, 1000X.

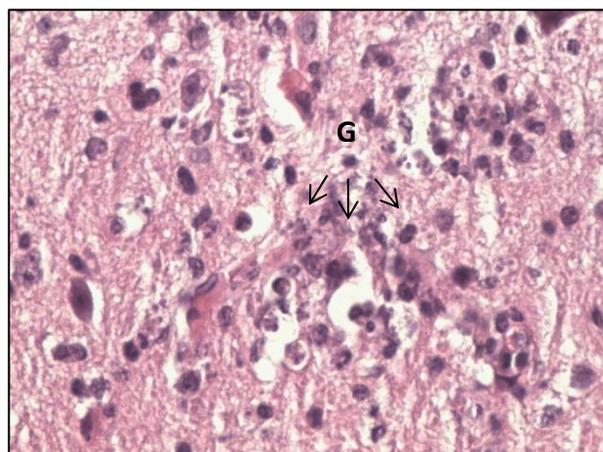


e. Músculo esquelético HE, 1000X.

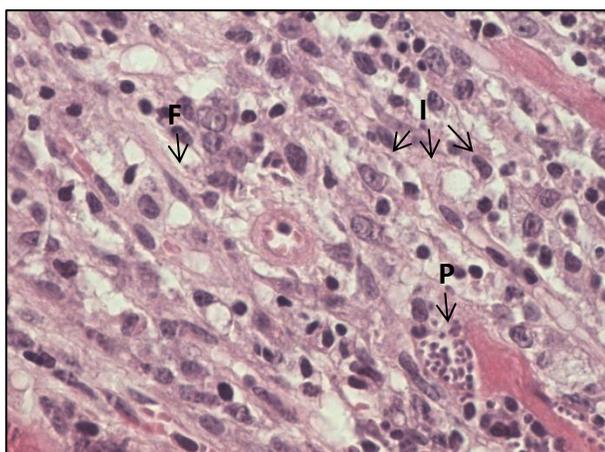
Figura 2. Fotografías de lesiones en tejidos de ratones infectados con *T. cruzi*, sacrificados en diferentes días p.i.



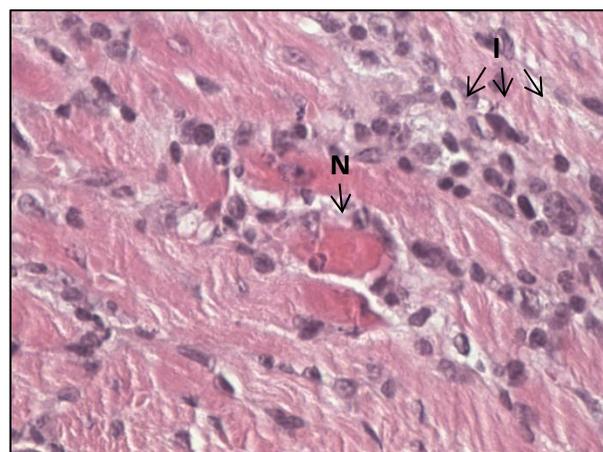
a. Cerebro. HE, 40X. Ratón N°7 (21 días p.i). Manguito perivascular.



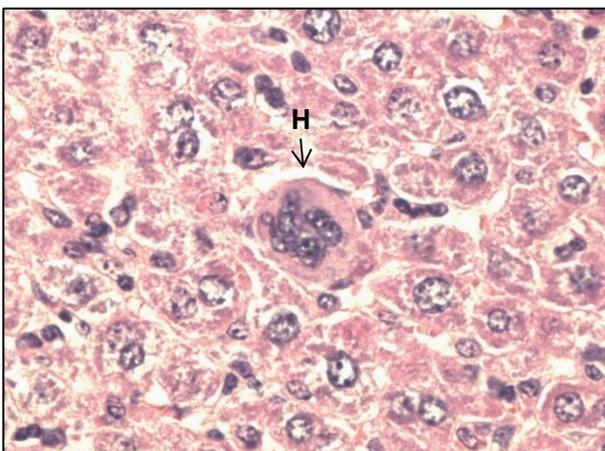
b. Cerebro. HE, 40X. Ratón N°10 (21 días p.i.). Gliosis (G)



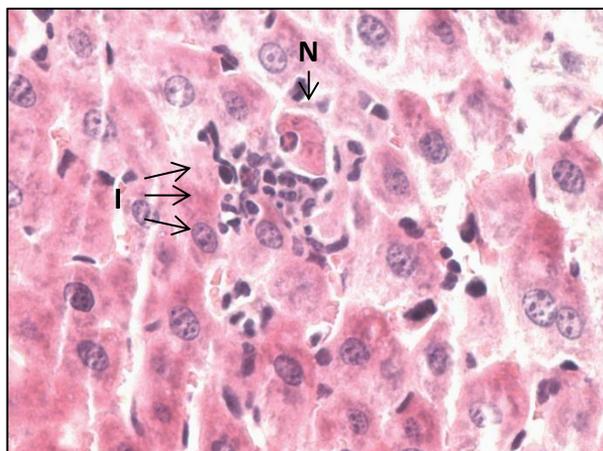
c. Corazón. HE, 40X. Ratón N°9 (21 días p.i.). Inflamación en intersticio (I), fibroblastos (F) y pseudoquistes de *T. cruzi* (P).



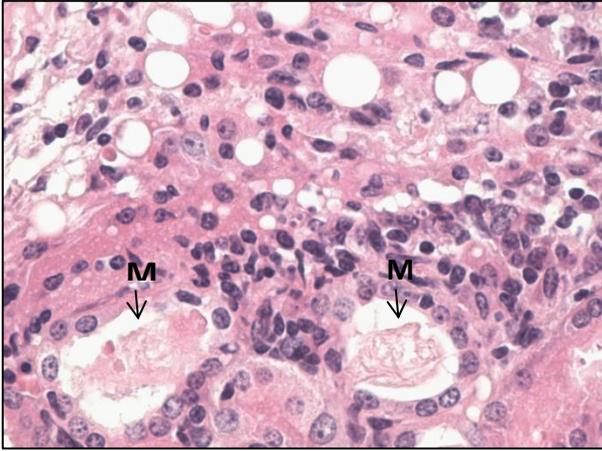
d. Corazón. HE, 40X. Ratón N°8 (21 días p.i.). Inflamación en intersticio (I) y necrosis (N).



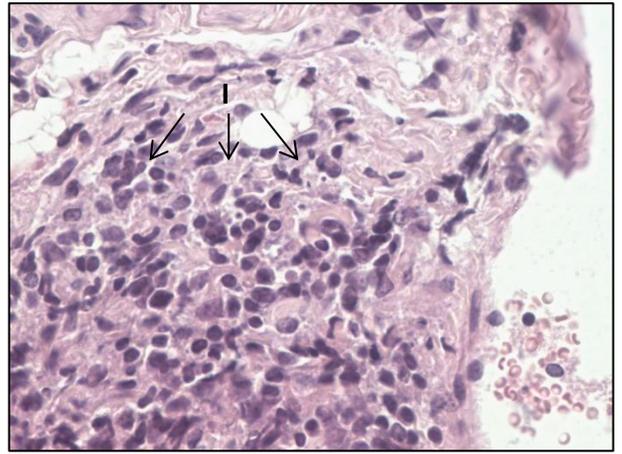
e. Hígado. HE, 40X. Ratón N°7 (21 días p.i.). Hematopoyesis extramedular, con presencia de megacariocito en tejido (H).



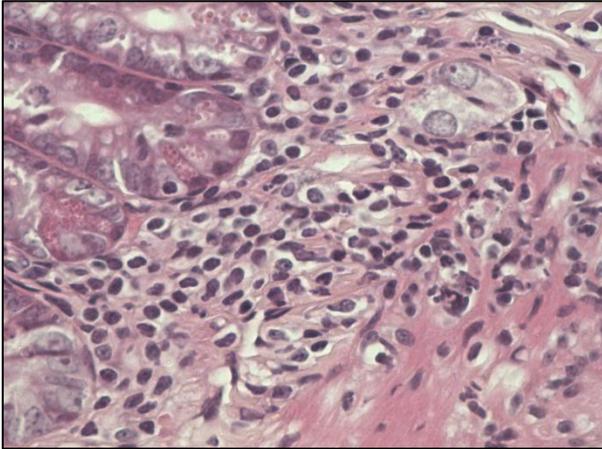
f. Hígado. HE, 40X. Ratón N°1 (7 días p.i.). Infiltrado inflamatorio (I) y necrosis individual de hepatocitos (N)



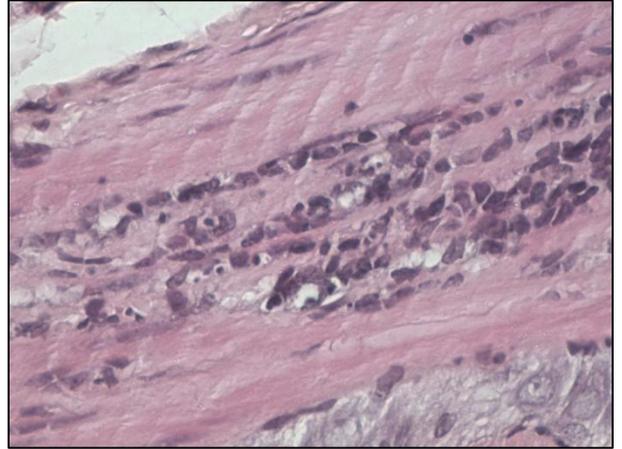
g. Riñón. HE, 40X. Ratón N°8 (21 días p.i.). Material proteinaseo (M) en túbulos renales.



h. Riñón. HE, 40X. Ratón N°13 (60 días p.i.). Infiltrado linfoplasmocitario (I) a nivel perivascular.



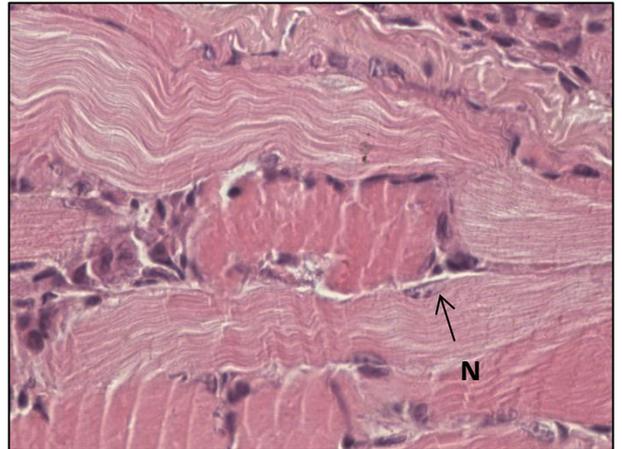
i. Intestino. HE, 40X. Ratón N°4 (7 días p.i.). Inflamación aguda, con presencia de neutrófilos.



j. Intestino. HE, 40X. Ratón N°16 (60 días p.i.). Infiltrado inflamatorio con presencia de leucocitos.

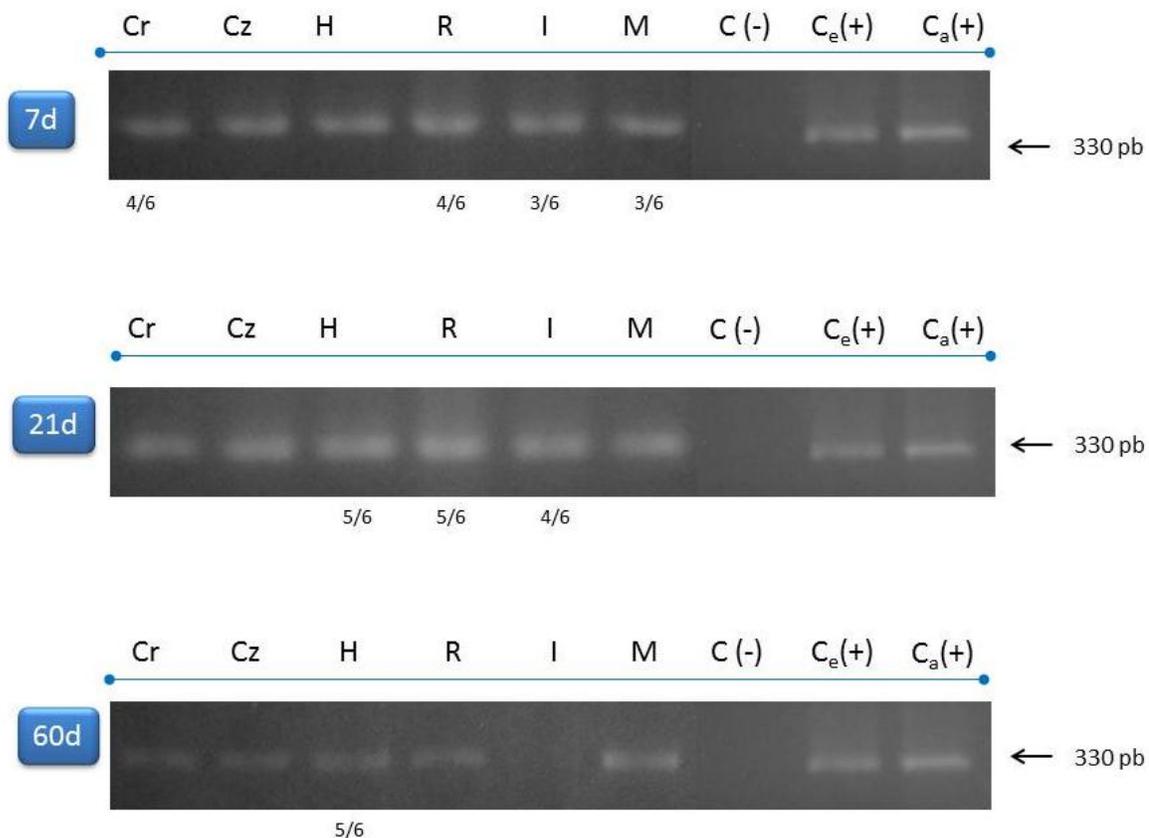


k. Músculo esquelético. HE, 40X. Ratón N°8 (21 días p.i.). Necrosis segmental (N), además de infiltrado de tipo leucocitario.



l. Músculo esquelético. HE, 40X. Ratón N°9 (21 días p.i.). Necrosis y presencia de células satélites en la fibra (N).

Figura 3. Resultados de PCR para *T. cruzi*, en distintos órganos en ratones Balb/c infectados y sacrificados a los 7, 21 y 60 días p.i.



Órganos: Cr (cerebro), Cz (corazón), H (hígado), R (riñón), I (intestino) y M (músculo esquelético)

C (-): Control negativo; C_e (+): Control positivo durante extracción ADN; C_a(+): Control positivo durante amplificación ADN.

Ratones estudiados: N° 6, 8 y 13

Días de sacrificio p.i.: 7d (7 días), 21d (21 días) y 60d (60 días)

Banda observada: 330 pb correspondiente a la región hipervariable del ADN del kinetoplasto de *T. cruzi*

En la figura 3, se observa como ejemplo, los resultados obtenidos por la técnica de PCR al amplificar la región hipervariable del ADN del kinetoplasto de *T. cruzi*, en tejidos de ratones infectados y sacrificados en distintos días p.i. A los 7 días, el ratón N° 6 fue positivo en todos los órganos, a los 21 días, el ratón N°8 resultó positivo en todos los órganos excepto en músculo esquelético y a los 60 días, el ratón N° 13 fue positivo en todos los órganos excepto en intestino.

4. DISCUSIÓN

La evolución de la enfermedad de Chagas se encuentra estrechamente relacionada con la presencia de amastigotes de *T. cruzi* en diversos tejidos como los del sistema monocito macrófago, nervioso y muscular, así como también a los mecanismos inflamatorios, autoinmunes, vasculares y de denervación en dichos tejidos (Atias, 2000).

En el presente estudio se determinó la presencia de *T. cruzi* y lesiones tisulares en cerebro, corazón, hígado, riñón, intestino y músculo esquelético, mediante la técnica de PCR e histopatología, en ratones infectados experimentalmente y por otro lado, se comparó la presencia de *T. cruzi*, las lesiones en los tejidos y las parasitemias, en distintos días de infección.

PARASITEMIAS

Respecto a las parasitemias observadas, éstas aumentaron el día 7 p.i. ($4,78 \times 10^3$) y posteriormente esta concentración disminuye notablemente a los 21 días p.i. en un 76% ($1,17 \times 10^3$ p/mL) y en un 100% a los 60 días p.i. (Gráfico 1).

Estos resultados concuerdan plenamente con la literatura, en donde se describe que la fase aguda de la enfermedad de Chagas en humanos se inicia en los primeros días post-infección, caracterizándose por una parasitemia circulante detectable en sangre periférica. Sin embargo, en la fase crónica indeterminada los niveles de parasitemias disminuyen considerablemente (oligoparasitemias), siendo en la mayoría de los casos no detectables (Rosas *et al.*, 2007). Sin embargo, debemos tener presente que la duración y niveles de parasitemia dependerá de la virulencia y patogenicidad de la cepa utilizada (Rivera *et al.*, 2000).

FASE AGUDA (7 días)

A los 7 días p.i., todos los ratones sacrificados no presentaron alteraciones físicas evidentes. En ninguno de los ratones se observó la presencia de pseudoquistes en los órganos estudiados. Sin embargo, las parasitemias en esta etapa fueron altas, lo que posiblemente indica una reproducción extra tisular, mediada principalmente por macrófagos infectados, los cuales son los primeros en tener contacto con los parásitos a nivel sanguíneo. Además, la presencia de los parásitos, detectado mediante la PCR, presentó un patrón diferente en los órganos estudiados. En todos los ratones (6/6) se evidenció DNA de *T. cruzi* en corazón e hígado, sin embargo en riñón y cerebro sólo se observó en el 66% (4/6) de ellos, seguido del 50% (3/6) en músculo

esquelético e intestino. Con respecto a los procesos inflamatorios a nivel tisular, estos también presentaron algunas diferencias. En corazón no se observaron estas alteraciones, no así los demás órganos, donde a nivel de cerebro el 50% (3/6) presentó una respuesta inflamatoria observándose manguito perivascular (2/6) y gliosis (1/6). Por otro lado, a nivel de intestino (1/6) se observó inflamación aguda, la cual estuvo mediada por neutrófilos, mientras que en músculo esquelético (2/6) el infiltrado fue principalmente mononuclear. A nivel hepático (2/6) se observó infiltrado en el espacio porta con presencia de neutrófilos y macrófagos. Por su parte, a nivel renal (4/6) se observó infiltrado linfoplasmocitario a nivel perivascular. Cabe señalar que el hígado fue el único órgano en donde se observó daño tisular, el cual presentó necrosis individual de hepatocitos. Otros estudios han determinado que la reacción inflamatoria en el tejido infectado es la causa principal de daño tisular que finalmente conduce a disfunción del órgano afectado durante la fase aguda y crónica de la enfermedad, teniendo en algunos casos relación con la presencia de pseudoquistes, situación que no se observó en este estudio (Rojas, 2012).

La etapa inicial de la fase aguda de la infección, se caracterizaría principalmente por un periodo de multiplicación intracelular a nivel de los macrófagos, amplificando la infección, seguido posteriormente o en forma paralela por un periodo de invasión tisular por parte de los tripomastigotes sanguíneos, presentando distinto tropismo por los órganos del ratón. Observándose preferencia por corazón/hígado, seguido por cerebro/riñón y finalmente intestino/músculo esquelético, en base a la presencia de DNA de *T. cruzi* en la PCR y no por la presencia de pseudoquistes a nivel de tejido. Durante la infección aguda existe predilección por tejido miocárdico existiendo igualmente posibilidad de infección de otros sistemas en esta fase a pesar de que no es común en pacientes inmunocompetentes (Ramírez *et al.*, 2007), como fue el caso los ratones sacrificados. Los procesos inflamatorios observados en estos órganos, también presentarían algunas diferencias de mayor a menor grado, siendo el más afectado riñón, seguido por hígado/músculo esquelético y finalmente intestino. Sin embargo, el órgano con mayor grado de daño en esta etapa, sería el hígado, en donde existiría tempranamente destrucción de los hepatocitos de igual manera que lo encontrado en otros estudios donde si bien la inflamación y la destrucción tisular se asocia a la presencia de pseudoquistes, el hígado se ve tempranamente afectado (Raghona *et al.*, 2006). Por otra parte se ha determinado que durante la fase aguda de la infección por *T. cruzi*, la producción citoquinas pro-inflamatorias, inducen en hígado la síntesis de proteínas de fase aguda, las cuales al momento de alcanzar altos niveles actúa en contra del hospedero, incrementando la reacción inflamatoria tisular (Cardoni *et al.*, 1999).

FASE CRÓNICA INICIAL (21 DÍAS)

Debido a que 3 ratones murieron 2 días antes del sacrificio y no pudieron ser rescatados el mismo día, sus intestinos, riñones, cerebros e hígados no se incluyeron en el estudio histopatológico, debido a la rápida descomposición y posible alteración en su histología, lo que podría alterar los datos para este estudio.

A los 21 días p.i., los 3 ratones seleccionados para el sacrificio, presentaron pelo erizado y decaimiento (datos no mostrados). Las parasitemias encontradas en estos ratones fueron considerablemente menores: un 76% con respecto a la fase aguda de la infección. La presencia de parásitos, detectados mediante la PCR, se siguió evidenciando en todos los órganos estudiados, prácticamente en igual proporción que lo observado en la fase aguda, sin embargo, aumentó considerablemente en cerebro y músculo esquelético, logrando detectarse en todos ellos (6/6). Con respecto a la presencia de pseudoquistes, se detectó en todos los ratones en músculo esquelético (6/6) (Figura 1e), seguido del corazón (5/6) (Figura 1b), intestino/cerebro (3/6) (Figura 1d – 1a) y riñón (2/6) (Figura 1c). El único órgano en donde no se evidenció fue en hígado. La cantidad de nidos de amastigotes encontrados en los órganos fluctuó en menos de 5 por campo en riñón/cerebro, menos de 10 por campo en intestino/músculo esquelético, y más de 10 en corazón. Este histotropismo concuerda plenamente con lo encontrado por Contreras y colaboradores (1988), donde entre los órganos menos afectados se encuentra hígado, riñón y cerebro. Respecto a los procesos inflamatorios y daño tisular observados en esta fase, sumado a la presencia de pseudoquistes, además de aumentar en algunos órganos, tuvieron cierta relación entre sí, lo cual coincide con los resultados encontrados por otros investigadores donde las formas amastigotes del parásito han sido observadas en locales inflamatorios o dentro de macrófagos, células gliales y endoteliales en esta fase de la infección (Chagas, 1934; Pittella, 1990; Guarner *et al.*, 2001; Silva, 2006). Por su parte a nivel de músculo esquelético se observaron áreas de necrosis segmental (Figura 2k), las que se distinguen como zonas con pérdida de estriación y coloración eosinofílica, mientras que en tejido cardíaco se observa necrosis en menor proporción respecto a músculo esquelético, pero respecto a presencia de amastigotes es quien presenta el mayor parasitismo asociado a la presencia de infiltrado en intersticio, ya que todos los ratones (6/6) presentaron infiltrado inflamatorio en el intersticio y 5 de ellos presencia de pseudoquistes.

A nivel del intestino sólo se observó inflamación crónica sin daño tisular, en cerebro aumentó leve en presencia de gliosis (Figura 2b) e inflamación de meninges, además de la marcada

presencia de manguito perivascular (Figura 2a), riñón con infiltrado linfoplasmocitario (Figura 2h) y presencia de material proteinaseo tubular (Figura 2g). A nivel hepático de los 3 ratones estudiados, todos presentaron infiltrado en el espacio porta, hematopoyesis extramedular (Figura 2e) y necrosis, ya sea individual (Figura 2f) o extensa. Otros autores han podido comprobar lesiones de igual similitud a nivel hepático, como los focos de necrosis en parénquima hepático, células inflamatorias alrededor de las venas centrolobulillares y de los espacios porta, necrosis focales, espacios porta desorganizados, encontrándose en algunos casos intenso infiltrado con células inflamatorias (Raghona *et al.*, 2006; Pizzi *et al.*, 2005). Nuevamente podemos asociar el gran daño que presenta el hígado frente a la ausencia de pseudoquistes, a la respuesta inmune generada. 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, que causan inflamación del tejido o daño celular (Montiel y Díaz, 2002).

El músculo esquelético fue el órgano que presentó el mayor grado de daño e inflamación, ya que en la gran mayoría de los ratones (5/6) se observó infiltrado mononuclear en el intersticio, células inflamatorias en fibra (2/6) (Figura 2k), células satélites en fibra (2/6) y en todos (6/6) necrosis del tejido muscular (Figura 2l), resultados que concuerdan plenamente con los encontrados por Pizzi y colaboradores (2005), donde de igual manera se encontró que las lesiones a nivel de tejido cardíaco si bien fueron muy marcadas y en gran proporción de ratones, estas fueron de menor intensidad que las encontradas a nivel de tejido músculo esquelético.

La fase crónica inicial de la infección se caracterizaría principalmente por un periodo de colonización de las células de los tejidos y multiplicación intracelular de los amastigotes en los distintos órganos, con excepción del hígado en donde habría sólo tripomastigotes circulantes. La reproducción del parásito a nivel intracelular produciría lisis de los tejidos, esto más los procesos inflamatorios locales explicarían el daño necrótico observado en distintos órganos. No todos ellos se ven afectados de la misma manera, en cuanto al tipo de daño y magnitud, es así que, los menos afectados serían el intestino, riñón y cerebro. Los órganos más dañados por este fenómeno (pseudoquistes/inflamación), el músculo esquelético y corazón. El hígado también se encontraría dentro de los órganos más afectados, pero el mecanismo patogénico estaría explicado posiblemente por un daño inflamatorio local mediado por la presencia de los tripomastigotes en la circulación sanguínea. A diferencia de Raghona y colaboradores (2006),

en este estudio no se encontró presencia de pseudoquistes a nivel hepático, pero se observó la presencia de megacariocitos, lo que podría asociarse a la existencia de una anemia marcada en estos ratones que fue compensada con una hematopoyesis extramedular. Así, podríamos asociar las muertes de los ratones durante esta fase del estudio a una anemia marcada o a la gran cantidad de tejido hepático afectado. Por lo tanto, esta fase sería determinante en la supervivencia de los ratones, bajo las condiciones experimentales de este estudio, ya que si los daños tisulares no representan riesgo vital o su organismo es capaz de reparar dichos daños, sobrevivirá a la etapa siguiente de la infección.

FASE CRÓNICA PROPIAMENTE TAL (60 DÍAS)

A los 60 días p.i., todos los ratones presentaron pelo erizado (datos no mostrados). Las parasitemias fueron totalmente negativas y la presencia del parásito se siguió detectando mediante la PCR en todos los órganos, excepto en intestino. La observación de los pseudoquistes se mantuvo en igual proporción en el riñón (2/6) y disminuyó en un tercio en el cerebro (1/6) con respecto a los 21 días p.i. La disminución más notable fue a nivel del corazón, músculo esquelético e intestino, logrando desaparecer en la totalidad de ellos. El hígado mantuvo su negatividad sobre la presencia de nidos de amastigotes. En cuanto a los procesos inflamatorios y de lesión tisular, en el cerebro no hubo presencia de gliosis, pero sí un aumento leve en la inflamación de las meninges y una leve disminución en la presencia de mangoito perivascular. Se observó que todos los ratones (6/6) a nivel renal, presentaban infiltrado linfoplasmocitario perivascular (Figura 2h), sin daño tisular evidente, al igual que en sus hígados, se encontró infiltrado multifocal y en el espacio portal, con necrosis individual en 4 ratones y necrosis extensa en 3 de ellos. A nivel intestinal, los procesos inflamatorios se mantuvieron casi constantes, destacando inflamación aguda (1/6) y crónica (2/6) (Figura 2j). En el corazón se observó una leve disminución en el infiltrado inflamatorio intersticial (4/6), con mantención de fibrosis (1/6) y necrosis (2/6). La observación más importante se evidenció en el músculo esquelético, en donde los procesos inflamatorios fueron menores, solo identificándose infiltrado mononuclear con predominio de linfocitos, menor proporción de monocitos y células plasmáticas, lo cual coincide con lo encontrado por Pizzi y colaboradores (2005). Adicionalmente a nivel de músculo esquelético prácticamente no se observó presencia de necrosis tisular (1/6), lo cual podría eventualmente estar asociado a la ausencia de pseudoquistes en tejido músculo esquelético.

La fase crónica propiamente tal, en donde los ratones han sobrevivido a la infección por *T. cruzi*, se caracteriza principalmente por una disminución en el número de células parasitadas en los tejidos, detectándose microscópicamente y en forma escasa en riñón y cerebro. En los demás órganos, los parásitos sólo son detectados mediante la PCR, debido a su gran sensibilidad. El único órgano libre de parásitos en esta fase corresponde al intestino. En general, los procesos inflamatorios en los órganos se mantienen casi en forma constantes, a excepción de riñón e hígado, en donde se observa un aumento importante en sus infiltrados celulares. El órgano más afectado en esta fase es nuevamente hígado, presentado un gran número de focos necróticos individuales o extensos a diferencia de lo que ocurre en el músculo esquelético, en donde la necrosis es prácticamente nula. Todo esto difiere de lo encontrado por otros autores donde los tejidos examinados no revelan la presencia de parásitos ni lesiones inflamatorias en ninguno de los animales estudiados (Pizzi *et al.*, 2005). A pesar de ello se ha comprobado que determinadas cepas de *T. cruzi* podrían presentar respuestas inflamatorias sin necesidad de tener presencia de pseudoquistes (Palau, 1996). Por otra parte, se podría asociar el gran daño hepático a una respuesta autoinmune, favorecida por la gran cantidad de células de Kupffer presentes en hígado.

Dentro de los órganos estudiados, los que presentaron menor cantidad de pseudoquistes fueron cerebro y riñón con un 22% (4/18), mientras que en el hígado no se observó la presencia de ellos, no obstante fue uno de los órganos más dañados a nivel histopatológico. Otros estudios en ratones han concluido que el incremento de los niveles plasmáticos de Alanina Transaminasa (ALT) y creatinina en ratones infectados con *T. cruzi* podrían estar relacionados con las importantes lesiones hepáticas y renales, generando en algunos casos a nivel hepático desorganización de la estructura trabecular e infiltración de células mononucleares y a nivel renal atrofia glomerular y necrosis, además de observar que previo a la alteración cardiaca, los ratones infectados presentan infiltración inflamatoria renal que causa daño renal agudo debido a una lesión por isquemia/reperfusión (Rojas *et al.*, 2012). Esto podría explicar el gran daño tisular a nivel renal y hepático a pesar de la ausencia o baja presencia de pseudoquistes a nivel de estos órganos, durante la infección experimental.

Durante el estudio fue posible detectar el DNA de *T. cruzi* a través de la PCR, incluso en ausencia de pseudoquistes, lo cual nos permite sugerir que el parásito permanece en el individuo infectado de forma latente.

CONCLUSIONES

- En la fase aguda de la infección, los procesos inflamatorios fueron lo más relevante a nivel histopatológico, observándose en todos los órganos estudiados, excepto a nivel de corazón y afectando en mayor grado a hígado y riñón.
- En la fase crónica inicial, la presencia de pseudoquistes fue lo más importante a nivel tisular, mientras que los procesos inflamatorios se mantienen y aparece necrosis en músculo esquelético y corazón.
- El hígado es el órgano más afectado, presentando necrosis individual y extensa, además de hematopoyesis extramedular, lo cual indicaría una anemia marcada en estos ratones.
- Durante la fase crónica propiamente tal desaparecen los pseudoquistes, manteniéndose sólo en cerebro y riñón. Los procesos necróticos aumentan en hígado, disminuyendo considerablemente a nivel de músculo esquelético.
- La técnica de PCR fue capaz de detectar la infección experimental por el clon Dm28c de *T. cruzi* durante los diferentes días de sacrificio, incluso en ausencia de pseudoquistes y de parasitemia, lo que indicaría que el parásito permanece de forma latente y por largo tiempo en el individuo infectado.

REFERENCIAS

1. **ATÍAS, A.** 2000. Enfermedad de Chagas. En: Parasitología Clínica. 3^a ed. Ed. Mediterráneo. Santiago. Chile. pp. 255–268.
2. **BOTERO, D.; RESTREPO, M.** 2003. Parasitosis humanas. 4^a Ed. Ed. Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB). Medellín, Colombia. pp. 506-520.
3. **CARDONI, R.; ANTUNEZ, M.I.; ABRAMI, A.** 1999. Respuesta TH1 en la infección experimental con *Trypanosoma cruzi*. ***In:*** Infección experimental con *Trypanosoma cruzi* problemática de la enfermedad de Chagas. Simposio internacional. Buenos Aires, Argentina. 19-20 abril 1999 Academia Nacional de Medicina.
4. **CHAGAS, C.** 1934. Estudo atual da trypanosomiase americana. Rev Biol Hyg 5:58-64
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. **FIOCRUZ - FUNDACION OSWALDO CRUZ.** 2012. Enfermedad de Chagas. [en línea] <http://www.fiocruz.br/chagas_esp/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?tpl=home> [Consulta 13 mayo 2012].
7. **GUARNER, J.; BARTLETT, J.; ZAKI, SR.; COLLEY, DG.; GRIJALVA, MJ.; POWELL, MR.** 2001. Mouse model for Chagas disease: immunohistochemical distribution of different stages of *Trypanosoma cruzi* in tissues throughout infection. Am J Trop Med Hyg. 65(2):152-8.
8. **MINSAL – MINISTERIO DE SALUD CHILE.** 2006. Prevención y control de la enfermedad de Chagas. Guías Clínicas de la Enfermedad de Chagas. [en línea] <<http://www.redsalud.gov.cl/portal/url/item/5d26b93e3cc5a628e04001011e0104c7.pdf>> [consulta 27 diciembre 2011]

9. **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
10. **ORTI, R.; PARADA, M.** 2009. Prevalencia de tripanosomiasis americana en mujeres gestantes de un área de salud. Valencia, 2005-2007. Rev Esp Salud Pública. 83 (4): 543-55
11. **PALAU, M.T.** 1996. Estudio experimental del impacto del estudio clonal de *Trypanosoma cruzi* sobre aspectos medico biológicos. Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid. Madrid, España.
12. **PITTELLA, JE.; MENEGUETTE, C.; BARBOSA, AJ.; BAMBIRRA, EA.** 1990. Histopathological and immunohistochemical study of the brain in the acute and chronic phases of experimental trypanosomiasis cruzi in dogs. Ann Trop Med Parasitol. 1990 Dec;84(6):615-21
13. **PIZZI, T.; WALLACE, A.; VILLAGRA, R.; MUÑOZ, S.; ORTIZ, S.; SOLARI, A.** 2005. Concordancia de lesiones histológicas en ratones infectados por dos poblaciones de *Trypanosoma cruzi* de Chile. Rev Méd Chile 133: 432-438
14. **RAGONHA, L.; ABRAHÃO, A.; SALA, M.; LOPES, R.; RIBEIRO, R.; PRADO, J, DE ALBUQUERQUE, S.; ZUCOLOTO, S.** 2006. Estudio Morfométrico del Hígado de Ratón en la Enfermedad de Chagas Experimental. Int. J. Morphol. [en línea]. [Consulta: 15 Agosto 2012] http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0717-95022006000400015&script=sci_arttext
15. **RAMÍREZ, C.; JARAMILLO, A.; BECERR, A.; MONSALVE, E.; VILLARREA, W.; VILLABONA, R.** 2007. Lesión cerebral como presentación de la enfermedad de Chagas. Primer caso reportado en Colomb. Acta Neurol Colomb 23:15-18a.
16. **RIVERA, I.; MORENO, E.; GONZALEZ, N.; LUGO DE YARBUH, A.** 2000. Caracterización de aislados de *Trypanosoma cruzi* del occidente de Venezuela. Rev. Ecol. Lat. Am. Vol 7 (3): 1:10

- 17. ROJAS, J.; PALACIOS, O.; RONCEROS, S.** 2012. Efecto del aceite esencial de *Aloysia triphylla* britton (cedrón) sobre el *Trypanosoma cruzi* en ratones. Rev. Perú Med. Exp. Salud Pública. 2012; 29(1):61-68.
- 18. ROJAS DE ARIAS, A.; FERRO, E.** 1988. Quantification of *Trypanosoma cruzi* parasitemia by direct micromethod. *Trans Royal Soc Trop Med Hyg.* 82:248.
- 19. ROSAS, F.; VENEGAS, D.; CABRALES, M.** 2007. Enfermedad de Chagas. Sociedad Colombiana de Cardiología y Cirugía Cardiovascular. Bogotá, Colombia. pp 231.
- 20. SILVA, A.** 2006. Meningoencefalite na infecção experimental pelo *Trypanosoma cruzi*: mecanismos moleculares envolvidos na entrada das células inflamatórias no sistema nervoso central. Rio de Janeiro, Tesis de Doctor en Biología celular e molecular. Rio de Janeiro, Brasil. Fundación Oswaldo Cruz. 106 pp
- 21. SOTO, A.** 1998. Diagnóstico parasitológico de la enfermedad de Chagas a través de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Memoria Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. Chile, Fac. Medicina Veterinaria. 59 p.
- 22. 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: 53 – 73.
- 23. WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION.** 2002. Segundo informe del comité de expertos de WHO [en línea] Ginebra, 2002 <http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_905_spa.pdf> [consulta: 11 Enero 2012]
- 24. WINCKER, P.; BRITTO, C.; PEREIRA, JB.; CARDOSO, MA.; OELEMANN, W.; MOREL, CM.** 1994. Use of a simplified polymerase chain reaction procedure to detect *Trypanosoma cruzi* in blood samples from chronic chagasic patients in a rural endemic area. *Am J Trop Med Hyg* 51: 771–777.
- 25. 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.