

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



“COMPARACIÓN DE LA INFECCIÓN EXPERIMENTAL CON
Trypanosoma cruzi SEGÚN SEXO DEL HOSPEDERO EN LA CEPA
DE RATÓN AKR”

GASPAR BAUTISTA ROMO CARTAGENA

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

PROFESOR GUÍA: DR. CLAUDIO ZÚÑIGA M., M.V., M.S.

SANTIAGO, CHILE

-2012-



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



“COMPARACIÓN DE LA INFECCIÓN EXPERIMENTAL CON
Trypanosoma cruzi SEGÚN SEXO DEL HOSPEDERO EN LA CEPA
DE RATÓN AKR”

GASPAR BAUTISTA ROMO CARTAGENA

para optar al Título
de Médico Veterinario.
Curso de Medicina Preventiva

NOTA FINAL:

	NOTA	FIRMA
PROFESOR GUÍA : CLAUDIO ZÚÑIGA MARTÍ
PROFESOR CONSEJERO: ALEJANDRO GARCÍA CARREÑO
PROFESOR CONSEJERO: MARIANA ACUÑA RETAMAR

SANTIAGO, CHILE

-2012-

**Comparación de la infección experimental con *Trypanosoma cruzi*
según sexo del hospedero en la cepa de ratón AKR**

**Comparison of experimental infection with *Trypanosoma cruzi*
according to sex of host in the AKR mouse strain**

Gaspar Bautista Romo Cartagena

Departamento de Medicina Preventiva Animal.

RESUMEN

Quince machos y quince hembras de ratones de la cepa AKR fueron infectados experimentalmente con 2000 tripomastigotes del clon Dm 28c de *Trypanosoma cruzi*. En ambos grupos se midieron los niveles de parasitemia y la mortalidad. Los días 14, 26 y 100 post infección se tomaron muestras de corazón, hígado, riñón, intestino grueso, músculo esquelético y cerebro de 2 ratones sacrificados en cada grupo, para detectar la presencia del parásito mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los animales de ambos sexos se comportaron como susceptibles a la infección, falleciendo un 100% de los machos y un 73% por ciento de las hembras durante el experimento. Las hembras mostraron un pico de parasitemia significativamente mayor que los machos ($p < 0,05$). De las muestras sometidas a PCR, corazón resultó positivo en todos los ratones, tanto machos como hembras, en todos los días muestreados. Todas las muestras obtenidas de machos resultaron positivas a la presencia del parásito, mientras que en los tejidos de hembras se observaron numerosas muestras negativas, dependiendo del individuo muestreado. Los resultados del presente trabajo apoyan la idea que los individuos nunca se curan de la infección, y que a pesar de desaparecer los signos clínicos, el parásito permanece en forma latente en diferentes tejidos, tal vez durante todo el resto de la vida del individuo.

Palabras clave: Enfermedad de Chagas, *Trypanosoma cruzi*, sexo del hospedero, PCR

ABSTRACT

Fifteen males and fifteen females from the AKR mice strain were experimentally infected with 2000 trypomastigotes from Dm 28c clone of *Trypanosoma cruzi*. Parasitemia level and mortality were assessed in both groups. Samples from heart, liver, kidney, large intestine and brain were taken on days 14, 26 and 100 after infection from 2 sacrificed mice on each group to detect the presence of the parasite through polymerase chain reaction (PCR). Both sexes were susceptible to the infection, with one hundred percent of the males dying within the experimental time and seventy three percent of the females. Females showed a significantly higher peak of parasitemia than males ($p < 0,05$). From the samples submitted to PCR, heart was positive in all mice, both males and females. All the samples taken from male mice were positive to the presence of the parasite, while in females many negative samples were observed, depending on the individual from whom the sample was taken. The results of this study support the idea that individuals never got cured from the infection, and even though the clinical signs might disappear, the parasite remains in a latent form in different tissues, perhaps for the rest of the individual's life

Keywords: Chagas disease, *Trypanosoma cruzi*, sex of host, PCR

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas, también conocida como tripanosomiasis americana o enfermedad de Chagas-Mazza, es causada por el protozoo flagelado *Trypanosoma cruzi* (OPS, 2003). Dicho parásito afecta exclusivamente a mamíferos, y es transmitida a ellos a través de insectos vectores pertenecientes a la familia Reduviidae (WHO, 2002).

Se estima que entre 16 y 18 millones de personas estarían afectadas por esta enfermedad en el mundo, estando presente el parásito en un territorio comprendido entre el paralelo 42º norte, en Estados Unidos, hasta el paralelo 34º sur en Chile y 42º sur en Argentina (OPS, 2003; WHO, 2002). La enfermedad se transmite localmente en Argentina, Belice, Bolivia, Brasil, Colombia, Costa Rica, Ecuador, El Salvador, Guyana Francesa, Guatemala, Guyana, Honduras, México, Nicaragua, Panamá, Paraguay, Perú, Surinam y Venezuela. En lo que respecta a Chile, este fue declarado libre de la transmisión vectorial en 1999 (WHO, 2002). Sin embargo, dicha condición solo hace referencia a la erradicación del vector *Triatoma infestans* de los hábitats domésticos, habiéndose descrito recientemente la presencia tanto de dicho vector como del parásito, en hábitats silvestres (Bacigalupo *et al.*, 2010).

T. cruzi pertenece al phylum Sarcomastigophora, subphylum Mastigophora, orden Kinetoplastida. Dicho orden incluye a organismos flagelados que presentan un kinetoplasto, organelo que contiene DNA mitocondrial (WHO, 2002; Stevens *et al.*, 2001).

Este parásito presenta un ciclo biológico complejo, alternando entre sangre y tejidos de un hospedero vertebrado, y el tracto digestivo de un vector artrópodo hematófago, con cambios en su morfología y expresión antigénica (Stevens *et al.*, 2001). Es así que *T. cruzi* presenta a lo largo de su ciclo biológico tres estados, epimastigote, tripomastigote y amastigote, caracterizados por la forma general de la célula, la posición del kinetoplasto en relación al núcleo y la región desde la cual emerge el flagelo (De Souza, 1984).

En el hospedero mamífero, *T. cruzi* presenta dos formas: los tripomastigotes, formas extracelulares infectantes no replicativas presentes en sangre; y los amastigotes, formas intracelulares replicativas presentes en los tejidos. En tanto, en el insecto vector, también se encuentran dos formas, ambas extracelulares: los epimastigotes, en el intestino medio, y los tripomastigotes metacíclicos, presentes en el intestino terminal. Los tripomastigotes sanguíneos se describen de aspecto fusiforme, de unos 15 a 20 µm de largo, presentando un kinetoplasto

del cual nace un flagelo en uno de sus extremos. Los amastigotes corresponden a la forma replicativa intracelular en el hospedero, siendo de aspecto oval, de 2 x 3 μm , y presentando un pequeño flagelo intracelular. Los epimastigotes son la forma replicativa presente en el intestino del vector, siendo de aspecto fusiforme y de unos 20 μm de largo. Por último, los tripomastigotes metacíclicos son más largos, delgados y rectos que los tripomastigotes sanguíneos, correspondiendo estos dos a las formas infectantes del parásito (Atías y Apt, 1991).

El vector adquiere la infección al alimentarse de un hospedero infectado por el parásito. Luego los insectos vectores defecan mientras se alimentan de la sangre de un nuevo hospedero o inmediatamente después de hacerlo, eliminando en sus deyecciones la forma infectante de *T. cruzi*, la que ingresaría al organismo a través de la piel dañada por la picadura (OPS, 2003). Si bien esta es la ruta clásica descrita para la infección, existen dudas respecto a la capacidad del parásito para ingresar a través de la piel intacta, por lo que se postula que su ingreso al organismo se produciría con mayor frecuencia a través de mucosas a nivel ocular, nasal o bucal (Montenegro *et al.*, 2002). También se describen otras vías, con menor importancia que la vectorial, como son la transmisión congénita, la transfusión o el trasplante de órganos desde personas infectadas y la ingestión de alimentos contaminados con heces del insecto vector (WHO, 2008).

Se describe que cerca de 150 especies de mamíferos son susceptibles a la infección con *T. cruzi*, siendo de importancia epidemiológica por su rol como reservorios del parásito los roedores, lagomorfos domésticos o silvestres, y los perros y gatos. El parásito no infecta a aves ni animales de sangre fría, pero las aves domésticas son importantes como fuente de alimento para el vector (OPS, 2003).

Los vectores que participan en el ciclo del parásito pertenecen a la familia *Reduviidae*, subfamilia *Triatominae* (Canals *et al.*, 1993). Si bien se describen 16 géneros susceptibles a la infección por *T. cruzi*, los más relevantes en su transmisión son *Panstrongylus*, *Rhodnius* y *Triatoma* (Goble 1970; Pinto-Días, 1984). Dichos insectos son conocidos vulgarmente como “vinchucas” en Chile y Argentina, siendo la especie más importante en estos países *Triatoma infestans*, por sus hábitos domésticos y la alta proporción de insectos infectados. En Chile también se describe la presencia de *Mepraia spinolai* y *Mepraia gajardo* como vectores silvestres de *T. cruzi* (Canals *et al.*, 1993). Sin embargo, por sus hábitos silvestres y niveles de infección, estos últimos parecen presentar menor importancia epidemiológica que *T. infestans*

(Botto-Mahan et al., 2008). Recientemente fue descrita una nueva especie, *Mepraia parapatrica*, distribuida en el litoral de la II y III regiones (Frías-Laserre, 2010). Sin embargo, su importancia en la transmisión de *T. cruzi* aún no ha sido mayormente estudiada.

Tanto el parásito como los insectos vectores sólo se encuentran en América, por lo que el contagio vectorial de la enfermedad, que corresponde a la principal vía de infección, sólo se presenta en este territorio, aunque las migraciones de individuos infectados son motivo de preocupación en Estados Unidos y Europa (Stevens *et al.*, 2001).

La enfermedad en el hombre presenta tres fases: aguda, indeterminada y crónica (OPS, 2003). La fase aguda se da a cualquier edad, pero afecta en mayor medida a personas menores de 15 años, y en mayor frecuencia antes de los 5 años (WHO, 2002). Puede manifestarse con cefalea, fiebre, mialgia y el signo de Romaña (edema uniparpebral, acompañado de conjuntivitis unilateral y reactividad de los linfonodos locales), pudiendo llegar a la muerte. Posterior a la fase aguda, sobreviene la fase indeterminada, que corresponde a un período de infección latente, con parasitemias bajas y ausencia de signología clínica. Esta fase puede durar un tiempo indefinido o progresar a la etapa crónica (OPS, 2003). En la etapa crónica se afectan de manera irreversible órganos internos como el corazón, el esófago, el colón y el sistema nervioso periférico (WHO, 2008). La cardiopatía chagásica es quizá la manifestación más importante de la forma crónica, presentando manifestaciones clínicas como anomalías en el sistema de conducción, arritmias atriales y ventriculares, falla cardíaca congestiva, tromboembolismos sistémicos o pulmonares y muerte súbita cardíaca. Este cuadro se presenta entre 10 y 30 años posterior a la fase aguda (Rassi Jr et al., 2009). También pueden manifestarse vísceromegalias, siendo las más frecuentes el megacolon y el megaesófago (OPS, 2003). Dichas alteraciones ocurrirían principalmente como resultado del daño causado por la infección con *T. cruzi* al sistema nervioso entérico (Matsuda et al., 2009).

La fase aguda puede durar varios meses en el hombre y algunas semanas en el ratón, y en ella los parásitos se replican rápidamente en diferentes tejidos del hospedero. Por el contrario, durante la fase crónica hay escasa replicación de los parásitos, teniendo una duración de varias décadas en el hombre y de meses en el ratón (Atías y Apt, 1991).

En lo que respecta al diagnóstico de esta enfermedad, algunos de los métodos usados hoy en día son el xenodiagnóstico, la serología y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). En el primero, se utiliza el insecto vector como medio de cultivo biológico del parásito para así

detectar la infección en el hombre o animales. Se caracteriza por su alta especificidad y su sensibilidad variable según la fase de la infección (Schenone, 1999).

Respecto a la serología, se basa en la detección de anticuerpos contra el parásito presentes en el suero del paciente. Se utilizan técnicas como la hemaglutinación indirecta, inmunofluorescencia indirecta y ELISA, variando su sensibilidad entre el 96 y 98% según la prueba (OPS, 2003).

Por su parte, la técnica de PCR consiste básicamente en la amplificación de un segmento específico de DNA a modo de poder llevar dicho DNA a niveles detectables (McPherson y Møller, 2006). Desde hace un tiempo el PCR en muestras de sangre ha sido introducido en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas en sus diferentes etapas, demostrando ser una herramienta muy sensible y específica (Noireau, 1999).

Múltiples factores tanto dependientes del hospedero como del parásito se encuentran involucrados en la determinación de la resistencia o susceptibilidad a la infección con este parásito. En relación al hospedero se ha estudiado la influencia de factores genéticos como la combinación particular de genes del Complejo Mayor de Histocompatibilidad, la edad y la cepa de ratón, en el caso de animales de experimentación (Zúñiga *et al.*, 2002).

En el presente trabajo se analizó la influencia del sexo del individuo infectado en un modelo murino y se utilizó la técnica de PCR para determinar la presencia del parásito, no con el método convencional que usa muestras de sangre, sino utilizando muestras de diferentes tejidos obtenidas de ambos grupos, en distintos días de infección.

MATERIALES Y MÉTODOS

Parásitos

Las infecciones experimentales se realizaron utilizando tripomastigotes sanguíneos del clon Dm28c de *T. cruzi*, el cual es mantenido en el bioterio de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile por pasajes sucesivos en ratones de la cepa Balb/c.

Ratones

Se utilizaron dos grupos de ratones de la cepa AKR, uno de machos y otro de hembras, compuesto cada uno por 20 individuos de 10 semanas de edad. De estos, 15 individuos de cada grupo fueron inoculados por vía intraperitoneal con 0,2 mL de una dilución de sangre que

contenía aproximadamente 2000 tripomastigotes sanguíneos del parásito, y los 5 restantes fueron usados como control. Dichos animales fueron alojados en jaulas mantenidas en el bioterio de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile. Los animales fueron separados por sexo, sin haber más de cinco individuos por jaula. El sustrato utilizado (viruta) era cambiado regularmente una vez por semana y contaban con comida y agua *ad libitum*.

Modelo de infección

La sangre fue extraída mediante punción cardíaca de un ratón Balb/c infectado con el clon Dm28c y sacrificado por inhalación de CO₂. Luego, la sangre con parásitos fue colocada en un frasco estéril con 0,1 mL de citrato de sodio como anticoagulante. Se realizó una dilución con 10 µL de sangre en 490 µL de suero fisiológico y se hizo un recuento de parásitos en una cámara de Neubauer. De este modo, se determinó la cantidad total de parásitos en el total de sangre obtenida mediante la punción cardíaca, y con este dato se calculó la dilución necesaria para obtener una dosis infectante de 2000 parásitos en 0,2 mL de inóculo, que fue la cantidad a aplicar a cada ratón.

Considerando que los inóculos son diluciones de sangre de ratones Balb/c con presencia de parásitos, se inocularon 5 ratones control en cada grupo con una dilución de sangre equivalente a la del inóculo, pero de un ratón Balb/c sin infectar, para evidenciar posibles efectos adversos inducidos por la sangre de los ratones Balb/c y las múltiples sangrías, factores independientes del parásito, que pudieran sesgar los resultados del experimento.

Estudio de parasitemias

Para determinar la prepatencia y los niveles de parasitemia, los animales infectados se sangraron a partir del tercer día postinfección y luego día por medio hasta que la parasitemia fue negativa. La sangre de los ratones infectados se obtuvo de la vena caudal mediante el corte de la punta de la cola, previa ubicación del ratón en un dispositivo de sujeción, y fue colectada en tubos de microhematocrito heparinizados. Luego, cada muestra fue centrifugada a 700 g por 5 minutos y se dejó incubar por 30 minutos a 37° C. Tras la centrifugación, se midió el volumen de sangre presente en cada tubo. Se espera que la mayor concentración de parásitos se halle en la zona leucoplaquetaria, entre sangre y plasma, zona en la que el tubo fue cortado mediante el uso de un lápiz diamante para entonces colocar este volumen en un portaobjeto, que luego se cubrió con un cubreobjeto de 20x20 mm. En esta muestra se contaron los parásitos en 50 campos al azar, con un aumento de 400x. Finalmente, se proyectó esa cantidad absoluta a parásitos por mL, teniendo en cuenta el volumen total de sangre presente en el tubo de la

muestra, todo lo anterior de acuerdo al método descrito por Arias y Ferro (1988). Los resultados del número de parásitos obtenidos en cada día estudiado se expresaron como el promedio de parasitemia del grupo, más la desviación estándar correspondiente.

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

a) Obtención de muestras.

Dos ratones de cada grupo fueron sacrificados por inhalación de CO₂ a los 14, 26 y 100 días p.i., basados en estudios previos realizados por Zúñiga *et al.* (1998). Se escogieron para el sacrificio los individuos que presentaban mayores niveles de parasitemia dentro de cada grupo. En dichas fechas se extrajo el corazón, hígado, riñones, intestino, músculo esquelético y cerebro de cada ratón sacrificado para su estudio mediante PCR. Las muestras se mantuvieron congeladas hasta su procesamiento para la extracción de DNA.

b) Extracción del DNA.

Para obtener el DNA de *T. cruzi* a partir de dichos órganos, éstos fueron lavados con PBS pH 7,2, cortados en trozos pequeños de aproximadamente 20 a 30 µg y depositados en tubos eppendorf con 180 µL de tampón ATL y 20 µL de proteinasa K. Luego fueron macerados con una bagueta e incubados a 56 °C toda la noche. Al día siguiente se agregaron 200 µL de buffer AL, fueron homogenizados en vórtex por 15 segundos e incubados a 70 °C por 10 minutos. Posteriormente se centrifugaron en microcentrífuga CAPSULE TOMY HF-120 y se le agregaron 200 µL de etanol 100%. La extracción se realizó según protocolo del Kit QIAamp blood (Lab. QIAGEN, Miami-USA).

c) Amplificación.

El DNA obtenido mediante el procedimiento antes descrito fue agregado a tubos de PCR que contenían el Master Mix, constituido por 10x buffer; dATP, dCTP, dGTP y dTTP 10 mM; MgCl₂ 50 mM; *Taq* DNA 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.

Posteriormente los tubos de PCR con 80 µL de Master Mix y 20 µL de muestra fueron introducidos en un Termociclador Minicicler (Lab. M.J. Research, USA) programado con 1 ciclo de 94 °C/5min - 40 ciclos de 94 °C/20 seg – 57 °C/1 0 seg – 72 °C/10 seg y un ciclo final de 72°C/7 min. Se utilizó agua bidestilada y DNA de tripomastigotes como control negativo y positivo respectivamente.

d) Electroforesis.

Para revelar la presencia de ADN, 15 μ L 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 c.s.p. 100 mL). Los amplificados se sometieron 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 10 μ L de Bromuro de etidio.

e) Revelado.

Para identificar las 330 pb del ADN de la región hipervariable del kinetoplasto de *T. cruzi*, el gel de corrida se observó bajo transiluminador TFP-10M (Vilbes Lourmat).

Análisis estadístico

Para analizar las diferencias de parasitemia entre ambos grupos se compararon sus medias en el día de máximo nivel mediante la prueba de t de student para muestras independientes ($\alpha=0,05$). Para evaluar las diferencias entre grupos obtenidas en la prueba de PCR se hizo un análisis descriptivo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los niveles de parasitemia de los animales infectados se expresan en el gráfico número 1. En este se puede observar que tanto machos como hembras se infectaron con la dosis inoculada, presentando una prepatencia de 5 días. El pico de parasitemia, en el caso de los machos, se registró al día 9 post infección (p.i.), alcanzando una parasitemia promedio de 217.000 parásitos por mL de sangre. En el caso de las hembras, dicho pico fue significativamente mayor ($p<0,05$), alcanzando los 690.000 parásitos promedio por mL de sangre al día 13 p.i. En el caso de los machos, estos se hicieron negativos a la presencia de parásitos en sangre el día 21 p.i., mientras que las hembras se volvieron negativas al día 23 p.i.

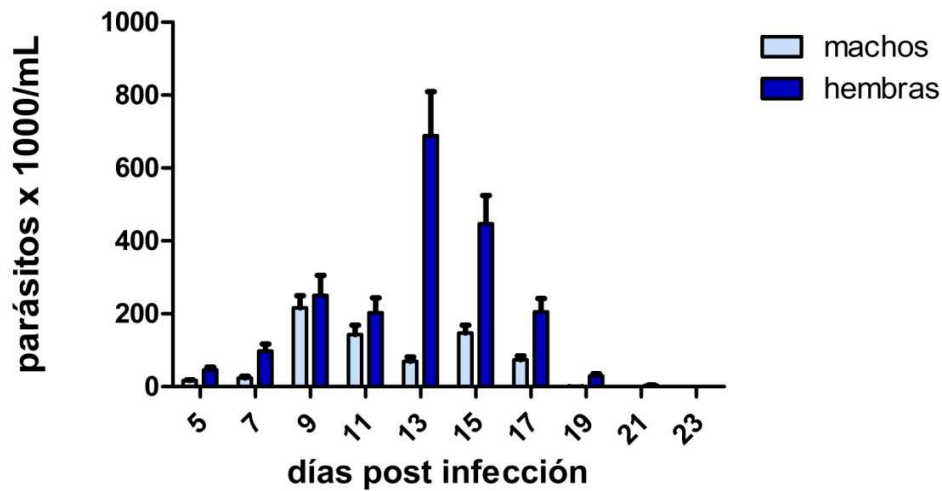


Gráfico 1: Niveles de parasitemia de ratones machos y hembras de la cepa AKR infectados con 2000 parásitos del clon Dm 28c de *T.cruzi*.

En el gráfico número 2 se observan las curvas de supervivencia de machos y hembras. Es posible observar que en el caso de los machos, el 100% de los individuos murió al día 35 p.i., muriendo los primeros individuos al día 26 p.i. En el caso de las hembras, el primer deceso se produjo el día 14 p.i., y al cabo de tres meses p.i. murió el 73 % de los animales. El 27 % restante sobrevivió pasado el tiempo relevante para el experimento. En dichos cálculos no fueron incluidos los animales sacrificados para la obtención de muestras. Cabe consignar que no ocurrieron decesos en el grupo control.

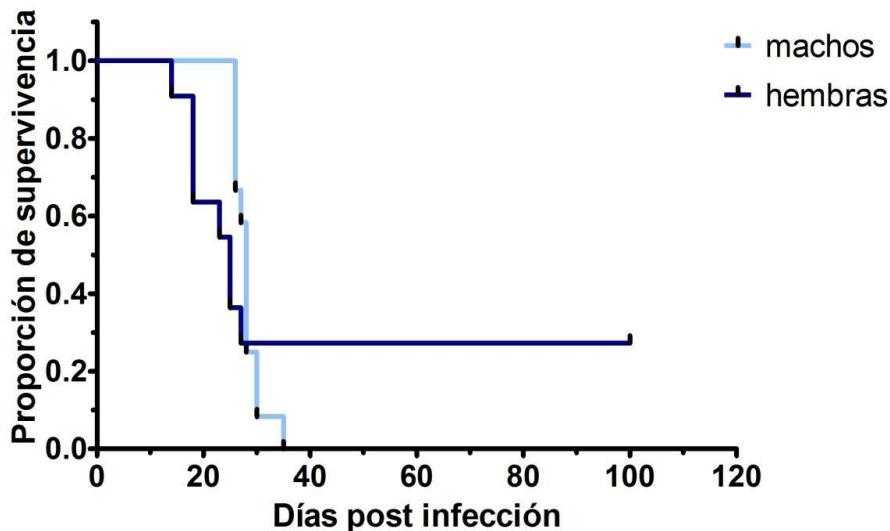


Gráfico 2: Supervivencia de ratones machos y hembras de la cepa AKR infectados con 2000 parásitos del clon Dm 28c de *T.cruzi*.

Estudios previos sugieren que existen diferencias en la infección por *T. cruzi* entre machos y hembras, apreciándose usualmente mayores niveles de parasitemia y mortalidad en los primeros (Hauschka, 1947; Do Prado *et al.*, 1999; Schuster y Schaub, 2001; Micucci *et al.*, 2010). Si bien en el presente estudio se apreció un mayor nivel de mortalidad en los machos, las parasitemias observadas fueron superiores en las hembras. Lo anterior refuerza la idea planteada por Minoprio *et al.* (1989), quienes sostienen que si bien la parasitemia es un factor a tener en cuenta en el desarrollo de la infección por *T. cruzi*, no parece haber siempre una relación directa entre los niveles de parasitemia alcanzados y la mortalidad de los animales infectados.

Diversas explicaciones se han planteado para las diferencias en susceptibilidad a la infección con *T. cruzi* en machos y hembras. Una posible explicación serían las diferencias hormonales entre ambos sexos, pero la evidencia no es del todo clara al respecto. Se ha descrito que hembras ovariectomizadas de *Calomys callosus* infectadas con la cepa Y del parásito presentaron niveles de parasitemia mayores que las hembras intactas, y a su vez, hembras ovariectomizadas, pero sometidas a inyecciones diarias de progesterona, estradiol o ambos, presentaron niveles de parasitemia similares a las hembras intactas (Do Prado Jr. *et al.*, 1998). Otro estudio en ratones describió que al ser sometidos a dosis bajas de estradiol, previo a la infección con *T. cruzi*, estos mostraban iguales o menores niveles de parasitemia y mortalidad que el grupo control, pero al ser sometidos a dosis altas, ambos parámetros eran mayores (De Souza *et al.*, 2001).

Por otro lado, la gonadectomía en machos de *C. callosus* previo a la infección con la cepa Y de *T. cruzi* indujo una disminución en los niveles de parasitemia comparados con el grupo control, mientras que la reconstitución hormonal con testosterona revirtió este efecto (Prado Jr. *et al.*, 1999). Sin embargo, en otros estudios, la castración no afectó los niveles de parasitemia ni las tasas de mortalidad observados en machos de ratón (Chapman *et al.*, 1975) ni de ratas (Pérez *et al.*, 2009).

En un estudio llevado a cabo en ratones, que buscaba evaluar el efecto del ambiente social de los machos en el desarrollo de la infección, no se encontró una asociación significativa entre los niveles de testosterona y los niveles de parasitemia. Por otro lado, hubo una fuerte correlación entre los niveles de parasitemia y el rango social dentro del grupo de los machos analizados, siendo estas más altas en la medida que el rango social era menor (Schuster y Schaub, 2001). En este mismo estudio se constató que los machos mantenidos en jaulas grupales presentaban parasitemias mayores que machos mantenidos aislados, y estos últimos no mostraban

diferencias significativas respecto a las hembras. Esto, junto con lo planteado en una revisión hecha por Klein (2004), indicaría que otro factor a tener en cuenta para explicar las diferencias en susceptibilidad según el sexo, serían las diferencias a nivel conductual que se manifiestan entre ambos sexos. Lo anterior adquiere particular relevancia si se considera que en el presente estudio tanto los machos como hembras fueron alojados en jaulas grupales.

Si bien en este trabajo se observaron diferencias significativas en los niveles de parasitemia entre ambos sexos, esto no se reflejó en la mortalidad observada, de acuerdo a la cual ambos sexos se comportaron como susceptibles a la infección.

La tabla 1 muestra los resultados obtenidos de la prueba de reacción en cadena de la polimerasa para las muestras obtenidas de los ratones machos, al día 14 y 26 p.i. Debido a la mortalidad previa de todos los machos al día 100 p.i., no fue posible obtener muestras en este día. Es posible observar que en los tres individuos analizados, dos para el día 14 p.i. y uno para el día 26 p.i., todos los órganos muestreados fueron positivos a la presencia de DNA del parásito.

Tabla 1: resultados de la Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en los órganos de los machos sacrificados.

Días post-infección	14		26
Ratón	1	2	3
Órgano			
Corazón	+	+	+
Hígado	+	+	+
Riñón	+	+	+
Intestino grueso	+	+	+
Músculo esquelético	+	+	+
Cerebro	+	+	+

En la tabla 2 es posible observar los resultados obtenidos de la prueba de reacción en cadena de la polimerasa para las muestras obtenidas de las hembras los días 14 p.i, 26 p.i. y 100 p.i. Es posible observar que, a diferencia de los machos, la mayoría de las hembras no presenta reacciones positivas en todos los órganos muestreados.

Tabla 2: resultados de la Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en los órganos de las hembras sacrificadas.

Días post-infección	14		26		100	
Ratón	1	2	3	4	5	6
Órgano						
Corazón	+	+	+	+	+	+
Hígado	-	-	+	+	+	-
Riñón	+	+	+	+	+	-
Intestino grueso	-	-	-	+	-	+
Músculo esquelético	+	+	+	+	+	-
Cerebro	+	+	+	+	+	-

Considerando los resultados en machos y hembras, podemos apreciar que en la totalidad de ellos, corazón resultó positivo a la presencia de DNA del parásito. Esto concuerda con el hecho de que sea la cardiomiopatía chagásica la manifestación clínica más frecuentemente observada en el hombre (WHO, 2002). Las muestras de cerebro, músculo esquelético y riñón fueron positivas en todos los animales analizados, salvo en una de las hembras sacrificadas a los 100 días p.i. Por último, hígado e intestino grueso fueron los órganos que resultaron positivos en un menor número de muestras.

Si tenemos en cuenta que muchas de las muestras fueron tomadas de animales con parasitemia negativa e incluso clínicamente sanos, estos resultados refuerzan la idea de que el parásito persiste de manera latente y crónica en diferentes tejidos. Esto se llevaría a cabo mediante diversos mecanismos de evasión inmunitaria, que llevarían, durante la fase crónica, a un equilibrio entre la eliminación de parásitos por parte del sistema inmune y la replicación de éstos (DosReis, 2011).

Los resultados obtenidos en las muestras sometidas a PCR también dan cuenta de que, a pesar que habitualmente la mayoría de las cepas de *T.cruzi* son miotrópicas, el parásito puede afectar una gran variedad de tejidos. Otros estudios realizados en ratones mediante histopatología dejan en evidencia la presencia del parásito en tejidos tan variados como corazón, músculo esquelético, yeyuno, colon, hígado, pulmones, vejiga, pene, vesículas

seminales, próstata, páncreas, cerebro, glándulas adrenales, tiroides, testículos y ovarios (de Scorza *et al.*, 1996; Calabrese *et al.*, 1994).

Si bien se ha sugerido que la diferencia en la susceptibilidad al parásito podría deberse a la capacidad de los individuos para recuperarse de las lesiones generadas por éste en los diversos tejidos (Vera, 2005), los resultados del presente trabajo sugieren que también habría en los individuos resistentes una menor tasa de órganos infectados. De todos modos, dicha observación sería solo válida para la cepa estudiada y se requerirían mayores estudios para confirmar o descartar dicha idea, así como los mecanismos subyacentes a dicho fenómeno.

CONCLUSIONES

En la cepa de ratones AKR ambos sexos se comportaron como susceptibles a la infección con el clon Dm 28c de *T.cruzi*, si bien en los machos murió la totalidad de los individuos infectados, mientras que en las hembras sobrevivió un veintisiete por ciento de ellas al día 100 p.i.

A pesar de tener una mayor supervivencia, las hembras mostraron un pico de parasitemia mayor que los machos.

En las muestras de PCR, corazón resultó positivo a la presencia de DNA del parásito en la totalidad de los individuos muestreados, tanto machos como hembras.

En machos, todas las muestras resultaron positivas, mientras que en hembras, la cantidad de muestras positivas a la presencia del parásito fue menor, siendo hígado e intestino grueso los tejidos que presentaron la mayor cantidad de resultados negativos.

Las muestras positivas tomadas de individuos con parasitemia negativa y clínicamente sanos demuestran la capacidad del parásito de persistir en los tejidos y parecen apoyar la idea de que los individuos infectados nunca se curan de la enfermedad.

REFERENCIAS

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

ATÍAS A, APT W. 1991. Enfermedad de Chagas. En: *Parasitología Clínica.* 3^a ed. Ed. Mediterráneo. Santiago. Chile. pp 255 – 268.

BACIGALUPO A, TORRES-PÉREZ F, SEGOVIA V, GARCÍA A, CORREA J, MORENO L, ARROYO P, CATTAN P. 2010. Sylvatic foci of the Chagas disease vector *Triatoma infestans* in Chile: description of a new focus and challenges for control programs. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 105(5): 633-641. [En línea] <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0074-02762010000500006&script=sci_arttext> [Consulta: 7 de enero 2012].

BOTTO-MAHAN C, SEPÚLVEDA M, VIDAL M, ACUÑA-RETAMAR M, ORTIZ S, SOLARI A. 2008. *Trypanosoma cruzi* infection in the sylvatic kissing bug *Mepraia gajardoi* from the Chilean Southern Pacific Ocean coast. *Acta Tropica* 105: 166–169. [En línea] <http://200.89.70.78:8080/jspui/bitstream/2250/7514/1/Botto_Mahan_Carezza.pdf> [Consulta 23 de febrero 2011].

CALABRESE KS, LAGRANGE PH, DA COSTA SC. 1994. *Trypanosoma cruzi*: histopathology of endocrine system in immunocompromised mice. *Int J Exp Pathol.* 75(6):453-462.

CANALS M, CATTAN PE, EHRENFELD M. 1993. Algunas estimaciones numéricas de la importancia epidemiológica de los vectores de la enfermedad de Chagas en Chile. *Parasitol al Día* 17: 79 – 86.

CHAPMAN WL, HANSON WL, WAITS VB. 1975. The influence of gonadectomy of host on parasitemia and mortality of mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *J. Parasitol.* 61: 213-216.

DE SCORZA C, HERRERA L, URDANETA-MORALES S. 1996. *Trypanosoma* (Schizotrypanum) *cruzi*: histopathology in mice infected with strains isolated from *Didelphis marsupialis* from the valley of Caracas (Venezuela). *Acta Cient Venez.* 47(4): 244-247.

DE SOUZA EM, RIVERA MT, ARAÚJO-JORGE TC, DE CASTRO SL. 2001. Modulation induced by estradiol in the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Parasitol Res.* 87(7): 513-520.

DE SOUZA W. 1984. Cell Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Int Rev Cytol* 86: 197-283.

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

DO PRADO JR JC, ANSELMO-FRANCI J, DE ANDRADE JR H, KLOETZEL J. 1999. Influence of male gonadal hormones on the parasitemia and humoral response of male *Calomys callosus* infected with the "Y" strain of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol. Res.* 84: 826-829.

DOSREIS GA. 2011. Evasion of immune responses by *Trypanosoma cruzi*, the etiological agent of Chagas disease. *Braz. J. Med. Biol Res.* 44: 84-90.

GOBLE FC. 1970. South American trypanosomiasis. En: *Immunity to Parasitic Animals*. Vol 2. New York, USA. Ed G.J. Jackson, R. Herman y J. Singer. Appleton Century Crofts. p. 597.

HAUSCHKA, T. 1947. Sex of host as factor in Chagas disease. *J. parasitol.* 33: 399-405.

KLEIN SL. 2004. Hormonal and immunological mechanisms mediating sex differences in parasite infection. *Paras. Immunol.* 26: 247-264.

MATSUDA NM, MILLER SM, ÉVORA PRB. 2009. The chronic gastrointestinal manifestations of chagas disease. *Clinics.* 2009; 64(12):1219-1224.

MCPHERSON M, MØLLER S. 2006. PCR. 2ª ed, Cornwall, UK. Ed. Taylor & Francis group. 292p.

MICUCCI L, BAZÁN P, FAURO R, BAEZ A, LO PRESTI M, TRIQUEL M, PAGLINI-OLIVA P, RIVAROLA H. 2010. Importancia del sexo del huésped en el desarrollo de la infección por *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Fac. Cien. Méd.* 67 (2): 69-72.

MINOPRIO P, ITOHARA S, HEUSSER C, TONEGAWA S, COUTIHNO A. 1989. Immunobiology of murine *T. cruzi* infection: the predominance of parasite-nonspecific responses and the activation of TCRI cells. *Immunol. Rev.* 112: 183-207.

MONTENEGRO V, JIMENEZ M, PINTO-DIAS JC, ZELEDÓN R. 2002. Chagas disease in dogs from endemic areas of Costa Rica. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97 : 491 – 494.

NOIREAU F. 1999. La enfermedad de Chagas y sus particularidades epidemiológicas en Bolivia. En: Cassab JA, Noireau F, Guillén G. Chagas: La enfermedad en Bolivia. Conocimientos científicos actuales al inicio del programa de control. La Paz, Bolivia. Ministerio de Salud y Prevención Social. pp 17-47.

OPS-ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. 2003. Zoonosis y enfermedades comunes al hombre y los animales. 3ª ed. Washington DC. Vol. 3. 544p.

PÉREZ AR, PASCUTTI MF, FONTANELLA G, MARTÍN A, TARTALINI V, NOCITO AL, BERRA H, PEZZOTTO S, ROMANO M, REVELLI S. 2009. Influencia de la testosterona sobre la infección causada por *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Méd. Rosario* 75: 84-92.

PINTO-DÍAS JC. 1984. Enfermedad de Chagas, Epidemiología Clínica-Terapéutica. Programa de salud humana. Buenos Aires, Argentina.pp: 1-106.

RASSI JR A, RASSI A, MARIN-NETO JA. 2009. Chagas heart disease: pathophysiologic mechanisms, prognostic factors and risk stratification. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.* 104(Suppl. I): 152-158.

SCHENONE H. 1999. Xenodiagnostico. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.* 94 (Suppl. I): 289-294.

SCHUSTER JP, SCHAUB GA. 2001. Experimental Chagas disease: the influence of sex and psychoneuroimmunological factors. *Parasitol. Res.* 12: 994-1000.

STEVENS J, NOYES H, SCHOFIELD C, GIBSON W. 2001. The molecular evolution of Trypanosomatidae. *Adv Parasitol.* 48: 1 – 53.

VERA A. 2005. Desarrollo de la infección con *Trypanosoma cruzi* en tres cepas puras de ratones. Tesis (Medico Veterinario). Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. 44 p.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. 2002. Control of Chagas Disease. [En línea] <http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_905.pdf> [Consulta: 11 de febrero 2011].

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. 2008. Chagas disease: control and elimination. [En línea] <http://apps.who.int/gb/ebwha/pdf_files/EB124/B124_17-en.pdf> [Consulta: 3 de marzo 2011].

ZÚÑIGA C, PARRA A, VELA H, COURCELLES MT, VARGAS R, VERGARA U. 1998. Estudio histopatológico en ratones infectados experimentalmente con *Trypanosoma cruzi*. Parasitol. día 22(1-2): 23-28.

ZÚÑIGA C, VARGAS R, VERGARA U. 2002. Evolución de la infección con *Trypanosoma cruzi* en cepas susceptibles y resistentes de ratones. Arch Med Vet 2: 183 – 188.