



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



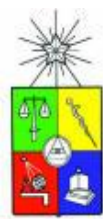
COMPARACION DE LA INFECCION CON TRES CEPAS
DE *Trypanosoma cruzi* EN UN MODELO MURINO

FRANCISCO SCHNEUER BRAHM

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

PROFESOR GUIA: CLAUDIO ZUÑIGA MARTI M.V. M.S.

SANTIAGO, CHILE
2003



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



COMPARACION DE LA INFECCION CON TRES CEPAS DE *Trypanosoma cruzi* EN UN MODELO MURINO

FRANCISCO SCHNEUER BRAHM

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

NOTA FINAL:

	NOTA	FIRMA
PROFESOR GUIA: DR. CLAUDIO ZUÑIGA MARTI
PROFESOR CONSEJERO: DRA. RAQUEL CEPEDA CANALES
PROFESOR CONSEJERO: DR. ULISES VERGARA CASTILLO

SANTIAGO, CHILE
2003

RESUMEN

En el presente trabajo se analizó el desarrollo de la infección con 2000 trypomastigotes sanguíneos de las cepas Munantá, San Antonio y Tulahuén de *Trypanosoma cruzi*, en ratones de la cepa ACA.

Los resultados mostraron que el 100 % de los animales infectados fueron altamente susceptibles a la infección con las cepas San Antonio y Tulahuén, muriendo todos los ratones alrededor de las tres semanas post-infección. El grupo de ratones infectados con la cepa Munantá se comportaron como resistentes, sobreviviendo el 90 % de los animales infectados. A pesar de lo anterior, este grupo de ratones presentó los más altos niveles de parasitemia y la cepa San Antonio los niveles más bajos.

Se realizó un estudio histopatológico de tejido cardíaco de los animales infectados. Los resultados mostraron que sólo en animales infectados con la cepa Tulahuén se observa correlación entre nivel de parasitemia, daño tisular, infección celular y muerte. La infección con la cepa San Antonio mostró gran cantidad de parásitos intracelulares y daño tisular pero con una baja parasitemia y de corta duración. Por el contrario, los ratones infectados con la cepa Munantá mostraron altos niveles de parasitemia, pero en los tejidos se encontró una escasa cantidad de pseudoquistes. Es probable que el lugar de multiplicación de esta cepa de parásito sea un tejido distinto al corazón.

Estos resultados apoyan la idea que los niveles de parasitemia alcanzados durante una infección con *T. cruzi*, no siempre se correlacionan con la susceptibilidad o resistencia, al menos en el modelo murino.

ABSTRACT

The infection development with 2000 blood trypomastigotes of Tulahuen, Munantá and San Antonio *Trypanosoma cruzi* strains, in ACA mice was analyzed.

The results showed that 100% of the infected animals were highly susceptible to infection with San Antonio and Tulahuen strains, all mice died around the third week post-infection. The group of Munantá strain infected mice was resistant, 90% of the infected animals survived. Although, this group of mice showed the highest parasitemia levels, and the San Antonio strain group showed the lowest ones.

A histopathological study in heart tissue was done with the infected mice. The results revealed that only Tulahuen strain infected animals showed correlation between parasitemia levels, tissue damage, cellular infection and death. San Antonio strain infection showed many intracellular parasites and great tissue damage, but with low and short term parasitemia levels. In the other hand, Munantá infected mice showed high parasitemia levels and lack of intracellular parasites. This suggests that the multiply site of this strain is not the heart tissue.

The results support the idea that parasitemia levels reached during *T. cruzi* infection, not always are correlated with susceptibility or resistance, at least in mice infection.

INDICE

- Introducción	1
- Revisión Bibliográfica	3
- Objetivos	11
- Materiales y Métodos	12
- Resultados	16
- Discusión	33
- Conclusiones	38
- Bibliografía	39

INTRODUCCION

La Enfermedad de Chagas es una zoonosis, causada por el protozoo hemoflagelado *Trypanosoma cruzi*, que afecta alrededor de 11 millones de personas, en un área comprendida desde el sur de Estados Unidos, hasta el paralelo 41 latitud sur en Chile y Argentina (Dias *et al.*, 2002). En 1990, la Organización Mundial de la Salud colocó a la Enfermedad de Chagas como el problema más grave dentro de las enfermedades parasitarias en América Latina, con un impacto socioeconómico más serio que los efectos combinados de todas las otras infecciones parasitarias y con un número de 100 millones de personas con riesgo de infección (WHO, 1991). En los últimos años estos valores han disminuido notoriamente, sobre todo por programas de control de vectores y revisión en los bancos de donantes de sangre. Pero es un error creer que el problema está solucionado, de hecho en zonas del Amazonas, que incluye a varios países, en regiones recientemente colonizadas la transmisión ha aumentado. Incluso en países como Chile y Uruguay, donde la transmisión ha sido declarada escasa o nula, se corre el riesgo de la reaparición del problema por la supresión prematura de los programas de control. A lo anterior se suma la escasa importancia dada en estos países a los vectores silvestres (Dias *et al.*, 2002).

En el ciclo biológico de *T. cruzi* intervienen hospederos vertebrados como el hombre, diversos animales domésticos y silvestres, además de hospederos invertebrados como los insectos hematófagos de la familia Reduviidae. Debido al amplio rango de hospederos mamíferos que *T. cruzi* puede infectar, se han utilizado diferentes modelos experimentales para estudiar esta parasitosis como perros, cobayos, cabras, primates no humanos, ratas, ratones y otros roedores. Probablemente, el más utilizado es el modelo murino, debido a su fácil manejo, mayor conocimiento de su estructura genética y porque las alteraciones que ocurren durante la etapa aguda de la infección son semejantes a las que ocurren en el humano.

En el presente trabajo, se pretende analizar el desarrollo de la infección con tres cepas de *Trypanosoma cruzi*, una aislada en Chile y dos aisladas en Colombia, en ratones ACA.

REVISION BIBLIOGRAFICA

La enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana es una infección causada por el protozoo hemoflagelado *Trypanosoma cruzi* y se encuentra distribuida por casi todo el Continente Americano, a partir del paralelo 42 N al sur de E.E.U.U. hasta el paralelo 46 S en la provincia de Chubut en Argentina. Los estudios seroepidemiológicos sugieren que en Latino América existen alrededor de 11 millones de individuos infectados (Dias *et al.*, 2002). La mayor parte de los casos se produce en zonas rurales y periurbanas donde las precarias condiciones socioeconómicas y la naturaleza doméstica del insecto vector, favorecen la mantención endémica de la infección.

En Chile el territorio afectado se extiende entre los paralelos 18 a 34,5 de latitud sur, desde la frontera con Perú por el norte, hasta la zona central del país (VI región), por el sur. Los estudios serológicos indican que el promedio general de infección en la población humana de las áreas endémicas es de 19%, con máximos de 24,3% y 41,2% en las III y IV regiones, respectivamente (Apt y Reyes, 1986; Atías y Apt, 1991).

Agente Etiológico

Trypanosoma cruzi pertenece al Phylum Protozoa, superclase Mastigophora de protozoarios flagelados que no poseen cromatóforos. El orden es kinetoplastida, cuyos miembros tienen un kinetoplasto, organelo autorregulable que contiene DNA y localizado en la base del flagelo. Su familia es Trypanosomatidae y se caracterizan por tener un solo flagelo y son parásitos de vertebrados, invertebrados, ciliados y plantas. Son flagelados digénicos (parásitos con alternancia de evolución en hospederos invertebrados y vertebrados) que presentan durante su ciclo evolutivo diferentes formas celulares. Pertenecen al Género *Trypanosoma* y la especie es *cruzi*.

Se describen dos subespecies, *T. cruzi cruzi* (sensu strictu) y *T. cruzi marinkellei* (presente en murciélagos sudamericanos). Dentro de *T. cruzi* s.s. se habla de cepas basadas en estudio de isoenzimas (zimodemas) y se ha observado una gran variedad clonal por estos estudios (Stevens *et al.*, 2001).

En su complejo ciclo biológico, *T. cruzi* presenta 3 estadios fisiológicos y morfológicamente distintos, caracterizados por la presencia y/o ubicación del kinetoplasto y la morfología adoptada en el vector o el hospedero vertebrado:

1.- Dentro del aparato digestivo del vector *T. cruzi* adquiere una forma conocida como **epimastigote**, especialmente adaptado para sobrevivir en el intestino del insecto. Esta forma posee un flagelo unido cerca del centro del cuerpo, además de un núcleo y un kinetoplasto. Se multiplican por fisión binaria y tienen un tamaño de 10 a 20 micrones antes de transformarse en la forma infectante, en la porción distal del intestino del insecto (Botero y Restrepo, 1992).

2.- La forma infectante generada en el intestino del vector se denomina **trypomastigote metacíclico**, la cual es la que ingresa al hospedero. La forma flagelada de *T. cruzi* que se encuentra posteriormente en la sangre circulante de personas o animales infectados, se conoce con el nombre de **trypomastigote sanguíneo**, ambas formas son alargadas, fusiformes y su tamaño es de alrededor de 20 micrones de longitud. Poseen un núcleo grande en la parte central y a lo largo de su cuerpo tiene una membrana ondulante bordeada por un flagelo, que se inicia en el kinetoplasto y sale del parásito por el extremo anterior. El kinetoplasto, que contiene el 20% del DNA total del parásito aproximadamente, presenta un tamaño notoriamente grande lo que constituye una de las principales características morfológicas, que lo diferencian de otras especies de tripanosomas. Los parásitos presentan marcado pleomorfismo y se conocen formas anchas, delgadas e intermedias.

El tripomastigote sanguíneo, en el huésped vertebrado, tiene predilección por los macrófagos, células del sistema retículo endotelial, tejido muscular cardíaco, muscular estriado, muscular liso y menos frecuente por tejido nervioso, dependiendo de la cepa de parásito.

3.- Dentro de las células, el tripomastigote sanguíneo se transforma en **amastigote**, el cual se caracteriza por ser redondeado u oval, multiplicarse por división binaria, medir aproximadamente de 1,5 a 4 micrones de diámetro y no presentar un flagelo evidente. Los amastigotes se multiplican dentro de las células formando nidos o pseudoquistes.

Vías de Transmisión

La principal vía de transmisión de la enfermedad son insectos hematófagos que pertenecen al orden Hemiptera y corresponden a tres géneros de la familia Reduviidae, subfamilia triatominae (Wisnivesky-Colli *et al*, 1985; Shikanai-Yasuda *et al*, 1989). Los géneros transmisores de la enfermedad son: *Rhodnius*, *Triatoma* y *Pastrongylus*. Las especies vectoras varían en los diferentes países en donde se encuentra la enfermedad. En Colombia y Venezuela predomina *Rhodnius prolixus*, pero se han encontrado además *Triatoma dimidiata capitata*, *Rhodnius pallescens*, *Pastrongylus geniculatus* y otros géneros y especies menos frecuentes. En Brasil, Argentina, Uruguay, Bolivia, Perú y Chile el principal vector es *Triatoma infestans*, por sus hábitos domésticos y una considerable proporción de insectos infectados (entre 25 y 33%) (Schenone *et al*, 1980; Reyes, 1991). En Chile, además se encuentran *Mepraia spinolai* y *Mepraia gajardoi*, especies autóctonas que poseen hábitos principalmente silvestres y sólo en raras ocasiones invaden la vivienda humana. Desde el punto de vista epidemiológico *M. spinolai*, actúa como vector del ciclo silvestre de la Enfermedad de Chagas en Chile, pero posee un porcentaje de infección inferior a *T. infestans* (entre 11,4 y 25,8%) (Canals y Cattán, 1992; Acuña, 2001).

Durante mucho tiempo, los vectores silvestres de *T. cruzi* han sido considerados de bajo interés epidemiológico, por no tener un contacto cercano con viviendas humanas, pero al ser erradicado el vector doméstico puede ser que los vectores silvestres pasen a ocupar esos nichos ecológicos (Ordeneš *et al*, 1996 ; Acuña, 2001).

Existen formas adicionales de infección con *T. cruzi*, las cuales son la transfusión sanguínea o el trasplante de órganos de donantes infectados (Ruiz *et. al*, 1984; Nickerson *et. al*, 1989) y la transmisión congénita (Aguilera *et al*, 1988; Muñoz *et al*, 1990).

Ciclo Biológico

El ciclo de vida de *T. cruzi* comienza con la infección del vector al ingerir sangre de un hospedero con tripomastigotes sanguíneos circulantes. En el tracto intestinal del insecto, los parásitos se multiplican por fisión binaria como epimastigotes; al cabo de 15 a 30 días se transforman en tripomastigotes metacíclicos, que se acumulan en la ampolla rectal y son eliminados con las heces (Botero y Restrepo, 1992). Los insectos infectados al picar al hombre o animales, ingieren sangre y, posteriormente, deyectan sobre la piel del hospedero, no todos los triatominos tienen esta característica, lo cual podría estar en relación con zonas donde existe el vector pero la enfermedad no tiene mayor incidencia (zonas de U.S.A y México). Los tripomastigotes que penetran por la piel o mucosas pueden infectar cualquier célula del organismo, ingresando mediante la formación de vacuolas, iniciando así el ciclo intracelular, que dura aproximadamente 5 días. Habitualmente, el parásito escapa de la vacuola endocítica (Andrews *et al*, 1990) y una vez en el citoplasma, se diferencia al estado replicativo intracelular denominado amastigote. Este período dura alrededor de 12 horas y de cada parásito ingresado se generan alrededor de 500 formas intracelulares. Posteriormente los amastigotes se diferencian en tripomastigotes, la célula se destruye y los parásitos son liberados a la circulación, desde donde pueden infectar nuevas

células o ser ingerido por vectores, completándose así el ciclo de la infección (Burleigh y Andrews, 1995).

Fases de la enfermedad

En la patología de la Enfermedad de Chagas se pueden distinguir tres fases o estadios:

a) Forma aguda, que se presenta en el 5% de los sujetos infectados, b) Fase latente o indeterminada, y c) Fase crónica que se presenta en el 30-40% de los pacientes (Apt y Reyes, 1986; Atías y Apt, 1991;).

a) **Fase aguda:** posee un período de incubación de 3-12 días y manifestaciones clínicas muy variables. En esta etapa los amastigotes de *T. cruzi* se reproducen dentro de las células y las destruyen. La lesión inflamatoria, localizada en la puerta de entrada, se conoce con el nombre de chagoma, más evidente en niños. La lesión inflamatoria se extiende a los ganglios regionales, se bloquean los canales linfáticos y se produce edema local. Cuando compromete el párpado constituye el signo de Romana, de gran valor diagnóstico en esta etapa. Posteriormente, se encuentran parásitos intracelulares en otros ganglios linfáticos y órganos, como bazo, médula ósea, corazón, tubo digestivo, suprarrenales, cerebro y, ocasionalmente, ovarios, testículos y tiroides.

La fase aguda va acompañada por un aumento progresivo de parásitos en circulación, generalmente detectables por métodos parasitológicos corrientes. Además, en esta fase se pueden originar lesiones o alteraciones graves, a pesar de esto, el índice de mortalidad en el humano es cercano al 10%. Las muertes ocurren, principalmente, por miocarditis, meningoencefalitis u otras complicaciones como bronconeumonía (Botero y Restrepo, 1992). En el ratón, la supervivencia o muerte de los animales en la fase aguda, parece depender de la cepa de ratón, de la cepa de parásito y de la dosis de inóculo inicial (Zúñiga, 1995; Zúñiga *et al*, 1998).

b) **Fase latente o indeterminada:** después de la fase aguda ocurre una respuesta inmune que provoca disminución de la parasitemia y mantiene la infección en algunos focos selectivos. Este período va desde el final de la fase aguda hasta la aparición de los primeros síntomas de la fase crónica y tiene una duración media de 10 años. Esta etapa se caracteriza por una lenta multiplicación intracelular de parásitos y oligoparasitemias sin signos clínicos de enfermedad.

c) **Fase crónica:** esta fase se caracteriza por una reducida parasitemia y lesiones típicas en el corazón o el tubo digestivo. Durante ella, la patología más importante es la cardiopatía chagásica. Inicialmente, existe dilatación por la previa e intensa multiplicación de los parásitos en las fibras musculares del corazón, lo cual originará una posterior miocarditis, con desintegración de la fibra miocárdica. Además, la inflamación alcanza el subendocardio, tejido adiposo del epicardio y los ganglios nerviosos. A nivel del tejido de conducción, se puede encontrar edema e infiltrado leucocitario. Otras formas de patología de la enfermedad crónica, se relaciona con las lesiones hipertróficas del tubo digestivo o megasíndromes, especialmente megacolon y megaesófago (Atías, 1991).

Diagnóstico

El diagnóstico de una infección chagásica se realiza, generalmente, mediante la detección de tripomastigotes circulantes al examen microscópico de sangre fresca o de la capa leucoplaquetaria o de hemogramas teñidos. Cuando no es posible realizar este diagnóstico directo, se puede inocular sangre o la capa leucoplaquetaria en ratones de laboratorio o en medios de cultivo, para la amplificación y posterior detección del parásito (Braun y De Titto, 1985; Atías y Apt, 1991).

Un método adicional para la detección del parásito en la fase aguda de la enfermedad, es el Xenodiagnóstico, que emplea la infección de formas ninfales del

vector mediante la picadura del individuo sospechoso de infección, para luego detectar la presencia del parásito en las heces del insecto (Schenone *et al*, 1974).

La ausencia de parásitos detectables en la fase crónica de la Enfermedad de Chagas, hace que la serología convencional basada en la detección de anticuerpos específicos contra el parásito se convierte en una herramienta fundamental para el diagnóstico de la infección (Braun y De Titto, 1985; Apt y Reyes, 1986; Sturn *et al*, 1989).

Los métodos serológicos de uso común utilizados en el diagnóstico de la Enfermedad de Chagas entre los que se encuentran el test de fijación del complemento, el método de inmunofluorescencia indirecta (RIFI) y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), emplean complejas y heterogéneas fracciones antigénicas del parásito, lo que explica las reacciones cruzadas con otros parásitos como *Leishmania*, obligando a la búsqueda de antígenos mejor caracterizados. Se han realizado numerosos intentos para caracterizar, identificar y obtener fracciones antigénicas purificadas (Guhl, 1990), sin embargo, estos intentos se han complicado por el gran y complejo repertorio genético del parásito, por el hecho de tener fases libres e intracelulares, invadir y adaptarse a distintos hospederos y haber desarrollado mecanismos de evasión de la respuesta inmune. La tecnología de DNA recombinante se ha constituido en una buena alternativa para resolver estas dificultades, ya que permite obtener y manejar gran cantidad de moléculas antigénicamente puras y eventualmente, contribuir a un mejor conocimiento de la biología de *Trypanosoma cruzi* (Vergara *et al*, 1991).

Modelos Biológicos

Bajo condiciones naturales en el continente americano, *T. cruzi*, es capaz de infectar a numerosas especies de mamíferos de diferentes órdenes, incluyendo

animales domésticos y silvestres (Texeira *et al.*, 2001). De acuerdo a lo anterior, el cuadro agudo de la infección con *T. cruzi* se ha podido reproducir, experimentalmente, en diversas especies, como conejos (Figueredo *et al.*, 1985), perros (De Lana *et al.*, 1992), hamster (Ramírez *et al.*, 1994), cobayos (Basombrío *et al.*, 1987), cabras (Fernandes *et al.*, 1994), primates (Bonecini-Almeida *et al.*, 1990) ratones (Scott y Goss-Sampson, 1984; Zúñiga, 1995), ratas (Revelli *et al.*, 1985) y otros roedores (Trischman y Bloom, 1982). De todos los modelos experimentales mencionados, el modelo murino constituye una muy buena herramienta, ya que se sabe que las distintas cepas de ratones difieren en la susceptibilidad o resistencia a la infección con *T. cruzi* existiendo, al parecer, un complejo control génico de los niveles de parasitemia y supervivencia de los animales infectados (Wrightsmann *et al.*, 1982; Zúñiga *et al.*, 2002). Esta claro que una variedad de factores, dependientes tanto del parásito como del hospedador, están involucrados en determinar finalmente la resistencia o susceptibilidad a la infección. Uno de estos factores, son los genes ligados en el Complejo Mayor de Histocompatibilidad (Wrightsmann *et al.*, 1982; Zúñiga, 1995), el cual es un sistema genético involucrado en la inducción y regulación de la respuesta inmune humoral y celular contra diversos organismos patógenos y cuyos productos están involucrados en varias etapas de la respuesta inmune, como el procesamiento y presentación antigénica e inflamación, frente a una variedad de antígenos (Vergara *et al.*, 2002).

En el presente trabajo, se pretende analizar el desarrollo de la infección con tres cepas de *Trypanosoma cruzi* en la cepa de ratones ACA. Las cepas de parásitos a utilizar han sido aisladas en Chile (cepa Tulahuén) y en Colombia (cepas Munantá y San Antonio).

Este trabajo es parte de un proyecto cooperativo entre el Laboratorio de Inmunología de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile y el Laboratorio de Parasitología del Instituto Nacional de Salud, Bogotá, Colombia.

OBJETIVO GENERAL

- Estudiar la evolución de la infección con tres cepas de *Trypanosoma cruzi* en un modelo murino.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Comparar prepatencia, niveles de parasitemia y mortalidad en ratones de la cepa ACA, infectados con tres cepas de *T. cruzi*.
- Comparar histopatológicamente las lesiones cardíacas de los ratones de la cepa ACA, infectados con tres cepas de *T. cruzi*.

MATERIALES Y METODOS

Parásitos

Las infecciones experimentales se llevaron a cabo utilizando tripomastigotes sanguíneos de las siguientes cepas de *Trypanosoma cruzi*: a) cepa Tulahuén, originalmente aislada de humano en la región de Coquimbo, Chile (Pizzi 1957); b) cepa Munantá, aislada del vector *Rhodnius prolixus* el año 1999, en la región de Bocayá, Colombia; c) cepa San Antonio, aislada del vector *Rhodnius pallescens* el año 2000, en la región de Magdalena, Colombia (Paláu *et al.* , 2000). Las cepas colombianas de *T.cruzi* fueron cedidas, originalmente, por la Dra. M.T. Paláu del laboratorio de Parasitología, Instituto Nacional de Salud, Bogotá, Colombia. Estas cepas de parásitos son mantenidas en el bioterio de la Unidad de Inmunología de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, por pasajes sucesivos en ratones Balb/c.

Ratones

Se utilizaron tres grupos de 15 hembras de la cepa ACA (H-2^f) (Klein *et al.*, 1983), de 10 semanas de edad. Esta cepa proviene, originalmente, del Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, U.S.A. y se mantiene por cruzamientos consanguíneos en el Bioterio de la unidad de Inmunología.

Modelos de infección

Cada grupo fue inoculado intraperitonealmente con 0.2 ml de sangre infectada que contiene aproximadamente 2×10^3 tripomastigotes sanguíneos de cada una de las cepas de parásitos. Como grupo control se inocularon 15 ratones con 0.2

ml de sangre de ratones Balb/ c sin infectar, de manera de descartar la existencia de fenómenos adversos inducidos por la sangre Balb/c, independiente de lo producido por el parásito.

Dosis de parásitos inoculados

Sangre de un ratón Balb/c infectado, se extrajo por punción cardíaca (aproximadamente 0.6 ml.) para colocarla en un frasco estéril, con 0,1 ml. de citrato de sodio como anticoagulante. Luego se hizo una dilución al 1 / 50 con 10 ul. de sangre infectada, en 490 ul de suero fisiológico y se realizó un recuento de parásitos en cámara de Neubauer. Se determinó la presencia de 10^6 de parásitos en los 0.6 ml de sangre. Al sacar 30 ul, esta muestra contiene teóricamente 5×10^4 parásitos. Posteriormente, se hizo la dilución requerida de esta muestra, en 5 ml. de suero fisiológico estéril para tener aproximadamente 2×10^3 parásitos en 0.2 ml. de inóculo para cada animal de experimentación.

Estudio de Parasitemia

Para determinar la prepatencia y niveles de parasitemia, los animales infectados se sangraron a partir del tercer día postinfección (p.i.) y luego día por medio hasta que la parasitemia fue negativa. La sangre de los ratones infectados se tomó de la vena caudal, por capilaridad, en tubos de microhematocrito heparinizados. Posteriormente, cada muestra se centrifugó a 800 g. por 5 min. y se dejó reposar por 30 min. Luego se calculó el volumen de sangre de cada tubo. Como la mayor concentración de parásitos se espera en la zona leucoplaquetaria, entre sangre y plasma, en este lugar se cortó con un lápiz diamante el capilar y el volumen contenido se colocó en un portaobjeto, el que se cubrió con un cubreobjeto de

20x20 mm. Este cubreobjeto abarca 1600 campos ópticos, por lo tanto se cuentan 50 campos al azar, con aumento 400x, y se deriva a 1600 y eso corresponde al número de parásitos en el tubo de hematocrito. Como esta cantidad de sangre fue medida previamente, se lleva finalmente a número de parásitos por ml. Todo lo anterior se realizó de acuerdo al método descrito por Arias y Ferro (1988). Los resultados, de cada día en estudio, se expresaron como el promedio de parasitemia del grupo, más la desviación estándar correspondiente.

Estudio Histopatológico

Dos ratones de cada grupo fueron sacrificados a los 7, 15, 19 y 23 días p.i. y de cada uno de ellos se extrajo el corazón para un análisis histopatológico. Los tejidos fueron incluidos en parafina según métodos convencionales, cortados en micrótomos de rotación (Leitz) de 5 μ m de espesor y teñidos con Hematoxilina-Eosina (HE) y Van Giesson (VG) (López *et al.*, 1982).

La intensidad de las lesiones fue evaluada con aumento de 100x de acuerdo al siguiente criterio: (-) Tejido preservado y sin signos aparentes de inflamación; (+) lesiones inflamatorias mínimas o discretas; (++) lesiones moderadas; y (+++) lesiones severas y con infiltrado mononuclear. El análisis anterior fue separado por capas de tejido cardíaco (pericardio y miocardio).

El tropismo tisular de los parásitos fue evaluado en 10 campos microscópicos de cada corte de tejido, examinando con aumento de 600x en un microscopio Nikon modelo Eclipse 600, de la siguiente manera: (-) Negativo, ausencia de células parasitadas; (+) Leve, presencia de 1 a 5 células infectadas; (++) Moderado, presencia de 6 a 10 células infectadas; y (+++) Severo, presencia de más de 10 células con formas intracelulares.

Este análisis se llevó a cabo en el laboratorio de Histología de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile.

Análisis Estadístico

Las medias obtenidas en los días de pico de parasitemia, en los ratones infectados con las tres cepas del parásito, fueron comparadas mediante un análisis de varianza del siguiente modelo:

$$X_{ij} = \mu + N_i + \varepsilon_{ij}.$$

X_{ij} = valor de la variable.

μ = media poblacional.

N_i = cepa de parásito ($i = 1, 2$ y 3).

ε_{ij} = error aleatorio.

Como prueba de comparaciones múltiples, se usó el método de Tukey, previa transformación de los datos a logaritmo, base diez.

RESULTADOS

En el Gráfico 1 se muestra la evolución de la parasitemia en ratones de la cepa ACA infectados con 2000 trypomastigotes sanguíneos de las cepas Munantá, San Antonio y Tuluahuén de *Trypanosoma cruzi*. El período de prepatencia, evidenciada en sangre, varió de 5 días para la infección con la cepa Tuluahuén a 7 días en los ratones infectados con las cepas Munantá y San Antonio. Los niveles máximos de parasitemia fueron obtenidos al día 12 postinfección (p.i.) para las cepas Tuluahuén ($1,5 \times 10^6$ parásitos/ ml.) y San Antonio ($1,7 \times 10^5$ parásitos/ ml.) y en el día 16 para la cepa Munantá ($4,1 \times 10^6$ parásitos/ ml.).

El análisis estadístico de acuerdo al método de Tukey, mostró diferencias significativas entre estos tres valores de parasitemia máxima al comparar, Tuluahuén con San Antonio ($p < 0.01$), Tuluahuén con Munantá ($p < 0.01$) y Munantá con San Antonio ($p < 0.01$). Los ratones infectados con San Antonio presentaron los niveles más bajos y los animales infectados con Munantá los niveles más altos de parasitemia. En el gráfico 1 se puede ver ,además, que los niveles de parasitemia de la cepa Munantá se mantuvieron elevados por un tiempo más prolongado, para decaer hacia el día 25, pero manteniéndose hasta el día 42 p.i. En los ratones infectados con las otras cepas de parásitos, Tuluahuén y San Antonio los niveles de parasitemia comenzaron a decaer a partir del día 19, días previos a que ocurriera la muerte de los animales, lo que asegura que los mayores valores alcanzados anteriormente corresponden a los valores máximos de parasitemia.

Todos los animales se infectaron, por lo que se utilizó la muerte o supervivencia como criterio de susceptibilidad o resistencia a la infección, respectivamente. El gráfico 2 muestra que los ratones ACA se comportaron como altamente susceptibles a la infección con las cepas Tuluahuén y San Antonio El 50 % de

mortalidad de los ratones infectados de ambas cepas ocurrió al día 15 p.i. y 100 % de mortalidad a los 21 y 25 días p.i., respectivamente. Por otro lado los animales fueron resistentes a la infección con la cepa Munantá (90 % de supervivencia pasados los 6 meses p.i.).

GRAFICO N° 1

Niveles de parasitemia de ratones ACA infectados con 2000 trypomastigotes de tres cepas de *T. cruzi*.

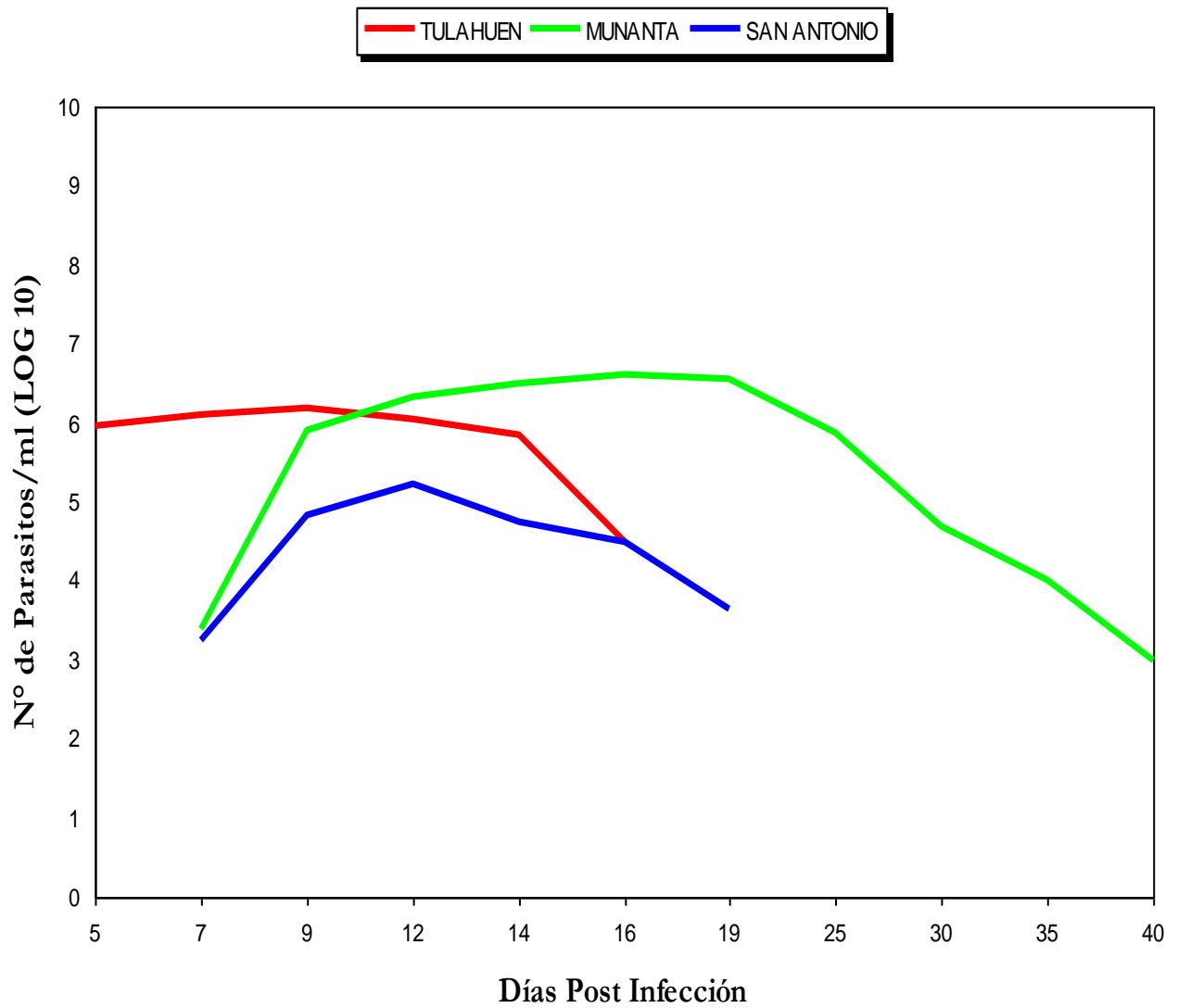
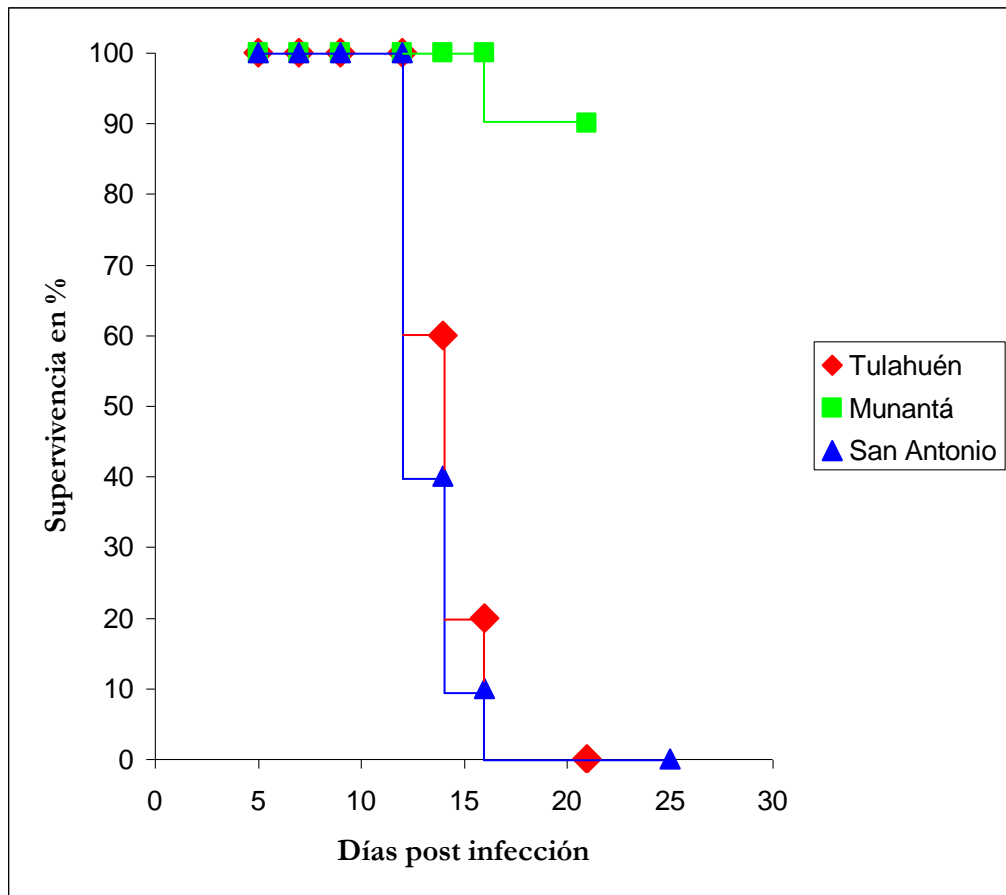


GRAFICO N°2

Porcentaje de supervivencia de ratones ACA infectados con tres cepas de *T. cruzi*.



El efecto de la infección con *T. cruzi* en tejidos fue evaluado comparando el análisis histopatológico de tejido cardíaco obtenido en los diferentes grupos de ratones infectados, analizando pericardio y miocardio, por separado (Tabla 1). En los primeros 7 días de infección, no se observaron grandes diferencias en la magnitud del daño provocado en los tejidos de los ratones infectados con las tres cepas de parásitos (Figuras 1 – 6). Todos los ratones mostraron lesiones inflamatorias de mínimas a moderadas, exceptuando hiperemia y edema, con la cepa Tulahuén (Figuras 1 y 2) y con la cepa SanAntonio que mostró un mayor grado de severidad en cuanto a edema e infiltración y presencia de numerosos pseudoquistes (Figuras 5 y 6). Además, se pudo observar que, en términos generales los tejidos con menores signos de alteración correspondió a los de los animales infectados con la cepa Munantá (Figuras 3 y 4).

En la segunda semana p.i. (15 días p.i.) se observaron lesiones inflamatorias más severas en todos los ratones infectados (Figuras 7 – 12), con la aparición de focos hemorrágicos , principalmente en el tejido de los animales infectados con Tulahuén (Figuras 7 y 8) y San Antonio (Figuras 11 y 12). Además, en los ratones infectados con la cepa San Antonio se observaron también, algunos focos necróticos.

En la tercera semana post infección (19 días p.i.) los ratones infectados con la cepa Munantá mostraron procesos inflamatorios menos intensos y recuperación del daño tisular (Figuras 15 y 16), diferenciándose de los ratones infectados con la cepa Tulahuén (Figuras 13 y 14) y la cepa San Antonio (Figuras 17 y 18), que mostraron procesos inflamatorios más severos en la pared pericárdica ventricular, con vacuolización, reducción en la cantidad de miofibrillas, focos necróticos y alteración en los patrones de estriación en los cardiomiocitos. Al día 23 p.i., momentos previos a la muerte, las lesiones inflamatorias se mantuvieron en los tejidos de los ratones sobrevivientes en la infección con San Antonio (Figuras 21 y

22), con aumento de focos necróticos. Por el contrario, en los tejidos de animales infectados con la cepa Munantá (Figuras 19 y 20) se observaron evidentes signos de atenuación de la inflamación y algunos signos de infiltración leucocitaria. No se observaron diferencias evidentes en la inflamación de pericardio y miocardio pero sí en cuanto a la presencia y cantidad de parásitos intracelulares en estas dos estructuras. En pericardio sólo se detectó un nido de parásitos en los ratones infectados con la cepa San Antonio, al día 7 p.i. (Tabla 2). En el miocardio de los ratones infectados con la cepa Tulahuén, los parásitos se detectaron en gran número sólo al día 19 p.i. En los ratones infectados con Munantá sólo se evidenciaron formas intracelulares al día 19 p.i. Sin embargo, mientras en los ratones infectados con la cepa Tulahuén se encontraron 58 pseudoquistes junto con una infiltración linfocitaria intensa, en los ratones infectados con la cepa Munantá se encontró sólo un nido parasitario sin una reacción inflamatoria intensa. Para la cepa San Antonio en cambio, se encontraron pseudoquistes desde el día 7 p.i. y fueron aumentando en número, hasta llegar a un máximo de 68 pseudoquistes el día 23 p.i. (Tabla 2).

En cuanto a la infiltración leucocitaria del tejido cardíaco, se pudo observar que la cepa Munantá se caracterizó por inducir lesiones granulomatosas con células epiteloides sin la presencia de parásitos en la fase más avanzada de la infección de los ratones.

Los componentes celulares del infiltrado inflamatorio en ratones infectados con la cepa Tulahuén fueron predominantemente macrófagos y linfocitos, con infiltración local de polimorfos nucleares neutrófilos. Los tejidos de los animales infectados con la cepa San Antonio presentaron un proceso infiltrativo avanzando desde la zona auricular hacia la zona ventricular, y desde el pericardio hacia el miocardio, con infiltración linfoplasmocitaria y predominio de mononucleares en la fase más avanzada de la infección.

En la Tabla 2 se puede observar la relación entre los niveles de parasitemia y el número de parásitos intracelulares en tejido cardíaco. Resulta evidente que no existe una relación directa entre número de parásitos circulantes en sangre y el número de parásitos en células del tejido cardíaco. Al día 7 y 15 p.i. sólo se observaron parásitos en los tejidos de los animales infectados con San Antonio. Las muestras de ratones infectados con Munantá y Tuluahuén fueron negativas, a pesar de mostrar, en ese momento, altos niveles de parasitemia. Al día 19 p.i. los tejidos infectados con Tuluahuén y San Antonio, con bajos niveles de parasitemia, muestran altos niveles de parasitismo intracelular. La infección con la cepa Munantá, muestra que al día 19 p.i., a pesar del elevado nivel de parasitemia, sólo se pudo evidenciar un pseudoquiste en el tejido cardíaco.

Al día 23 p.i. los ratones infectados con San Antonio muestran, a pesar de la parasitemia negativa, los máximos niveles en cuanto a presencia de parásitos intracelulares en tejido cardíaco. Por el contrario los ratones infectados con la cepa Munantá, a pesar de tener un nivel de parasitemia relativamente alto, sus tejidos fueron negativos en cuanto a presencia de pseudoquistes.

Tabla 1

Estudio histopatológico de corazón de ratones ACA infectados con 2000 trypomastigotes de las cepas Munantá (M), Tulahuén (T) y San Antonio (S) de *Trypanosoma cruzi*.

	Días Post Infección											
	7			15			19			23		
	Infectados con											
	T	M	S	T	M	S	T	M	S	M	S	
Pericardio												
Infiltración	+	+	++	+++	+	+++	+	+	++	-	+++	
Hiperemia	+	++	+	+++	++	+	+++	++	+	+	++	
Edema	+	+	-	++	++	+	+	+	+	-	++	
Hemorragia	-	-	-	+++	+	++	+++	-	+	-	++	
Fibrosis	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	
Necrosis	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	++	
Pseudoquistes	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	
Miocardio												
Infiltración	+	-	+++	++	-	++	+++	-	+++	-	+++	
Hiperemia	+	+	+	++	+	+	++	+	+	+	++	
Edema	+	++	+	++	+	+	+	+	+++	-	+++	
Hemorragia	-	-	-	+++	-	++	+	-	-	-	-	
Fibrosis	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	
Lisis	++	-	++	+++	+	++	+	-	++	-	+++	
Necrosis	-	-	+	-	-	+	+	-	++	-	++	
Pseudoquistes	-	-	+++	-	-	+++	+++	+	+++	-	+++	

Tabla N° 2					
Relación entre los niveles de parasitemia y el número de parásitos intracelulares en tejido cardíaco de ratones ACA infectados con las cepas Munantá, Tulahuén y San Antonio de <i>Trypanosoma cruzi</i>.					
Días post infección					
	7	15	19	23	
Munantá					
Parasitemia (*)	2,5	3200	3600	750	
Pseudoquistes			1		
Tulahuén					
Parasitemia (*)	890	1100	32		
Pseudoquistes			58		
San Antonio					
Parasitemia (*)	1,8	54	4,3		
Pseudoquistes	35	25	61	68	
(*) Número de parásitos/ ml (x 1000)					

Figura 1

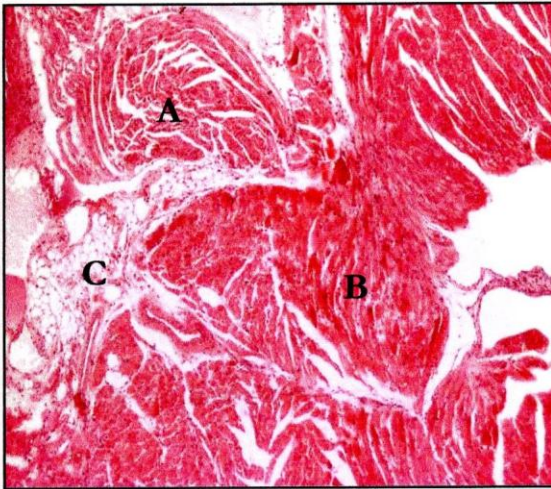


Figura 2

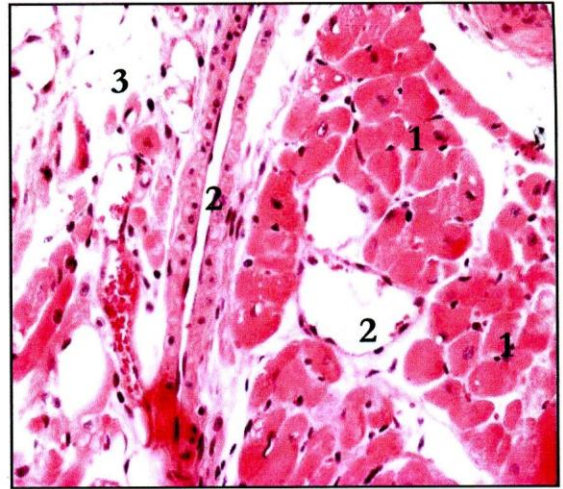


Figura 3

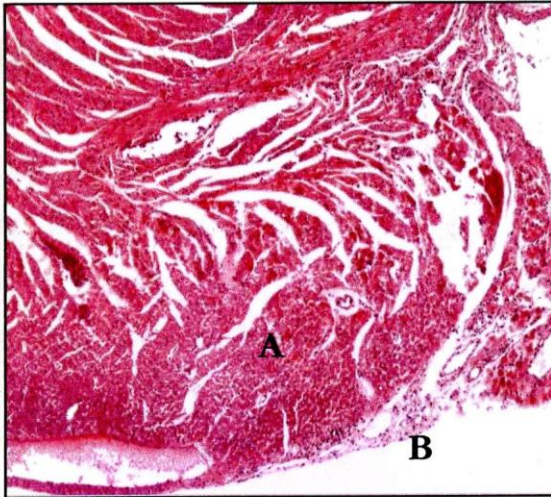


Figura 4

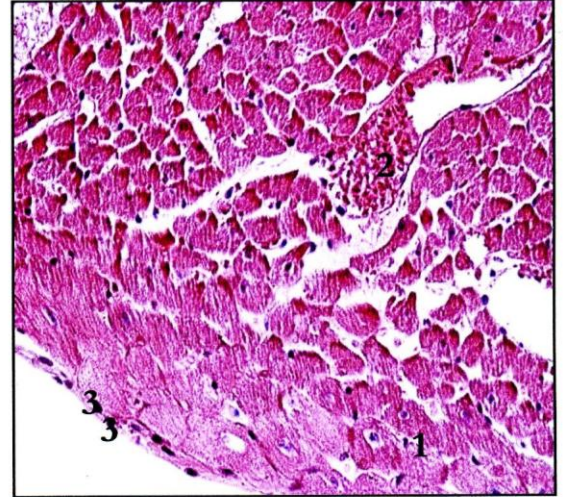


Figura 5

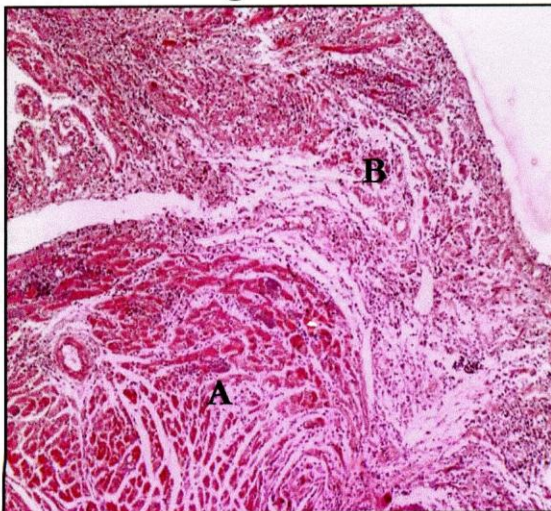


Figura 6

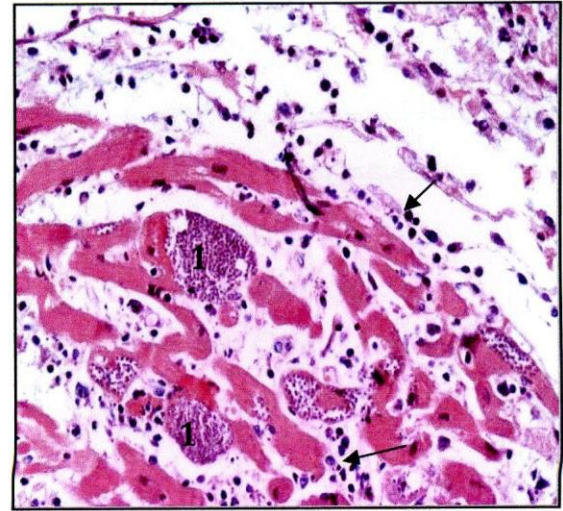


FIGURA 1

Cepa Tulahuén: Día 7 (4x)
A : Aurícula **B** : Ventrículo
C : Pericardio
Hiperemia y edema (+)

FIGURA 3

Cepa Munantá: Día 7 (4x)
A : Miocardio ventricular.
B : Pericardio.
Edema (++) Infiltración (+).

FIGURA 5

Cepa San Antonio: Día 7 (4x)
A : Miocardio ventricular.
B : Pericardio.
Infiltración (+++) Edema (++)

FIGURA 2

Cepa Tulahuén: Día 7 (20x)
Ventrículo
1: Células Miocárdicas
2: Vaso Sanguíneo
3: Tejido adiposo

FIGURA 4

Cepa Munantá: Día 7 (20x)
Ventrículo.
1: Células Miocárdicas.
2: Vaso Sanguíneo.
3: Pericardio.

FIGURA 6

Cepa San Antonio: Día 7 (20x)
Miocardio Ventricular y
Pericardio
1: Pseudoquistes.
Flechas: Células infiltrativas.

Figura 7

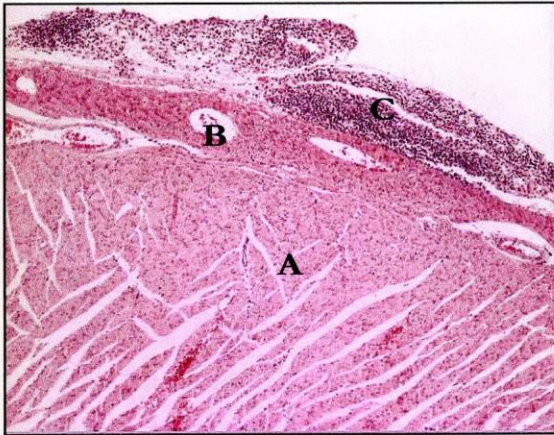


Figura 8

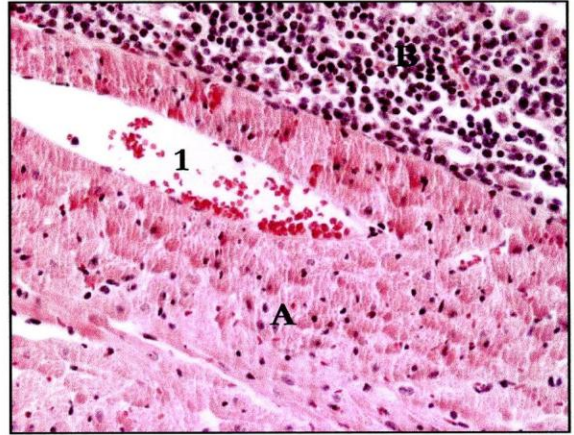


Figura 9

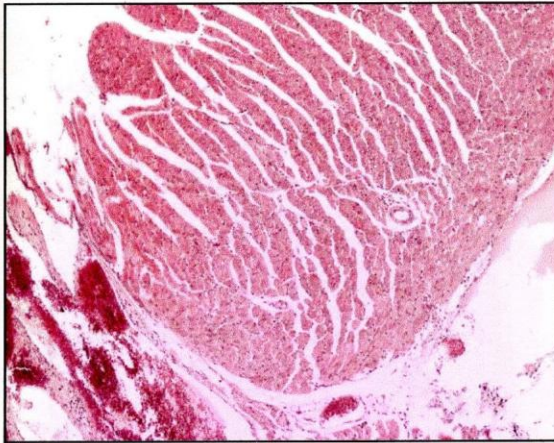


Figura 10

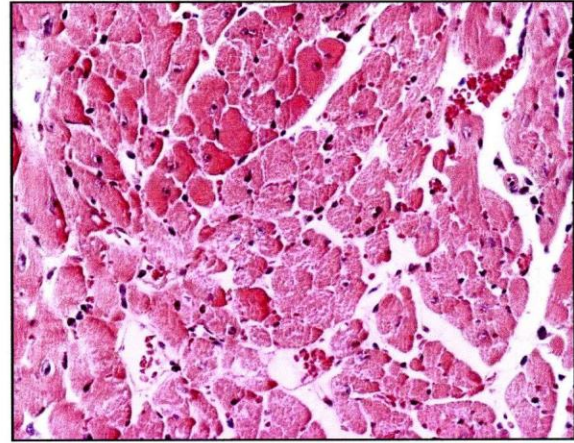


Figura 11

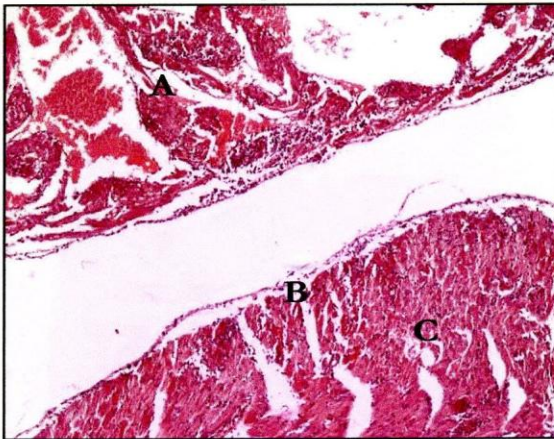


Figura 12

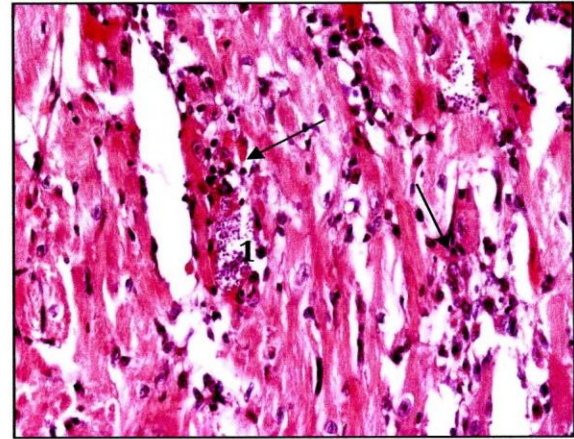


FIGURA 7

Cepa Tulahuén: Día 15 (4x)

A : Miocardio ventricular.

B : Vaso sanguíneo. **C**: Pericardio.

Infiltración (++)

FIGURA 9

Cepa Munantá: Día 15 (4x)

Miocardio Ventricular.

FIGURA 11

Cepa San Antonio: Día 15 (4x)

A : Aurícula. **B** : Pericardio.

C : Miocardio Ventricular.

Infiltración (+++) Edema (++)

FIGURA 8

Cepa Tulahuén: Día 15 (20x)

Ventrículo.

A: Miocardio **1**: Vaso sanguíneo.

B: Pericardio.

FIGURA 10

Cepa Munantá: Día 15 (20x)

Miocardio ventricular.

FIGURA 12

Cepa San Antonio: Día 15 (20x)

Miocardio ventricular

1: Pseudoquiste.

Flechas: Infiltrado mononuclear

Figura 13

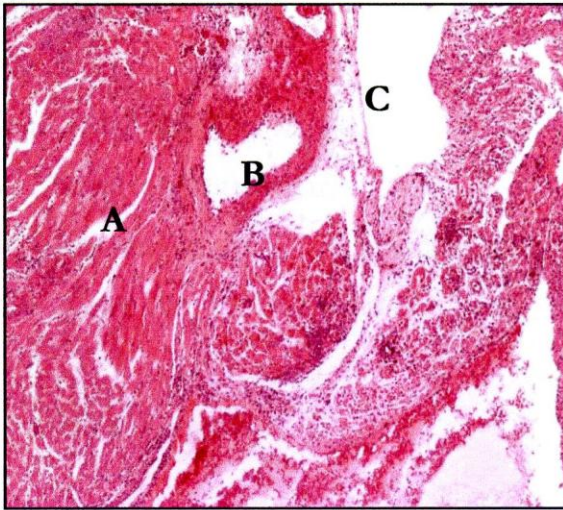


Figura 14

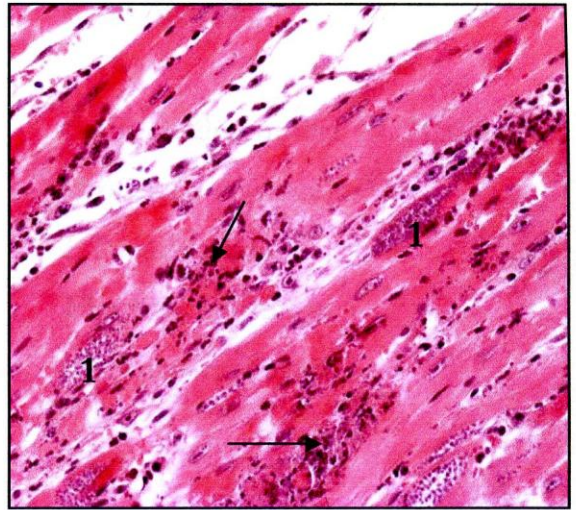


Figura 15

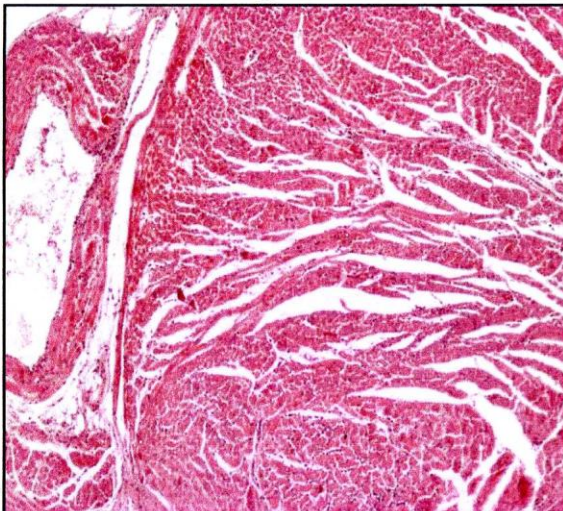


Figura 16

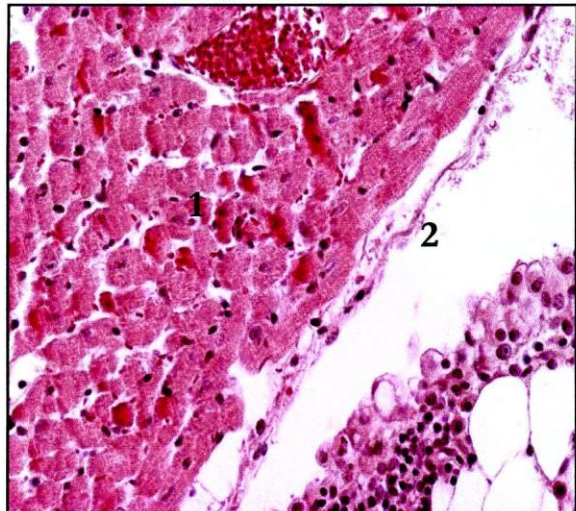


Figura 17

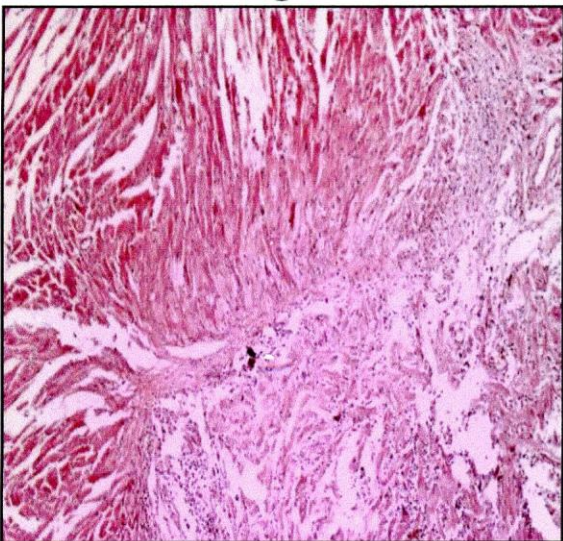


Figura 18

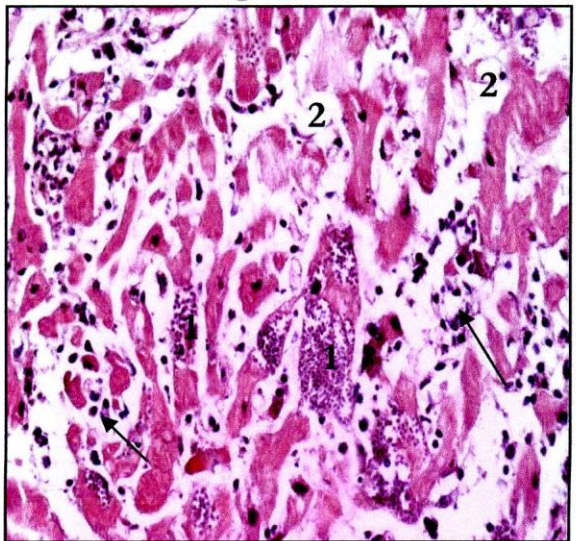


FIGURA 13

Cepa Tulahuén: Día 19 (4x)

A : Miocardio ventricular.

B : Vaso sanguíneo. **C** : Pericardio.

Infiltración (+++); Hiperemia (++)

FIGURA 14

Cepa Tulahuén: Día 19 (20x)

Miocardio ventricular.

1: Pseudoquistes.

Flechas: Infiltrado

Linfoplasmocitario.

FIGURA 15

Cepa Munantá: Día 19 (4x)

Miocardio ventricular.

FIGURA 16

Cepa Munantá: Día 19 (20x)

Miocardio ventricular.

1: Miocardio. **2**: Pericardio

FIGURA 17

Cepa San Antonio: Día 19 (4x)

Miocardio ventricular.

Infiltración (++) ; Edema (++)

FIGURA 18

Cepa San Antonio: Día 19 (20x)

Miocardio ventricular

1: Pseudoquistes

2: Zonas edematosas

Flechas: Infiltrado mononuclear

Figura 19

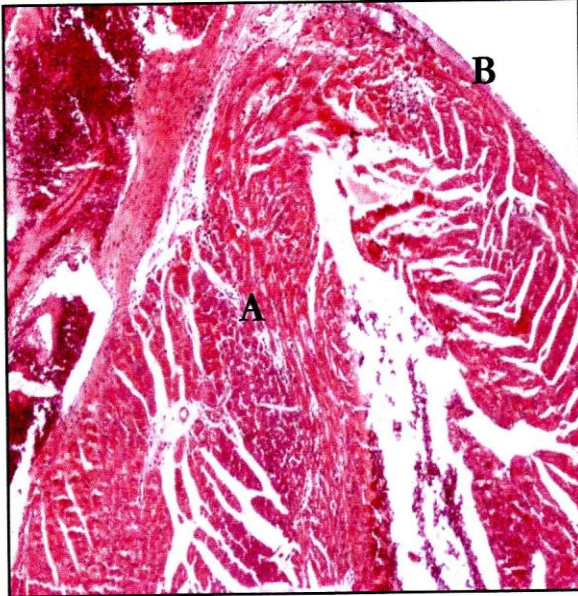


Figura 20

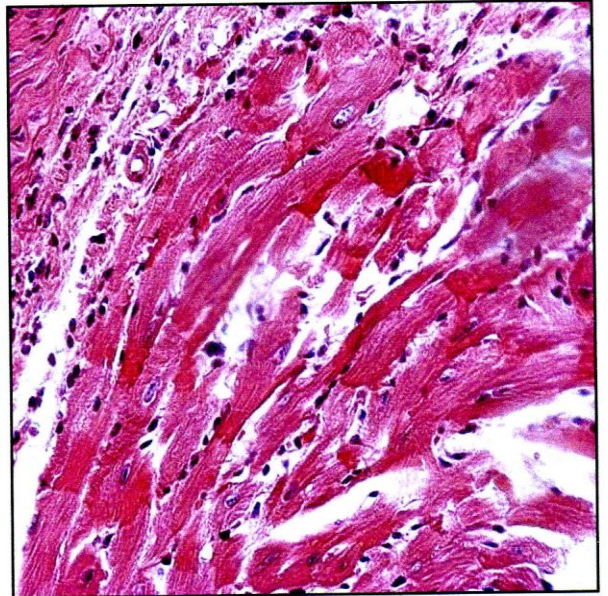


Figura 21



Figura 22

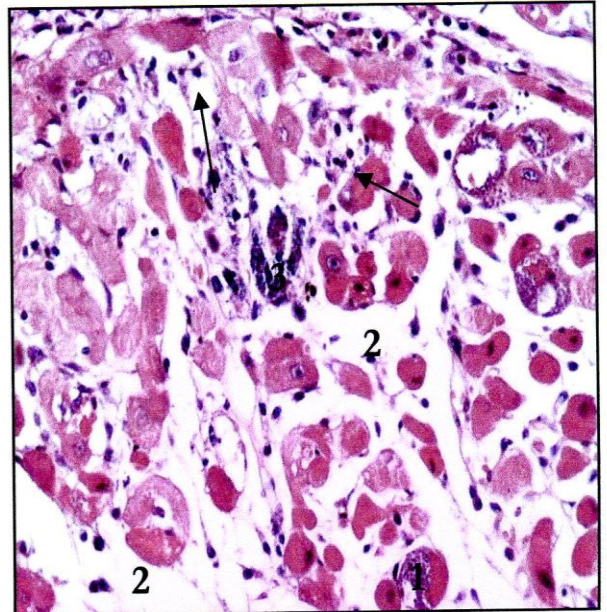


FIGURA 19

Cepa Munantá: Día 23 (4x)

Ventrículo

A : Miocardio **B** : Pericardio

FIGURA 21

Cepa San Antonio: Día 23 (4x)

Miocardio Ventricular

A : Miocardio **B** : Vaso sanguíneo

Infiltración (+++); Edema (+++);

Lisis (+++).

FIGURA 20

Cepa Munantá: Día 23 (20x)

Miocardio ventricular

FIGURA 22

Cepa San Antonio: Día 23 (20x)

Miocardio ventricular

1: Pseudoquistes

2: Zonas edematosas

3: Foco necrótico.

Flechas: infiltrado mononuclear

DISCUSION

El conocimiento sobre la fisiopatología de la infección con *T.cruzi* en animales de experimentación ha aportado avances importantes en el estudio de la Enfermedad de Chagas en el humano. Los modelos experimentales controlados permiten analizar diversos parámetros, dependientes, tanto del hospedador, como del parásito, lo que por razones éticas y prácticas no pueden realizarse en humanos. En este trabajo de memoria de título, la investigación se centró en el estudio del desarrollo de la infección de ratones de la cepa ACA con tres cepas de *T.cruzi*.

La susceptibilidad o resistencia a la infección, de cepas puras de ratones de laboratorio, puede variar desde cepas altamente resistentes a cepas altamente susceptibles, sugiriendo una base genética, en este fenómeno de susceptibilidad o resistencia (Trischmann y Bloom, 1982 ; Hoft *et al.*, 1993 ; Zúñiga, 1995). A pesar de lo anterior, está claro también que múltiples factores pueden influir en la supervivencia a la infección: la cepa de ratón y de parásito utilizadas, la dosis de inoculación, la edad y el sexo del hospedero, etc. (Wrightsman *et al.*, 1982 ; Zúñiga *et al.*, 1997).

Diversos trabajos previos han mostrado la relación cepa de *T.cruzi* – cepa de ratón. Así, la cepa de ratones C3H es susceptible a la cepa Tulahuén de *T. cruzi* pero es resistente a la infección con la cepa Sylvio y la cepa Balb/c es susceptible a la infección con la cepa Tulahuén, pero resistente a la infección con la cepa Brazil (Trischmann y Bloom, 1982). Lo anterior indica que la susceptibilidad o resistencia no es un fenómeno general sino, que está relacionado, habitualmente, a una cepa de parásito y a una cepa de ratón en particular.

La cepa ACA (H2^f) de ratones ha demostrado ser altamente susceptible a la infección con diferentes dosis de inóculo con la cepa Tulahuén de *T.cruzi* (Juri *et al.*, 1990 ; Vargas, 1998). En el presente trabajo y de acuerdo a lo anterior, la infección de ratones ACA con 2000 trypomastigotes sanguíneos de la cepa Tulahuén, produce 100% de mortalidad a los 21 días postinfección, observándose una cierta correlación entre aumento de la parasitemia, parasitismo intracelular y daño tisular.

La cepa de *T.cruzi*, San Antonio fue aislada de un insecto, en la región de Magdalena, Colombia donde ocurrió un brote de la Enfermedad de Chagas en 1999, (Paláu *et al.*, 2003). Lo anterior es importante porque ocurrieron varios casos fatales de personas supuestamente infectadas con el parásito. Todo esto hace relevante cualquier información obtenida sobre esta cepa de *T.cruzi*, al parecer muy virulenta y particularmente dado que las cepas colombianas de *T.cruzi* son, habitualmente, clasificadas como de baja virulencia.

El único antecedente que existe sobre la evolución con la infección con la cepa San Antonio en un modelo murino, demuestra que ratones Balb /c se comportan como altamente susceptibles a la infección con 10⁴ trypomastigotes metacíclicos obtenidos de infección celular *in vitro* (Paláu *et al.*, 2003). En el presente trabajo, la infección de ratones ACA muestra un comportamiento similar, aun cuando se utilizó un inóculo menor y una forma distinta del parásito (trypomastigotes sanguíneos). Los animales infectados mueren todos a los 25 p.i. pero no se observa una correlación entre parasitemia, número de parásitos intracelulares y daño tisular. A pesar que los niveles de parasitemia no fueron muy altos, a medida que pasaba el tiempo, se pudo observar un paulatino aumento en el número de células infectadas y del daño en el tejido cardíaco. Los resultados de infecciones celulares *in vitro* parecen sugerir que la cepa San Antonio del

parásito se replica activamente en el interior de las células en la forma de amastigote, pero su diferenciación a trypomastigote y posterior salida por destrucción de la célula infectada, es más prolongada en el tiempo en comparación a lo que se describe habitualmente para otras cepas de *T. cruzi* (Paláu *et al.*, 2000). Lo anterior podría explicar la falta de correlación, positiva, entre los bajos niveles de parasitemia y la alta cantidad de parásitos intracelulares en los tejidos de los ratones infectados.

Sobre la cepa Munantá de *T. cruzi* no existen antecedentes de infecciones en cepas puras de ratones, puesto que luego de ser aislada de un insecto, el parásito se ha mantenido sólo en cultivo axénico. Por lo tanto, los resultados mostrados en el presente trabajo, constituyen la primera descripción del comportamiento de esta cepa en un modelo de infección animal. La cepa Munantá demostró, a pesar de su patogenicidad, el parásito no es virulento, al menos en ratones ACA, que son habitualmente susceptibles a la mayoría de las cepas de *T. cruzi* (Juri *et al.*, 1990; Vargas, 1998).

A pesar de la baja virulencia, los ratones infectados con la cepa Munantá mostraron los más altos niveles de parasitemia. Estos resultados, sumados a los mostrados con la cepa San Antonio, parecen apoyar la idea que no existe una relación directa entre los niveles de parasitemia y la susceptibilidad o resistencia a la infección con *T. cruzi* (Minoprio *et al.*, 1989 ; Russo *et al.*, 1989 ; Zúñiga *et al.*, 2002). Todo lo anterior parece indicar que los niveles de parásitos sanguíneos circulantes constituye sólo un parámetro en la evolución de la infección y que no siempre se correlaciona con el tiempo de supervivencia de los animales infectados.

La utilización de la cepa Munantá puede constituir una excelente herramienta de estudio en el desarrollo de la infección con *T. cruzi*. Una de las ventajas de esta cepa no virulenta del parásito, es que ella induce altas parasitemias y esta condición puede ser transferida a animales sanos inoculando un bajo

número de parásitos. La dificultad habitual en los estudios con cepas no virulentas de *T. cruzi* o con cepas de *Trypanosoma rangeli* (trypanosoma no virulento para mamíferos) es que ellas inducen bajos niveles de parasitemia y habitualmente de corta duración (Urdaneta-Morales y Tejero, 1992 ; Zúñiga *et al.* , 1997 ; Paláu *et al.* , 2003). Por lo tanto, la cepa Munantá puede representar un buen modelo para lograr esclarecer la causa de la muerte de los animales infectados, producida por cepas virulentas, situación que hasta el momento no ha sido aclarada. En el presente modelo, la cepa Munantá infecta células, presenta altos niveles de parasitemia pero no produce la muerte de los animales infectados.

En la infección con la cepa Munantá no se observó correlación entre el bajo parasitismo cardíaco intracelular, con los niveles altos y prolongados de parasitemia en el tiempo, mientras una situación inversa ocurre en la infección con la cepa San Antonio. No se ha descrito hasta ahora la existencia de multiplicación extracelular de *T. cruzi*, como ocurre en los trypanosomas africanos, como *T. brucei*, que se multiplican libres en circulación (Stevens *et al.*, 2001). Por lo tanto una explicación para la falta de correlación entre el nivel de parasitismo intracelular y niveles de parasitemia, en la infección con la cepa Munantá, sería que este parásito no tendría un tropismo cardíaco, por lo tanto, su principal lugar de multiplicación sería un tejido diferente, no analizado en este estudio.

Se ha postulado que durante la fase aguda de la infección, la respuesta inmune humoral desempeñaría un rol importante en el control del número de parásitos circulantes (Alves *et al.*, 1986; Araujo, 1986) aunque esta respuesta tendría diferencias cualitativas en cepas de ratones resistentes y susceptibles a la infección (De Gaspari *et al.*, 1990). En el caso de nuestros ratones ACA, los parásitos sanguíneos fueron detectados durante 42 días p.i., lo que no es habitual, incluso en cepas resistentes, indicando una posible falla o lentitud en la respuesta humoral, para controlar la parasitemia. Sin embargo, esto parece irrelevante en la

supervivencia de los animales, que durante las primeras semanas se mostraron decaídos y con el pelaje erizado, pero que finalmente y con la sola excepción de un único animal, se recuperaron, sobreviviendo hasta su sacrificio a los 8 meses p.i.

A diferencia de lo que ocurre en humanos, donde muy pocos individuos mueren durante la fase aguda de la infección y habitualmente pasan a la fase asintomática y luego a la fase crónica (Atías y Apt, 1990 ; Botero y Restrepo, 1992), los ratones susceptibles mueren durante la fase aguda en un período cercano al nivel máximo de parasitemia. La infección con *T.cruzi* es caracterizada por producir lesiones principalmente a nivel de tejido cardíaco y digestivo. La sugerencia más aceptada es que tales lesiones son resultado de una agresión autoinmune más que causadas directamente por el parásito. Mas aún existen estudios en los que ha sido posible transferir las lesiones características de la enfermedad con células inmunocompetentes de animales infectados, en ausencia de parásitos (Laguens *et al.*, 1981; Hontebeyrie-Joskowicz *et al.*, 1987; Villela-Ribeiro *et al.*, 2002). Las sugerencias mas importantes en relación al daño tisular asociado a la infección con *T. cruzi* indica que esta obedece a: a) reacción cruzada entre epitopos del parásito y determinantes propios del hospedero (mimetismo molecular); b) exposición de determinantes secuestrados debido al daño tisular; c) exacerbación en la activación y cooperación linfocitaria, llevando a la estimulación de células autoreactivas que han escapado a la delección clonal central (Minoprio *et al.* , 1989; Brener y Gazzinelli, 1997).

CONCLUSIONES

- 1.- Las cepas de *T. cruzi* Tuluahuén y San Antonio se comportaron como virulentas y la cepa Munantá como no virulenta, al infectar ratones ACA.
- 2.- La cepa Munantá indujo los más altos niveles de parasitemia.
- 3.- Los tejidos de animales infectados con la cepa San Antonio presentaron los más altos niveles de infección intracelular, a pesar que esta cepa induce los niveles más bajos de parasitemia.
- 4.- Se observó correlación entre el daño tisular y el número de pseudoquistes en relación a la virulencia de cada cepa de parásito.
- 5.- No se observó correlación entre los niveles de parasitemia y la muerte de los animales infectados con las cepas Munantá y San Antonio.

BIBLIOGRAFIA

- **Acuña, M.** 2002. La vinchuca silvestre: ¿ Una amenaza latente ? Tecnovet 2: 14 – 18.
- **Andrews, N.; Abrams, C.; Slatin, S; Griffiths, G.** 1990. A *T. cruzi*-secreted protein Immunologically related to the complement component C9: Evidence for membrane pore-forming activity at low pH. Cell. 61: 1277-1287.
- **Aguilera, X.; Apt, W.; Reyes, H.; Sandoval, J.; Salgado,R.; Carranza, G.; Figueras, E.; Reyes, J.; Corral, E.** 1988. Enfermedad de Chagas Congénita: Estudio Prospectivo en dos Localidades Hiperendémicas de la IV Región de Chile. Parasitol. al día. 12: 19-25.
- **Alves, M.J. ; Abuin, G. ; Kuwajima, V. ; Colli, W.** 1986. Partial inhibition of trypomastigote entry into cultured mammalian cells by monoclonal antibodies against surface glycoprotein of *Trypanosoma cruzi*. Mol. Biochem. Parasitol. 21: 75 – 82.
- **Apt, W.; Reyes, H.** 1986. Aspectos Epidemiológicos de la Enfermedad de Chagas en Chile. I: Distribución Geográfica, Índice de Infección en Vectores y en Humanos. Parasitol. al día. 10: 94-101.
- **Araujo, F.G.** 1986. Analysis of *Trypanosoma cruzi* antigens bound by specific antibodies and by antibodies to related trypanosomatids. Infect. Immun. 53 : 179 – 183.
- **Arias, A.; Ferro, E.** 1988. Quantification of *Trypanosoma cruzi* parasitemia by Direct Micromethod. Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg. 82: 248.

- **Atías, A.; Apt, W.** 1991. Enfermedad de Chagas. En : Parasitología Clínica. 3^a edición. Ed. Mediterráneo. Santiago pp. 255-268.

- **Basombrío, M.A.; Arredes, H.; Uncos, D.A.; Rossi, R.; Alvarez, E.** 1987. Field trial of Vaccination Against American Tripanosomiasis (Chagas Disease) in American Guinea Pigs. Am. J. Trop. Med. Hyg. 37: 57-62.

- **Bonecini-Almeida, M.; Galvao-Castro, B.; Ribeiro, M.; Pirmez, C.; Naranja, F.** 1990. Experimental Chagas Disease in rhesus monkeys. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 85: 163-172.

- **Botero, D.; Restrepo, P.** 1992. Parasitosis Humanas. Ed. Corporación para Investigaciones Biológicas. Medellín, Colombia. pp 191-206.

- **Braun, M.; De Titto, E.;** 1985. Respuesta inmune al *Trypanosoma cruzi*. Un Acta Physiol. Pharmacol. Latinoam. 35: 1-47.

- **Brener, Z.** 1985. General Review on *Trypanosoma cruzi*: Clasification and taxonomy. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 18: 1-18.

- **Brener, Z. ; Gazzinelli, R.** 1997. Immunological control of *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas' disease. Int. Arch. Allergy Immunol. 114: 103 – 110.

- **Burleigh, B.A.; Andrews, N.W.** 1995. The mechanism of *Trypanosoma cruzi* invasion of mammalian cells. Annu. Rev. Microbiol. 49: 175-200.

- **Canals, M.; Cattán, A.** 1992. Dynamics of Chagas infection transmission in Chile: Model and Simulation. Rev. Med. Chile. 120: 1359-1365.

- **De Gaspari, E. ; Umezawa, E. ; Zingales, B. ; Stolf , A.M. ; Colli, W. ; Abrahamsohn, I.** 1990. *Trypanosoma cruzi* : serum antibody reactivity to the parasite antigens in susceptible and resistant mice. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 3 : 261 – 270.

- **De Lana, M.; Chiari,E.; Tafuri, W.** 1992. Experimental Chagas Disease in Dogs. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 87: 59-71.

- **Dias, J.; Silveira, A.; Schofield, C.** 2002. The impact of Chagas Disease control in Latin America- A review. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 97: 603-612.

- **Fernandes, A.J.; Vitor, R.; Dias, J.** 1994. Avaliacao Parasitologica e Serologica de caprinos Inoculados Experimentalmente Pelo *Trypanosoma cruzi*. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo. 36: 11-17.

- **Figueiredo, F.; Rossi, M.; Santos, R.** 1985. Evolucao da cardiopatia experimentalmente inducida em coleos infectados com *Trypanosoma cruzi*. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 18: 133-141.

- **Guhl, F.** 1990. Purified *Trypanosoma cruzi* specific glycoprotein for discriminative serological diagnosis of South American Trypanosomiasis. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 85: 531-532.

- **Hontebeyrie-Joskowicz, M. ; Said, G. ; Millon, G. ; Marchall, G. ; Eisen, H.** 1987. L3T4 T cells able to mediate parasite-specific delayed type hipersensitivity play a role in the pathology of experimental Chagas' disease. Eur. J. Immunol. 17 : 1027 – 1032.

- **Hoft, D.; Lynch, R.; Kirchoff, L.** 1993. Kinetics analysis of antigen-specific immune response in resistant and susceptible mice during infection with *Trypanosoma cruzi*. J. Immunol. 151 : 7038 – 7047.

- **Juri, M.A. ; Ferreira, A. ; Ramos, A. ; Hoecker , G.** 1990. Non-lytic antibodies in H-2-controlled resistance to *Trypanosoma cruzi*. Braz.J. Med. Biol. Res. 23 : 685 – 695.

- **Klein, J. ; Figueroa, F. ; David, C.S.** 1983. H-2 haplotypes .Genes and Antigens: second listing. Immunogenetics 17 : 553 – 596.

- **Laguens, R.P. ; Cabeza-Meckert, P. ; Chambo, J. ; Gelpi, R.** 1981. Chronic Chagas disease in the mouse. Med. 41: 40 – 45.

- **Lopez, M.; Leyton, C.; Graf, M.** 1982. Técnicas de Histología y Citología. Segunda edición, Depto. De Biología Celular y Genética, Facultad de Medicina. Universidad de Chile. p 242 .

- **Miles, M.A.** 1983. The epidemiological of South American Trypanosomiasis biochemical and immunological approaches and their relevance to control. Transc. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 77: 5-23.

- **Minoprio, P. ; Itohara, S. ; Heusser, C. ; Tonegawa, S. ; Coutinho, A.** 1989. Immunobiology of murine *T. cruzi* infection : The predominance of parasite-nonspecific responses and the activation of TCRI T cells. Immunol. Rev. 112 : 184 – 207.

- **Muñoz, P.; Bergen, A.M.; Alvarez, P.; Atías, A.** 1990. Un caso de Enfermedad de Chagas Congénita de Curso Fatal e Importancia del Estudio de su Grupo Familiar. Parasitol. al día. 14: 41-45.

- **Myler, P.** 1993. Molecular Variation in Trypanosomes. *Acta Trop.* 53: 205-225.

- **Nickerson, P.; Orn, P.; Schroeder, M.L.; Selka, L.; Johnston, J.B.** 1989. Transfusion associated to *Trypanosoma cruzi* infection. *Ann. Intern. Med.* 111: 851-853.

- **Ordenes, H.V.; Ehrenfeld, M.; Cattán, P.; Canals, M.** 1996. Infección Tripano-triatomina de *Triatoma spinolai* en una zona de riesgo epidemiológico. *Rev. Med. Chile.* 124: 1053-1057.

- **Paláu, M.T. ; Nicholls, S. ; Gualdrón , L. ; Santacruz, M. ; Montilla, M. ; Vergara , U. ; Zúñiga , C.** 2000. Study of a *Trypanosoma cruzi* strain San Antonio. Proc. XVth International Congress for Tropical Medicine and Malarie. Cartagena, Colombia. pp. 7

- **Paláu, M.T. ; Mejía, A.J. ; Vergara, U. ; Zuñiga, C.** 2003. Action of *Trypanosoma rangeli* in infections with virulent *Trypanosoma cruzi* populations. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 4 : 543 – 548.

- **Pizzi, T. P.** 1957. Inmunología de la Enfermedad de Chagas. Ed. Universidad de Chile. Santiago. pp. 18-19.

- **Ramirez, L.E.; Lagos-Silva, E.; Soares, J.M.; Chapadeiro, E.** 1994. The Hamster (*Mesocricetus auratus*) As Experimental Model in Chagas Disease Parasitological and Histopathological studies In Acute and Chronic Phases o *Trypanosoma cruzi* infection. *Rev. Bras. Med. Trop.* 27: 163-169.

- **Revelli, S.; Moreno, H.; Berra, H.; Valenti, J.R.; Nocito, A.; Amerio, N.; Moroni, J.C.** 1985. Efecto de extractos ricos en ARN Inmune sobre algunos

parámetros histopatológicos de ratas infectadas con *Trypanosoma cruzi*. Bol. Chil. Parasitol. 40: 51-57.

- **Reyes, H.** 1991. Triatomíneos y Cimicídios. En Atías, A. Parasitología Clínica. 3ra ed. Edit. Mediterráneo. pp 513-521.

- **Ruiz, I.; Agurto, M.; Arismendi, M.; Manosalva, M.; Herskovic, P.; Astorga, B.** 1984. Seropositividad para la Enfermedad de Chagas en Donantes del Banco de Sangre de un Hospital Pediátrico de Santiago. Parasitol. Al día. 8: 77-78.

- **Russo, M. ; Starobinas , N. ; Ribeiro dos Santos, R. ; Minoprio, P. ; Eisen, H. ; Hontebeyrie-Joskowicz, M.** 1989. Susceptible mice present higher macrophage activation than resistant mice during infection with myotropic strains of *Trypanosoma cruzi*. Parasite Immunol. 11 : 385 – 389.

- **Schenone, H.; Alfaro, E.; Rojas, A.** 1974. Bases y Rendimiento del Xenodiagnóstico en la infección chagásica humana. Vol. Chil. Parasitol. 29: 24-27.

- **Schenone, H.; Villarroel, F.; Rojas, A.; Alfaro, E.** 1980. Factores biológicos y ecológicos en la epidemiología de la enfermedad de Chagas en Chile. Bol Chile Parasitol 35: 42-54.

- **Scott, M.; Goss-Sapson, M.** 1984. Restricted IgG isotype profiles in *Trypanosoma cruzi* infected mice and Chagas disease patients. Clin. Exp. Immunol. 58: 372-379.

- **Shikanai-Yasuda. M. A.; Lopes, M. H.; Tolezano, J. E.; Umezawa, E.; Amato-Neto, V.; Pereira Barreto, A. C.; Higaki, Y.; Moreira, A. A. B.; Funayama, G.; Barone, A. A.; Duarte, A.; Odone, V.; Cerri, G. C.; Sato, M.; Possi, D.; Shiroma, M.** 1989. Doença de Chagas Aguda: vias de transmissio, aspectos

clínicos e respuesta a terapeutica específica em casos diagnosticados em um centro urbano. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo. 32: 16-27.

- **Stevens, J.R. ; Noyes , H. ; Schofield, C.J. ; Gibson, W.** 2001. The molecular evolution of Trypanosomatidae. Adv. Parasitol. 48 : 1 – 55.

- **Sturn, N.R.; Degrave, W.; Morel, C.; Simpson, L.** 1989. Sensitive detection and schizodeme classification of *Trypanosoma cruzi* cells by amplification of kinetoplast minicircle DNA sequences: use in diagnosis of Chagas Disease. Mol. Biochem. Parasitol. 33: 205-214.

- **Texeira, A.; Sadi, P.; Rebelo, J.; Algarañaz, E.; Viera,D.; Lauria-Pires, L.; Nascimento, R.; Vexenant, C.; Silva, A.; Ault, S.; Costa, J.** 2001. Emerging Chagas disease: Trophic network and cycle of transmission of *Trypanosoma cruzi* from palm trees in the amazon. Emerg. Infect. Dis. 1: 100-112.

- **Trischmann, T.M.; Bloom, B.** 1982. Genetic of Murine Resistance to *Trypanosoma cruzi*. Infect. Immun. 35: 546-551.

- **Urdaneta-Morales, S.; Tejero, F.** 1992. *Trypanosoma rangeli* (Tejera 1920) : observations upon pleomorphism. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 87: 511 – 516.

- **Vargas, R.** 1998. Péptidos sintéticos en el estudio de la respuesta inmune en la infección experimental con *Trypanosoma cruzi*. Tesis presentada para obtener el Grado de magíster en Ciencias Biológicas, Mención Inmunología. Escuela de Postgrado, Facultad de Medicina, Universidad de Chile. pp 27-33.

- Vergara, U.; Lorca, M.; Veloso, C.; Gonzáles, A.; Engstrom, A.; Aslund, L.; Petterson, U.; Frasc, A. 1991. A simple essay for detection of *Trypanosoma cruzi* antibodies in human sera based on the reaction with synthetic peptide. J. Clin. Microbiol. 29: 2034-2039.

- Vergara, U.; Palomo, I.; Zúñiga, C.; Navarrete, C. 2002. Complejo principal de Histocompatibilidad. En: Fundamentos de Inmunología Básica y Clínica. Ed. Universidad de Talca. pp. 167-178.

- WHO – World Health Organization. 1991. Control of Chagas disease. Technical Repport Series (811). Geneva. pp 91.

- Villela-Ribeiro, L. ; Barbosa, A. ; Andrade, Z. 2002. Pathology of intracardiac nerves in experimental Chagas disease. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 5 : 613 – 617.

- Wisnivesky-Colli, C.; Gürtler, R. E.; Solarz, N. D.; Lauricella, M. A.; Segura, E. 1985. Epidemiological Role of Humans, Dogs and Cats in the Transmision of *Trypanosoma cruzi* in a Central Area of Argentina. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo. 27: 346-352.

- Wrightsman, R.; Krassner, S.; Watson, J. 1982. Genetic control of response to *Trypanosoma cruzi* in mice: multiple genes influencing parasitemia and survival. Infect. Inmun. 36: 637-644.

- Zúñiga,C .1995. Evolución de la respuesta inmune en ratones infectados experimentalmente con *Trypanosoma cruzi*. Tesis presentada para obtener el Grado de magíster en Ciencias Biológicas, Mención Inmunología. Escuela de Postgrado, Facultad de Medicina, Universidad de Chile. pp 49-53.

- **Zúñiga, C. ; Paláu, M.T. ; Penin, P. ; Gamallo, C. ; De Diego, J.A..** 1997. Characterization of a *Trypanosoma rangeli* strain of colombian origin. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 4 : 523 – 530.

- **Zúñiga, C.; Parra, A.; Vela, H.; Courcelles, M.; Vargas, R.; Vergara, U.** 1998. Estudio histopatológico en ratones infectados experimentalmente con *Trypanosoma cruzi*. Parasitol. al Día. 22: 23-28.

- **Zúñiga, C.; Vargas, R.; Vergara, U.** 2002. Evolución de la infección con *Trypanosoma cruzi* en cepas susceptibles y resistentes de ratones. Arch. Vet. Med. 2: 183-188.