



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

**EVALUACIÓN HISTOPATOLÓGICA DEL TEJIDO CARDIACO
DE RATONES ACA INFECTADOS CON LAS
CEPAS SAN ANTONIO, TULAHUÉN Y MUNANTÁ DE
*Trypanosoma cruzi***

Rafael Orlando Antonio Mauna Luke

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

PROFESOR GUÍA: Ulises Vergara
Departamento de Patología Animal.

Financiamiento Proyecto: DPA14LIHBAC1314003

SANTIAGO, CHILE
AÑO 2015



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

**EVALUACIÓN HISTOPATOLÓGICA DEL TEJIDO CARDIACO
DE RATONES ACA INFECTADOS CON LAS
CEPAS SAN ANTONIO, TULAHUÉN Y MUNANTÁ DE
*Trypanosoma cruzi***

Rafael Orlando Antonio Mauna Luke

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

Nota Final:

Dr. Ulises Vergara

Dr. Julio Larenas

Dra. Lorena Aguilar

PROFESOR GUÍA: Dr. Ulises Vergara C.
Departamento de Patología Animal

SANTIAGO, CHILE
2015

AGRADECIMIENTOS

A mi familia, a quienes les debo todo. Les agradezco por su apoyo incondicional durante todo este tiempo, y pese a no poder estar físicamente juntos durante gran parte de este recorrido, nunca me sentí solo, y eso me ha alentado a seguir siempre adelante.

A mis amigos, por ser grandes compañeros en este viaje. Tanto a aquellos que hice dentro de la Universidad como a aquellos que me han acompañado desde siempre. Respaldándome en los tiempos difíciles y siendo incondicionales ante todo.

A mis profesores, por su paciencia y buena disposición al enseñarme y corregir mis pasos. A quienes han estado de mi lado e incluso a quienes han puesto obstáculos en el camino, eso me ha enseñado a que uno debe aprender de los errores y saber ponerse de pie.

A todos los animales, especialmente a los que han sido parte de mi familia. Gracias por enseñarme lo que es la lealtad y lo feliz que se puede ser al ver a quien uno más quiere. Han sido ellos los que impulsaron mi sueño de ser Médico Veterinario y dedicar mi vida a la suya. Y a aquellos que han sido sacrificados por la ciencia, que han visto truncadas sus vidas por el desarrollo y beneficio tanto de la humanidad como de los demás animales.

Final y especialmente, Daniela, mi amor y mi vida. Gracias por acompañarme todos estos años, en las buenas y en las malas. Desde los días en que todo era un sueño, me demostró que nuestro amor iba a ser el camino para conseguir todo lo que nos propusiéramos, lo que nos mantendría fuertes ante la adversidad y felices mientras nos tengamos el uno al otro. Juntos haremos de cada día un nuevo paso hacia nuestro futuro.

ÍNDICE DE CAPÍTULOS

ÍNDICE DE FIGURAS	ii
RESUMEN	iii
ABSTRACT	iv
INTRODUCCIÓN	1
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	3
HIPÓTESIS	8
OBJETIVO GENERAL	8
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	8
MATERIALES Y METODOS.....	9
Ratones y Parásitos.....	9
Modelo de infección experimental.....	10
Estudio de Parasitemia.	10
Estudio histopatológico.	11
Análisis estadístico.	11
RESULTADOS	12
Niveles de parasitemia y mortalidad acumulada.	12
Estudio Histopatológico.....	13
Recuento de pseudoquistes:.....	16
Infiltrado inflamatorio	18
DISCUSIÓN	19
CONCLUSIÓN.....	20
BIBLIOGRAFÍA.....	21

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Diferencias en la evolución de los niveles de parasitemia en ratones ACA infectados con 2.000 tripomastigotes sanguíneos de las cepas Tulahuén, Munantá y San Antonio de <i>T. cruzi</i>	12
Figura 2.- Diferencias en los porcentajes de supervivencia acumulada en ratones ACA infectados con 2.000 tripomastigotes sanguíneos de las cepas Tulahuén, Munantá y San Antonio de <i>T. cruzi</i>	13
Figura 3.- Comparación del efecto inflamatorio de la infección con las cepas Munantá, Tulahuén y San Antonio de <i>T. cruzi</i> en el tejido cardiaco de ratones ACA al día siete post infección.....	14
Figura 4.- Comparación del efecto inflamatorio de la infección con las cepas Munantá, Tulahuén y San Antonio de <i>T. cruzi</i> en el tejido cardiaco de ratones ACA al día catorce post infección.....	15
Figura 5.- Comparación del efecto inflamatorio de la infección con las cepas Munantá, Tulahuén y San Antonio de <i>T. cruzi</i> en el tejido cardiaco de ratones ACA al día veintiuno post infección.....	16
Figura 6.- Diferencias en la evolución del número de pseudoquistes en el tejido cardiaco de ratones ACA infectados con 2.000 tripomastigotes sanguíneos de las cepas Tulahuén, Munantá y San Antonio de <i>T. cruzi</i>	17
Figura 7.- Diferencias en la evolución del infiltrado inflamatorio mononuclear en el tejido cardiaco de ratones ACA infectados con 2.000 tripomastigotes sanguíneos de las cepas Munantá, Tulahuén y San Antonio de <i>T. cruzi</i>	18

RESUMEN

En el presente trabajo se analizó la evolución de la infección con *Trypanosoma cruzi* en ratones ACA experimentalmente infectados con 2.000 tripomastigotes sanguíneos de las cepas Tulahuén, Munantá y San Antonio del parásito, evaluando la prepatencia, parasitemia y mortalidad acumulada, y su correlación con el número de pseudoquistes y la magnitud del daño inflamatorio en el tejido cardiaco de los individuos infectados.

Los ratones infectados con la cepa Tulahuén mostraron una prepatencia sanguínea de 5 días, un máximo de $14,8 \times 10^5 \pm 2,21 \times 10^5$ parásitos/mL al día 11 post infección (p.i.) y una mortalidad acumulada del 100% al día 21 post infección. Los animales infectados con Munantá mostraron, en cambio, una prepatencia sanguínea de 7 días, un máximo de $40,06 \times 10^5 \pm 1,86 \times 10^5$ parásitos/mL al día 17 p.i. y una supervivencia cercana al 80% más allá de 6 meses p.i. Mientras que los infectados con San Antonio presentaron una prepatencia sanguínea de 7 días, un máximo de $1,73 \times 10^5 \pm 1,86 \times 10^4$ parásitos/mL al día 11 p.i. y una mortalidad acumulada del 100% al día 20 p.i.

Los resultados sugieren la existencia de una correlación entre el parasitismo intracelular, magnitud del infiltrado inflamatorio mononuclear, severidad del daño en el tejido cardiaco, y mortalidad acumulada hasta la tercera semana p.i. en los ratones infectados con Tulahuén y San Antonio, situación que no ocurre en los ratones infectados con Munantá, a pesar de su significativamente elevada parasitemia ($p < 0,001$). Estos resultados reafirman la sugerencia que no existe una relación directa entre la parasitemia, la virulencia de la cepa o aislado del parásito y la susceptibilidad a la infección.

Palabras Clave: Cardiopatía Chagásica, cepas de *Trypanosoma cruzi*, Estudio histopatológico en ratones, infiltrado inflamatorio.

ABSTRACT

In the present work, evolution of *Trypanosoma cruzi* infection was analyzed in ACA mice experimentally infected with 2.000 blood trypomastigotes from Tulahuén, Munantá and San Antonio parasite strains. The prepatent period, parasitemia levels and cumulative mortality, and their correlation with the number of pseudocysts and severity of the inflammatory cardiac tissue damage, were evaluated in infected animals.

Mice infected with the Tulahuén strain showed a prepatent period of 5 days, with a maximum level of parasitemia of $14,8 \times 10^5 \pm 2,21 \times 10^5$ parasites / mL at day 11 post infection (p.i.) and a cumulative mortality of 100% on day 21 p.i. However, mice infected with the Munantá strain showed a prepatent period of 7 days, with a maximum level of parasitemia of $40,06 \times 10^5 \pm 1,86 \times 10^5$ parasites / mL at day 11 p.i. with almost 80% survival beyond 6 months p.i. While the San Antonio infected mice showed a prepatent period of 7 days, with a maximum level of parasitemia of $1,73 \times 10^5 \pm 1,86 \times 10^4$ parasites / mL at day 11 p.i. and a cumulative mortality of 100% on day 21 p.i.

The results of the histopathological analysis suggest the existence of a correlation between intracellular parasitism, the magnitude of mononuclear inflammatory infiltrate, the severity of damage to the heart tissue, and mortality until the third week post infection of mice infected with the Tulahuén and San Antonio strains, while the Munantá infected animals, showed not only scarce pseudocysts number and decreased inflammatory cell infiltration number damage, but also a long term recovery of cardiac tissue damage, despite their significantly higher levels of parasitemia ($p < 0,001$). These results support the suggestion that there is no direct relationship between the experienced levels of parasitemia, the virulence of the *T. cruzi* strain and susceptibility to the parasite infection.

Key Words: Chagasic cardiomyopathy, *Trypanosoma cruzi* strains, histopathological studies in rats, inflammatory infiltrate.

INTRODUCCIÓN

El protozoo hemoflagelado *Trypanosoma cruzi* (*T.cruzi*) es el agente causal de la Trypanosomosis americana o Enfermedad de Chagas y, debido a su amplia distribución y alta prevalencia en el hombre y animales, constituye un importante problema de salud pública en Centro y Sudamérica. La enfermedad es una condición inflamatoria crónica y potencialmente mortal y se estima que entre 15 y 18 millones de personas están infectadas por el parásito y que entre 75 y 90 millones se encuentren expuestas a la infección, desde el sur de Estados Unidos hasta el cono sur de Latinoamérica. A más de cien años de su descripción, la enfermedad de Chagas continúa siendo una infección compleja, pero diversas estrategias orientadas al control de los insectos vectores, han resultado exitosas, logrando disminuir la incidencia de la enfermedad en varios países de América Latina (OMS, 2013).

Sin embargo, el actual proceso de globalización comercial y el aumento de las migraciones desde áreas rurales a urbanas y desde regiones endémicas a no endémicas, han aumentado el riesgo de expansión de la enfermedad, convirtiendo la infección con *T. cruzi* en un problema emergente de salud pública en regiones no endémicas de Norteamérica, Europa, Japón y Australia, como consecuencia de sus variados mecanismos de transmisión (Toso *et al.*, 2011; Kowalska *et al.*, 2011; OMS, 2013).

La Enfermedad de Chagas se caracteriza por un curso clínico variable, que va desde una infección asintomática, hasta una enfermedad crónica severa, en donde la cardiopatía chagásica es su forma más severa, desarrollándose en el 10% al 30% de los individuos que cursan esta fase crónica de la enfermedad (Apt *et al.*, 2011)

El modelo de infección experimental de ratones con distintos aislados o cepas de *T. cruzi*, ha resultado muy útil en el estudio de la Enfermedad de Chagas, puesto que reproduce variados aspectos de la enfermedad humana, incluyendo los mecanismos de daño tisular y los mecanismos inmunológicos involucrados en el control de la infección (Andrade *et al.*, 2002).

Además, las distintas cepas de ratones difieren en la resistencia o susceptibilidad a la infección con distintos aislados o cepas del parásito, existiendo un complejo mecanismo de control de los niveles de parasitemia y supervivencia de los animales infectados (Wrightsmán *et al.*, 1982).

En el presente trabajo de memoria de título se realizó un estudio histopatológico para evaluar el daño tisular, la presencia de parásitos y de células inflamatorias, en el tejido cardíaco de ratones ACA que, en una etapa previa a la realización del presente estudio, se infectaron experimentalmente con 2.000 tripomastigotes sanguíneos de la cepa San Antonio, cepa Tulahuén y cepa Munantá de *Trypanosoma cruzi*.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

La Enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis americana es una zoonosis parasitaria cuyo agente etiológico es *Trypanosoma cruzi*, un protozoo hemoflagelado del orden *Kinetoplastida*, familia *Trypanosomatidae* (Kowalska *et al.*, 2011).

El parásito presenta un ciclo de vida digenético, con alternancia entre un insecto vector triatómino y un hospedero mamífero. A lo largo de su ciclo biológico, el parásito experimenta profundas alteraciones morfológicas, lo que permite distinguir cuatro formas distintas que se conocen como amastigote, epimastigote, tripomastigote y tripomastigote metacíclico, que reflejan la adaptación del parásito al medio biológico en que se encuentra (Toso *et al.*, 2011).

El parásito es transmitido a hospederos mamíferos principalmente por vectores hematófagos del género *Triatoma* (Toso *et al.*, 2011). Aunque se han identificado alrededor de 130 especies de triatominos que podrían participar en la transmisión de *T. cruzi* a los humanos, sólo unos cuantos pueden actuar como vectores competentes (Rassi *et al.*, 2012). Estos vectores se conocen comúnmente como vinchucas y ocupan distintos ecotopos, tanto silvestres como peridomésticos. *Triatoma infestans* es el vector más importante de la Enfermedad de Chagas en Chile y el resto de los países sudamericanos (Jercic *et al.*, 2012). Existen más de 150 especies de mamíferos, tanto silvestres como domésticos, que actúan como reservorio de la enfermedad (Rassi *et al.*, 2012). En la transmisión natural de *T. cruzi* se distinguen tres ciclos distintos en los que participa el insecto vector: el ciclo doméstico, el ciclo peridoméstico, y el ciclo enzoótico (Jercic *et al.*, 2012).

Cuando un insecto infectado por *T. cruzi* se alimenta de la sangre de un individuo, su abdomen se repleta estimulando el reflejo de deyección, encontrándose en esta mezcla de heces y orina tanto epimastogotes como tripomastigotes metacíclicos, siendo estos últimos la forma infectante para el hospedero mamífero. Si las deyecciones de una vinchuca infectada se depositan en las cercanías de una lesión en la piel del hospedero, el agente penetrará a través de ella, parasitando células de la dermis o terminará fagocitado por células polimorfonucleares o monocitos que hayan infiltrado el tejido. Una vez en el citoplasma de la célula infectada, el parásito se transformará en amastigote, que constituye la forma replicativa de *T. cruzi* y luego de varios ciclos de división binaria éstos se transformarán en tripomastigotes sanguíneos que lizarán la célula que los contiene para ingresar al torrente sanguíneo. De esta manera los tripomastigotes sanguíneos se

diseminan a otros tejidos y cuando un triatomino sano se alimenta de este hospedero mamífero infectado, los tripomastigotes sanguíneos se transformarán, en el intestino medio del vector, en epimastigotes, que constituyen la fase replicativa del parásito, y en el intestino posterior del insecto, se producirá la nueva transformación a tripomastigotes metacíclicos que será eliminada con las deyecciones (Kowalska *et al.*, 2011).

Además de la infección vectorial, se han descrito otros mecanismos de transmisión: Transmisión congénita, transfusión sanguínea, trasplante de órganos, vía alimentaria y accidentes de laboratorio, los cuales varían en cuanto a su grado de importancia dependiendo de la epidemiología local (Minsal, 2011).

La Enfermedad de Chagas es una afección compleja que puede ser producida por distintos aislados o cepas de *T. cruzi* que requieren una adecuada tipificación genotípica, para determinar no sólo la dinámica de su transmisión al hospedero, sino también las distintas formas clínicas de la enfermedad y el daño tisular que puede producir en el hospedero humano. El rol de la variabilidad genética del parásito en el desarrollo de distintas formas clínicas de la enfermedad que se presentan en las regiones endémicas, es en gran parte desconocido. Sin embargo se considera que la heterogeneidad de las distintas cepas de *T. cruzi* es uno de los principales factores asociados a las distintas formas clínicas de la enfermedad, puesto que la variabilidad biológica del parásito traerá como consecuencia diferencias en sus mecanismos de patogenicidad, como el tropismo tisular, los niveles de parasitemia, y su resistencia al estrés oxidativo (Pereira y Navarro, 2013). De esta manera, el curso clínico de la infección crónica será, finalmente, resultado de una compleja interacción entre las características genéticas y biológicas de la cepa o aislado infectante, el repertorio inmunogenético del hospedero y las características ecoepidemiológicas de la infección (Moreira *et al.*, 2013). Pudiendo producirse brotes de nuevas cepas, especialmente en regiones en donde la enfermedad se concentraba en ciclos silvestres, como un caso acontecido en Colombia en 1999, en donde un brote agudo produjo víctimas fatales, aislándose de este una cepa denominada San Antonio, la cual aún no ha sido descrita en profundidad (Paláu *et al.*, 2003).

Uno de los principales problemas que se ha presentado en el estudio de la enfermedad de Chagas, se asocia a las dificultades para establecer una correlación entre las distintas formas clínicas de la enfermedad, las características biológicas de las distintas cepas o aislados del parásito, prevalentes en las distintas áreas geográficas (Pereira y Navarro, 2013), por lo que, actualmente se describen 6 distintos linajes de *T. cruzi*, denominados

“unidades discretas de tipificación” (DTU): TcI, TcII, TcIII, TcIV, TcV, y TcVI, los que presentan características eco-epidemiológicas, clínicas y de distribución geográfica más concretas. Para diferenciarlas actualmente se utilizan métodos de genotipificación basados en ensayos moleculares, principalmente PCR, RFLP, RADP y HRM. (Rodríguez *et al.*, 2002, Zingales *et al.*, 2008, Higuera *et al.*, 2013). En Chile solo se han descrito cepas de los DTU TcI, TcII, TcV, y TcVI, tanto en ciclos silvestres como domésticos (Arenas *et al.*, 2012).

Por otro lado, debido a la capacidad biológica del parásito para invadir virtualmente cualquier célula nucleada del hospedero mamífero, la infección con *Trypanosoma cruzi*, luego de un período de incubación de 7 a 10 días, se presenta de manera aguda con parásitos libres en el torrente sanguíneo que proliferan y se diferencian, focos de infiltrado inflamatorio y daño progresivo en los tejidos infectados. Aún cuando los parásitos pueden inducir una significativa respuesta inmune durante esta fase aguda de cuatro a ocho semanas de duración, ella es finalmente incapaz de eliminar la infección que luego de un período indeterminado o latente de dos a cuatro meses, entrará en una fase crónica caracterizada por una disminución en el número de parásitos y por un daño tisular que afecta principalmente al corazón y/o al tracto gastrointestinal. Este daño tisular conduce finalmente a la presentación de distintas formas clínicas de la enfermedad (cardiaca, digestiva o mixta) durante esta fase crónica, que se prolongará durante toda la vida del paciente infectado (Texeira *et al.*, 2011). Aproximadamente entre el 50% al 70% de los pacientes infectados cursan la fase crónica indeterminada o asintomática de la enfermedad y en Chile se estima que entre el 1% y el 2% de estos pacientes podría pasar, anualmente, de la fase crónica indeterminada a presentar una afección cardiaca crónica (Apt *et al.*, 2011).

En humanos, los signos clínicos pueden desarrollarse 10 a 30 años después de la infección inicial, existiendo e daño inflamatorio en distintos órganos, particularmente en corazón, esófago, colon y sistema nervioso periférico. El corazón es órgano más frecuentemente afectado y la falla cardiaca congestiva es la causa de muerte más común entre los pacientes infectados. Cerca del 1% de los pacientes puede presentar miocarditis aguda, efusión pericárdica y/o meningoencefalitis, particularmente en pacientes menores de 2 años (Bern *et al.*, 2011), La cardiopatía chagásica es una enfermedad progresiva caracterizada por la inflamación, hipertrofia y fibrosis del tejido cardiaco (Teixeira *et al.*,

2011) desarrollando la llamada cardiopatía chagásica crónica (CCC) que es la manifestación más devastadora de la Enfermedad de Chagas (Gironès *et al.*, 2005).

En pacientes fallecidos como consecuencia de CCC se ha encontrado aumento del volumen intraventricular y aneurismas apicales, además de la formación de trombos murales que pueden explicar los accidentes neurovasculares (Gironès *et al.*, 2005). Desde el punto de vista histopatológico, el tejido cardiaco infectado muestra bandas de necrosis y miocitolisis, además de áreas focales y difusas de hipertrofia miocelular con o sin presencia de infiltración linfoide incluso en la ausencia de parásitos (Tanowitz *et al.* 2009). Fibrosis e inflamación crónica han sido detectadas también en el sistema excito conductor, lo que se relaciona con la alta incidencia de arritmias en estos pacientes (Gironès *et al.* 2005).

La patogénesis de la cardiopatía chagásica crónica no está claramente establecida, pero se han postulado distintos mecanismos patogénicos para explicar su desarrollo. Entre ellos se distinguen aquéllos que se basan en la acción primaria del parásito, y aquéllos que responsabilizan a las reacciones inflamatorias, mecanismos inmunes y autoinmunes, tanto por separado como por la combinación de sus efectos (Gironès *et al.*, 2005; Cunha-Neto *et al.*, 2006; Tanowitz *et al.*, 2009).

El daño a los cardiomiocitos se puede asociar a la infección intracelular, la replicación de los amastigotes, y cambios microvasculares que, inducidos por el parásito, pueden conducir a la degeneración de los cardiomiocitos desarrollando la inflamación lo cual es esperable en la fase aguda de la infección, pero no presenta relevancia clínica excepto en pacientes altamente parasitados o inmunosuprimidos (Gironès *et al.*, 2005; Cunha-Neto *et al.*, 2006). Los fenómenos asociados al desarrollo de inmunidad inducida por la persistencia de antígenos de *T. cruzi* incluyen la activación de linfocitos T antígeno específicos, la secreción de citoquinas proinflamatorias y el reclutamiento de células inflamatorias mononucleares lo que puede conducir a neutrófilia y eosinófilia crónicas que pueden provocar daño colateral inespecífico en la región tisular adyacente a los pseudoquistes parasitarios. Además, se ha descrito la existencia de mecanismos de mimetismo molecular entre epítopos antigénicos del parásito y del hospedero, sugiriendo el desarrollo de autoinmunidad y de daño tisular, incluso en ausencia del parásito, tanto en la fase aguda, como en la fase crónica de la enfermedad (Kierszbaum, 2005, Gironès *et al.*, 2005; Cunha-Neto *et al.*, 2006; Ferreira *et al.*, 2012).

El modelo de infección experimental en ratones se ha convertido en uno de los modelos más ampliamente utilizados en el estudio de la infección con *T. cruzi*, por el fácil manejo de los animales y porque imita muchos aspectos de la enfermedad humana, incluyendo el daño tisular y los mecanismos efectores de respuesta inmune celular y humoral, involucrados en el control del parásito (Gironès *et al.*, 2005). La evidencia experimental obtenida utilizando el modelo murino, ha sugerido que el desarrollo y la evolución de la infección depende tanto de factores asociados al parásito como son: La virulencia y el tropismo celular de distintos aislados o cepas de *T. cruzi*, dosis o número de parásitos en la infección inicial, sitio o tejido de ingreso de los mismos (Andrade *et al.*, 2002), como de factores propios del hospedero (sexo, edad y repertorio genético asociado a los distintos mecanismos de respuesta inmune) (Zúñiga *et al.*, 2012).

Cepas puras de ratones difieren en la susceptibilidad o resistencia a la infección con *T. cruzi*, existiendo, al parecer, un complejo control genético de los niveles de parasitemia y de la supervivencia de los animales infectados (Wrightsman *et al.*, 1982). A pesar de ello, aun no se conocen con certeza los factores directamente involucrados en los fenómenos de resistencia o susceptibilidad a la infección, siendo el Complejo mayor de Histocompatibilidad (MHC) uno de los factores genéticos asociados a la susceptibilidad, en donde cepas congénicas, solo diferentes en el MHC, pueden comportarse como resistentes o susceptibles a la infección, como es el caso de las cepas ACA (H-2^I), considerada como susceptible, mientras que A.Sw (H-2^S) es resistente a la infección. (Zúñiga *et al.*, 2002).

Por lo tanto, basado en los antecedentes expuestos, en este estudio se busca describir la patogenicidad de cepa San Antonio, en base tanto en su presencia en sangre como en tejidos. Además, evaluando las lesiones en el tejido cardíaco que puede producir en ratones ACA, considerados susceptibles. Asimismo, para contextualizar su patogenicidad, se utilizará 2 cepas como marco control: una considerada altamente patogénica, Tulahuén, de origen chileno (Zúñiga, *et al.*, 2012), y una considerada poco patogénica, Munantá, de origen colombiano (Paláu *et al.*, 2003).

HIPÓTESIS

En ratones ACA, la infección experimental con la cepa San Antonio de *Trypanosoma cruzi* produce mayor número de pseudoquistes y mayor daño inflamatorio en el tejido cardíaco, que la infección con la cepa Tulahuén y la cepa Munantá del parásito.

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar y cuantificar el daño histopatológico de la infección con *T. cruzi*, en el tejido cardíaco de tres grupos de ratones hembras de la cepa ACA, experimentalmente infectados con las cepas San Antonio, Tulahuén y Munantá del parásito.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Comparar la magnitud del daño en el tejido cardíaco de los tres grupos de ratones hembras ACA de 10 semanas de edad experimentalmente infectados con las cepas San Antonio, Tulahuén o Munantá de *Trypanosoma cruzi*.
 - a. Cuantificando la presencia de pseudoquistes, en el tejido cardíaco de los ratones infectados.
 - b. Determinando la existencia de focos inflamatorios, daño vascular y eventual presencia de tejido fibroso en el tejido cardíaco, y además cuantificando el número de células inflamatorias para obtener una comparación más precisa.
2. Establecer si existe correlación entre el daño inflamatorio en el tejido cardíaco de los ratones infectados con las distintas cepas de *T. cruzi* y los resultados de niveles de parasitemia y de mortalidad acumulada obtenidos durante el desarrollo o evolución de la infección experimental, previa a la extracción de los tejidos infectados.

MATERIALES Y METODOS

Ratones y Parásitos

En la presente memoria de título, se realizó un estudio histopatológico de tejido cardiaco de tres grupos de 15 ratones hembras de la cepa ACA de 10 semanas de edad, experimentalmente infectados mediante inoculación intraperitoneal de 2.000 tripomastigotes sanguíneos de las cepas San Antonio, cepa Tulahuén y Cepa Munantá de *Trypanosoma cruzi* en una etapa previa al desarrollo del presente trabajo y que, por razones de bioseguridad, se realizó sin la participación del alumno.

La cepa de ratones ACA, que proviene originalmente del Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, Estados Unidos, se caracteriza por presentar el haplotipo H-2^f del Complejo Mayor de Histocompatibilidad de ratón.

La cepa Tulahuén de *T. cruzi*, originalmente aislada en Chile a partir de un paciente crónico (Pizzi, 1957), perteneciente al DTU TcVI (Arenas *et al.*, 2012), es una cepa altamente virulenta para el modelo murino, produciendo la muerte de los animales infectados aún con bajos niveles de parasitemia, y daño tisular caracterizado por infiltrado inflamatorio linfo-monocitario en miocardio, endocardio y pericardio (Kagan y Norman, 1960, Zúñiga *et al.*, 2012).

La cepa San Antonio fue originalmente aislada del vector *Rhodnius pallescens* en el año 1999 en la región de Magdalena, Colombia, luego de un brote de enfermedad de Chagas aguda que incluso provocó pérdidas humanas (Paláu *et al.*, 2003).

La cepa Munantá fue originalmente aislada del vector *Rhodnius prolixus* en el año 1985 en la región de Boyacá, Colombia, perteneciente al DTU TcI (Arenas *et al.*, 2012) y se considera una cepa poco virulenta, a pesar de presentar elevados niveles de parasitemia en los ratones infectados (Paláu *et al.*, 2003).

Estos parásitos se han mantenido *in vivo* mediante traspaso semanal de tripomastigotes sanguíneos en ratones BALB/c, en la Unidad de Mantenimiento de Animales de Experimentación del Laboratorio de Inmunología de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile. Todos los ratones, ACA y BALB/c provienen del Bioterio del Campus Occidente de la facultad de medicina de la Universidad de Chile.

Modelo de infección experimental

Para la obtención de parásitos, se extrajo 0,6 mL de sangre mediante punción cardiaca de ratones BALB/c infectados con cada una de las cepas. El manejo de los ratones se realizó cumpliendo con las normas bioéticas y de bioseguridad establecidas en los respectivos manuales de la Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica (CONICYT). Todos los procedimientos de infección experimental de ratones, extracción de sangre y, extracción de tejidos luego del sacrificio de los animales se realizó utilizando CO₂ administrado por vía inhalatoria en un gabinete de bioseguridad Forma Scientific Class IIA/B3 (USA). El manejo adecuado de los animales y el cumplimiento de los protocolos han sido certificados por los Comités de Bioética Animal y de Bioseguridad, de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile.

La sangre extraída se depositó en tubos estériles con 0,1 mL de citrato de sodio como anticoagulante. Luego se realizó una dilución de 10 µL de sangre infectada en 490 µL de suero fisiológico estéril y se hizo un recuento de parásitos en cámara de Neubauer. Este procedimiento permitió determinar la cantidad total de parásitos en los 0,6 mL de sangre, extraídos del ratón experimentalmente infectado.

Posteriormente se realizaron las diluciones requeridas para obtener 2.000 parásitos en 0,2mL que fue, finalmente, la cantidad y volumen inoculado por vía intraperitoneal, en cada uno de los ratones de los grupos experimentalmente infectados con *T. cruzi*.

Como control negativo se utilizó un grupo de 5 ratones hembras de la cepa ACA de 10 semanas de edad, que fueron inoculados con 0,2 mL de sangre de ratones BALB/c no infectados y diluida de manera similar a los grupos infectados. Estos ratones se sangraron en forma paralela a los grupos experimentalmente infectados, para establecer que las alteraciones y eventual muerte de los animales experimentales se debía a la infección con *T. cruzi* y no a variables como, por ejemplo, una eventual anemia provocada por las sucesivas sangrías.

Estudio de Parasitemia.

Con el fin de determinar prepatencia (primer día de determinación de parásitos en sangre) y niveles de parasitemia, los animales infectados se sangraron, desde la vena caudal, cada 2 días a partir del tercer día post infección (p.i) y se analizaron hasta la muerte de los ratones o la negatividad en los niveles de parásitos en circulación. La sangre se recolectó en tubos de micro hematocrito heparinizados, las muestras se centrifugaron a

700 g por 5 minutos, para luego de reposar por 30 minutos en estufa a 37° C, medir el volumen de sangre en cada tubo. Finalmente, cada una de las muestras se colocó en un portaobjeto para determinar el número de parásitos en 50 campos elegidos al azar y utilizando un aumento de 400x. Los resultados (obtenidos en una etapa previa a la realización del presente estudio histopatológico), se expresaron como el promedio de parasitemia del grupo y la desviación estándar correspondiente, de acuerdo al método descrito por De Arias y Ferro (1988).

Estudio histopatológico.

Para analizar la severidad del daño tisular, y cuantificar el número de células infectadas (presencia de pseudoquistes) e infiltrado inflamatorio mononuclear se utilizaron muestras de tejido cardiaco de ratones sacrificados los días 7, 14 y 21 p.i. en los grupos infectados con las cepas Tulahuén y Munantá, y a los días 7, 14 y 20 p.i., en el grupo infectado con la cepa San Antonio, puesto que el último de los ratones de este grupo sobrevivió sólo hasta el día 20 post infección

Los tejidos fueron fijados en Bouin-formalina e incluidos en parafina y se utilizaron para realizar cortes de 5 µm, los que se tiñeron luego con hematoxilina-eosina. Finalmente, utilizando un aumento de 400x, se determinó la magnitud y características del daño tisular, el número de células infectadas (pseudoquistes), el número de células inflamatorias mononucleares y la eventual presencia de tejido fibroso, en 50 campos elegidos al azar (Cruz-Zetina *et al.*, 2012).

La captura y digitalización de imágenes se realizó utilizando el programa Motic MCCamera 2.0, y la cuantificación de células se realizó utilizando el Programa Image J 1.48 (National Institute of Health, USA.)

Análisis estadístico.

La significancia estadística de los resultados de los niveles de parasitemia se determinó mediante un análisis de varianza (ANOVA), utilizando el programa GraphPad Prism, versión 5.00 para Windows, GraphPad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com. El análisis de supervivencia se realizó de acuerdo al método de Kaplan y Meier (1958), utilizando también el programa GraphPad Prism. Los resultados del análisis cuantitativo de células inflamatorias se realizaron utilizando el programa Image J.

RESULTADOS

Niveles de parasitemia y mortalidad acumulada.

En la Figura 1 se muestran los niveles de parasitemia como una forma de expresión del desarrollo de la infección en los ratones de la cepa ACA, infectados experimentalmente con tripomastigotes sanguíneos de las cepas Tulahuén, Munantá y San Antonio de *T. cruzi*. El período de prepatencia sanguínea fue de 5 días para la cepa Tulahuén y de 7 días para las cepas Munantá y San Antonio. En relación a los niveles máximos de parasitemia, éstos se detectaron al día 17 post infección en los ratones infectados con la cepa Munantá, mientras que en las cepas Tulahuén y San Antonio se observaron a los 11 días post infección.

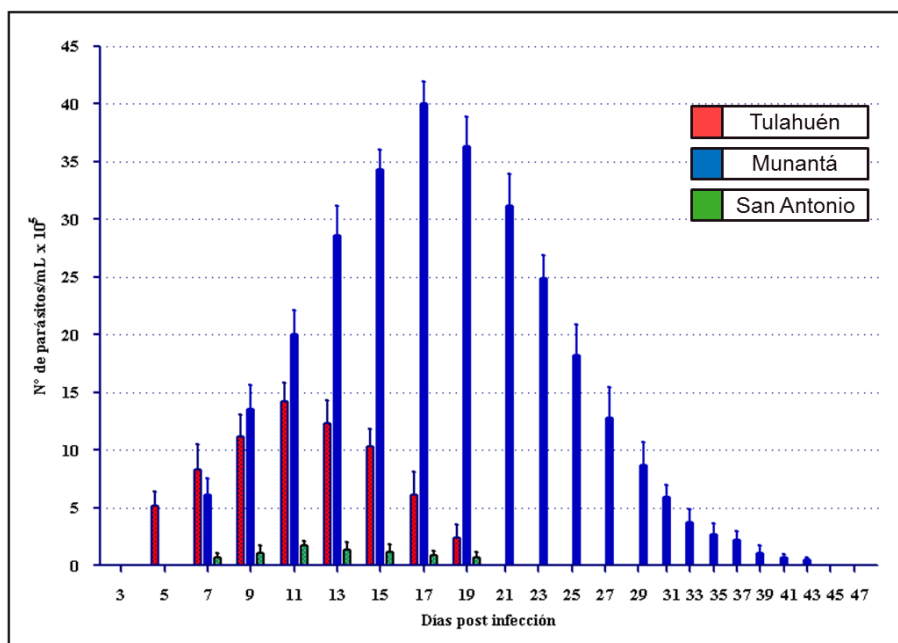


Figura 1.- Diferencias en la evolución de los niveles de parasitemia en ratones ACA infectados con 2.000 tripomastigotes sanguíneos de las cepas Tulahuén, Munantá y San Antonio de *T. cruzi*. El período de prepatencia sanguínea fue de 5 días para la cepa Tulahuén y de 7 días para las cepas Munantá y San Antonio. El nivel máximo de parasitemia ($40,06 \times 10^5 \pm 1,86 \times 10^5$ parásitos/mL), alcanzado por los ratones infectados con la cepa Munantá a los 17 días post infección, es significativamente más alto ($p < 0,001$), que el nivel máximo ($14,8 \times 10^5 \pm 2,21 \times 10^5$ parásitos/mL), alcanzado por los ratones infectados con la cepa Tulahuén a los 11 días post infección y que el nivel máximo de $1,73 \times 10^5 \pm 1,86 \times 10^4$ parásitos/mL alcanzado por la cepa San Antonio, a los 11 días post infección.

La Figura 2 muestra que los ratones infectados con la cepa San Antonio y los ratones infectados con la cepa Tulahuén presentaron un 100% de mortalidad acumulada a los 20 y 21 días p.i., respectivamente, mientras el grupo de ratones infectados con la cepa Munantá, presentó sólo un 20% de mortalidad en el mismo período y el 80% de estos los ratones infectados con la cepa Munantá sobrevivió más allá de los seis meses post infección.

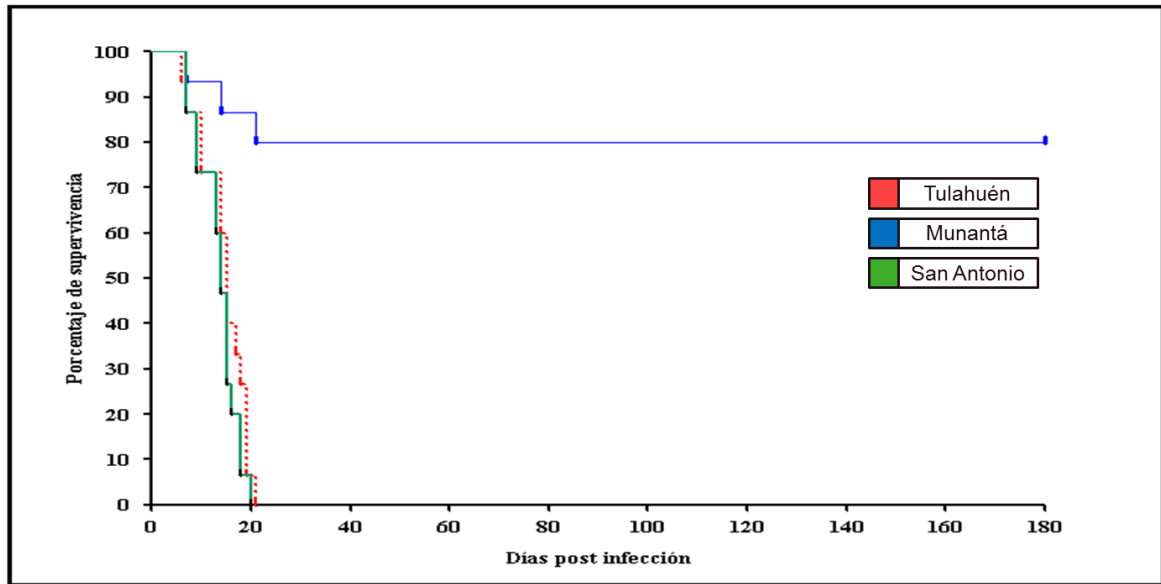


Figura 2.- Diferencias en los porcentajes de supervivencia acumulada en ratones ACA infectados con 2.000 tripomastigotes sanguíneos de las cepas Tulahuén, Munantá y San Antonio de *T. cruzi*. La diferencia en las curvas de supervivencia de estos grupos de ratones es altamente significativa ($p < 0,0002$). Los ratones infectados con la cepa San Antonio y los ratones infectados con la cepa Tulahuén alcanzaron 100% de mortalidad a los días 20 y 21 post infección, respectivamente, mientras el 80% de los ratones infectados con la cepa Munantá, sobrevivió más allá de los seis meses post infección.

Estudio Histopatológico.

Al día 7 post infección (Figura 3), el tejido cardiaco de los ratones infectados con la cepa Munantá presento leves cambios en relación al tejido de los ratones del grupo control no infectado, encontrándose signos de degeneración leve y difusa, procesos inflamatorios próximos al pericardio y escaso infiltrado mononuclear. Los ratones infectados con la cepa Tulahuén presentaron, en cambio, un fenómeno degenerativo focal diseminado, encontrándose focos de vacuolización y de necrosis, infiltrado inflamatorio difuso y neo vascularización. En el tejido cardiaco de los ratones infectados con la cepa San Antonio

se observó un fenómeno degenerativo severo diseminado con focos de necrosis, vacuolización extensa y presencia de infiltrado inflamatorio diseminado difuso.

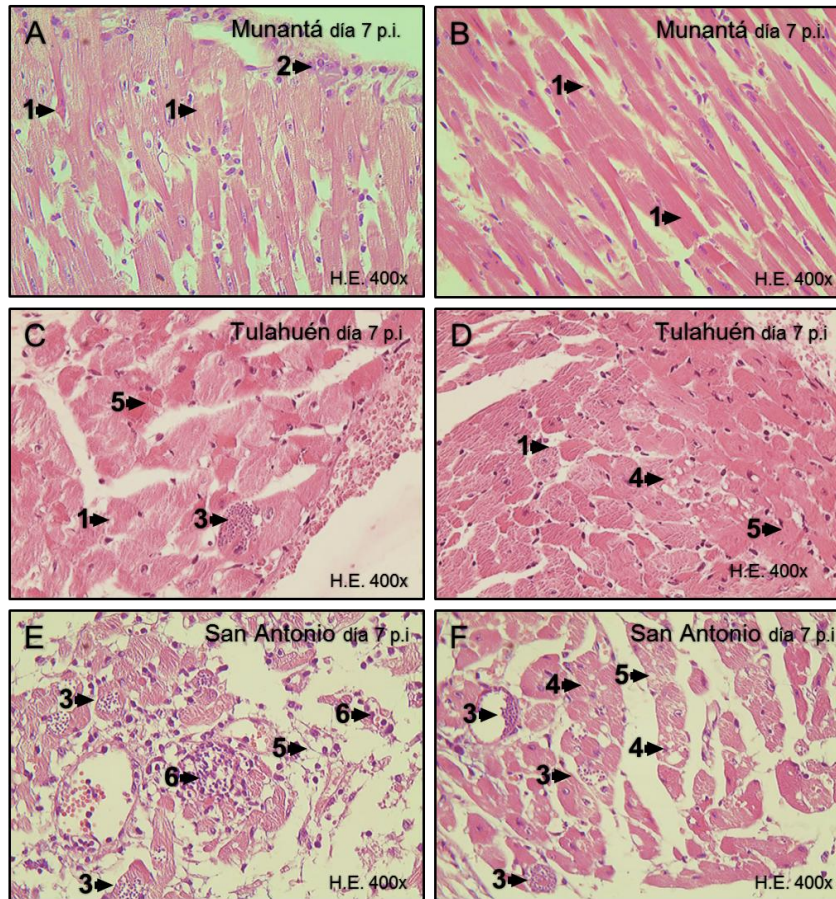


Figura 3.- Comparación del efecto inflamatorio de la infección con las cepas Munantá, Tulahuén y San Antonio de *T. cruzi* en el tejido cardiaco de ratones ACA al día siete post infección En el tejido infectado con la cepa Munantá (A, B) se observan leves procesos degenerativos (1) e inflamación en pericardio (2). En el tejido infectado con la cepa Tulahuén (C, D) se observan focos de degeneración (1), pericardio engrosado (3), focos de vacuolización (4) y necrosis (5). En el tejido infectado con la cepa San Antonio (E, F) se observa un mayor número de pseudoquistes (3), vacuolización diseminada (4), focos de necrosis (5) e infiltrado inflamatorio perivascular (6). Tinción HE, Aumento 400x.

Al día 14 p.i. (Figura 4) el tejido cardiaco de los ratones infectados con la cepa Munantá presento focos difusos de degeneración de Zenker acompañados de infiltrado mononuclear, mientras que el pericardio se encontró engrosado. El tejido cardiaco infectado con la cepa Tulahuén presentó un mayor infiltrado inflamatorio, focos de degeneración más extensos y focos de necrosis. En el tejido cardiaco de los ratones infectados con la cepa San Antonio se observaron focos de necrosis diseminados, extensos focos degenerativos, infiltrado inflamatorio mononuclear y pericarditis.

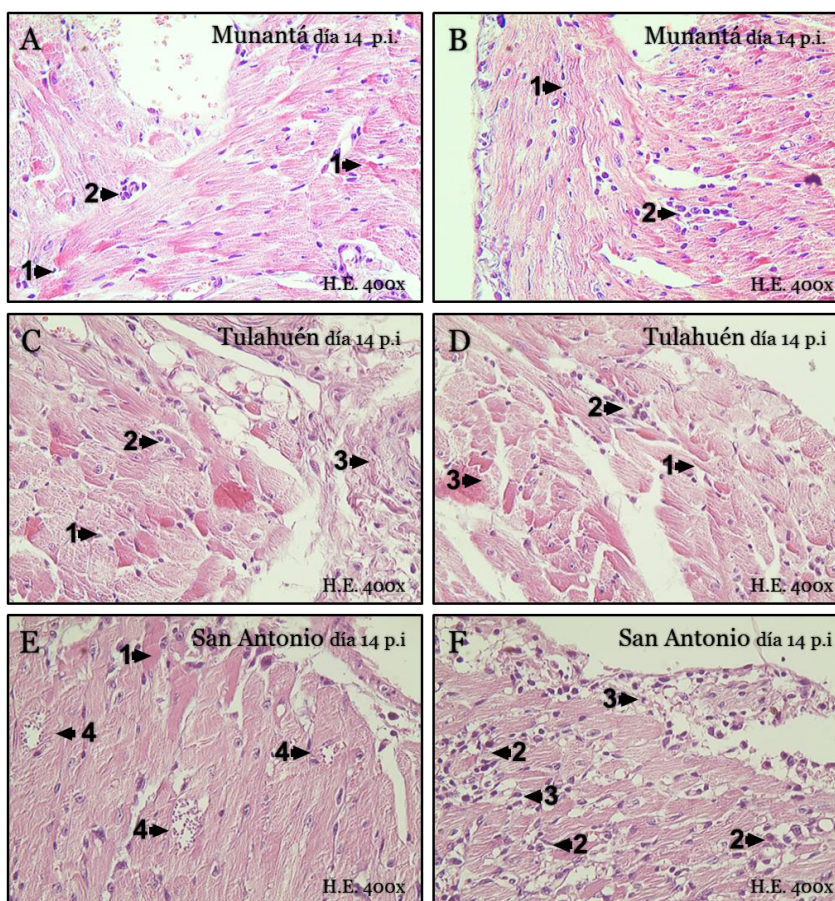


Figura 4.- Comparación del efecto inflamatorio de la infección con las cepas Munantá, Tulahuén y San Antonio de *T. cruzi* en el tejido cardiaco de ratones ACA al día catorce post infección En el tejido infectado con la cepa Munantá (A, B) se observan leves procesos degenerativos (1) e Infiltrado mononuclear (2). En el tejido infectado con la cepa Tulahuén (C, D) se observan focos de degeneración (1), un mayor número de focos de infiltrado mononuclear (2), y necrosis (3). En el tejido infectado con la cepa San Antonio(E, F) se observan focos de degeneración diseminada (1), un mayor número de focos de Infiltrado mononuclear (2), y necrosis focal diseminada (3) y Pseudoquistes (4).Tinción HE. Aumento 400X

Al día 21 p.i. (Figura 5) el tejido cardiaco de los ratones infectados con la cepa Munantá presento focos difusos de degeneración de Zenker, algunos focos necróticos, acompañados de infiltrado mononuclear y pericarditis, mientras el tejido cardiaco de los ratones infectados con la cepa Tulahuén o la San Antonio presentó numerosos focos de infiltrado inflamatorio mononuclear de gran tamaño, degeneración de Zenker y necrosis vacuolar difusa y focalizada en prácticamente la totalidad del tejido, además de neo vascularización y pericarditis. El tejido cardiaco de los ratones infectado con la cepa San Antonio, presentó además presentó focos de calcificación.

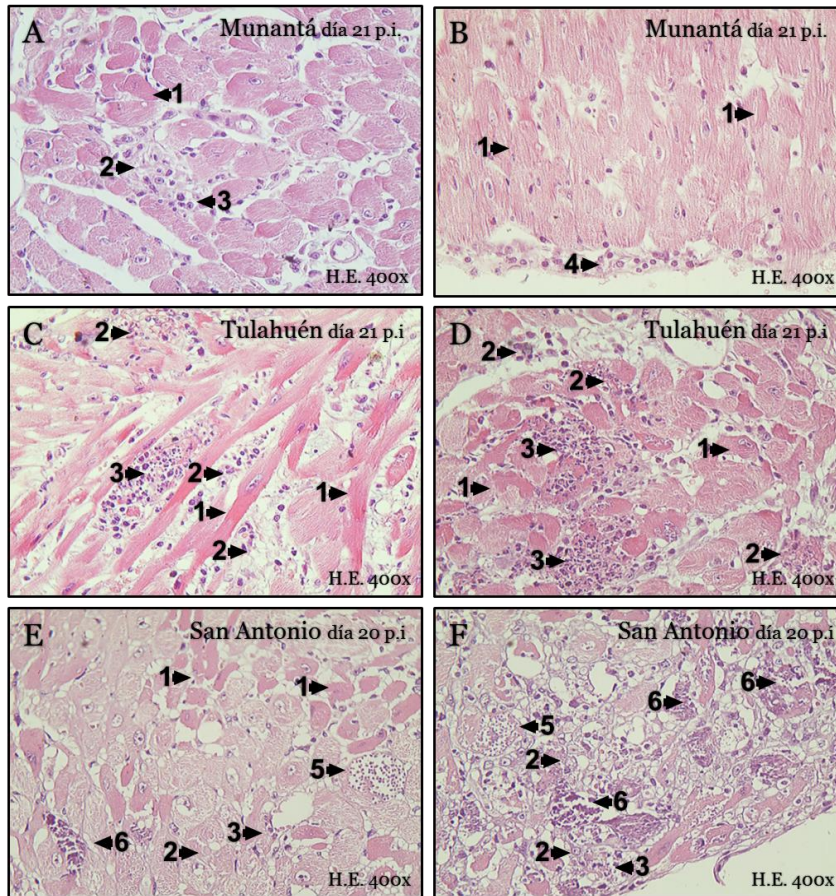


Figura 5.- Comparación del efecto inflamatorio de la infección con las cepas Munantá, Tulahuén y San Antonio de *T. cruzi* en el tejido cardiaco de ratones ACA al día veintiuno post infección. En el tejido infectado con la cepa Munantá se observan procesos degenerativos difusos (1), focos de necrosis (2), Infiltrado inflamatorio mononuclear perivascular (3) y pericarditis (4). En el tejido infectado con la cepa Tulahuén se observan focos de degeneración diseminados (1), un mayor número de focos de Infiltrado mononuclear, tanto perivascular como diseminado (2), y focos extensos de necrosis (3). En el tejido infectado con la cepa San Antonio se observan focos de degeneración diseminada (1), necrosis focal diseminada (2), focos extensos de Infiltrado mononuclear (3), un gran número de Pseudoquistes (5) y procesos de calcificación (6). Tinción HE. Aumento 400X

Recuento de pseudoquistes:

En la Figura 6 se muestra la evolución del número de pseudoquistes, como forma de expresión del desarrollo de infección en el tejido cardiaco de los ratones ACA infectados con 2.000 tripomastigotes sanguíneos de las cepas Munantá, Tulahuén y San Antonio de *T. cruzi*. El examen microscópico de 50 campos elegidos al azar en aumento 400x mostró que el número total de pseudoquistes fue siempre más elevado en los ratones infectados con la cepa San Antonio, que en los ratones infectados con las cepas Tulahuén y

Munantá durante el periodo de infección experimental. En los ratones infectados con la cepa Tulahuén se observó un incremento significativo en el número total de pseudoquistes al día 21 p.i., mientras en los ratones infectados con la cepa Munantá, sólo pudo observarse un único pseudoquiste en el total de 50 campos analizados a la tercera semana de la infección inicial con *T. cruzi*.

Como se muestra en la Figura 6, se observaron diferencias significativas en el número de pseudoquistes entre las cepas Tulahuén y Munantá al día 21 p.i. ($p < 0,001$), entre las cepas San Antonio y Tulahuén a los días 7 p.i. y 14 p.i. (ambos con $p < 0,01$) y entre las cepas San Antonio y Munantá a los días 7 p.i. ($p < 0,01$), 14 p.i. ($p < 0,01$) y 21 p.i. ($p < 0,001$).

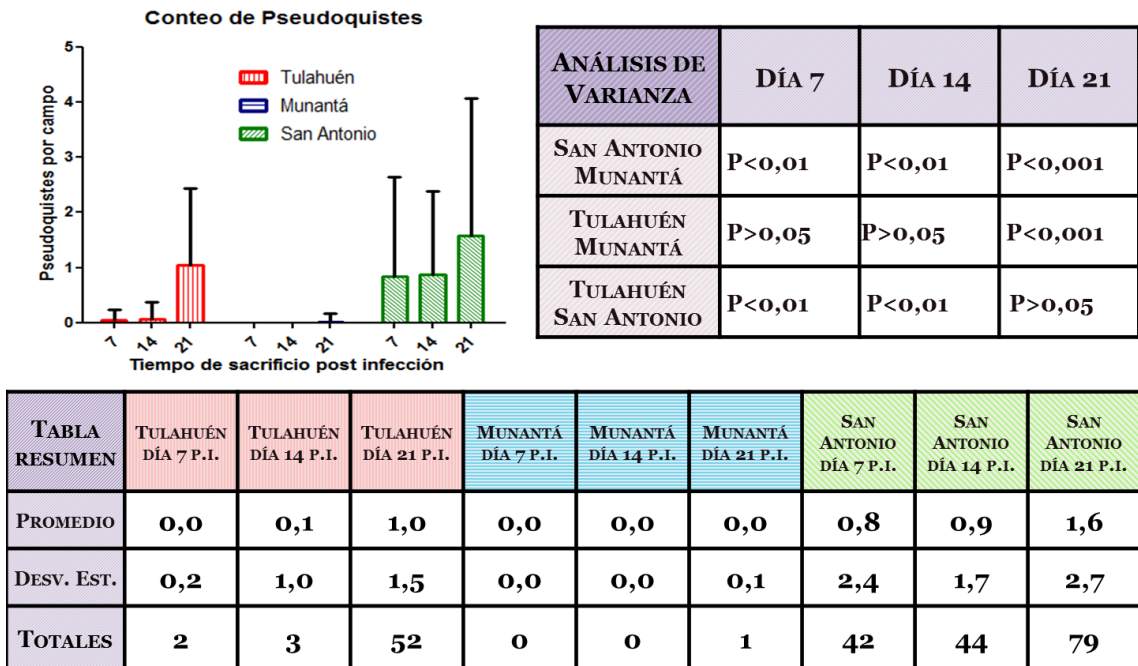


Figura 6.- Diferencias en la evolución del número de pseudoquistes en el tejido cardiaco de ratones ACA infectados con 2.000 tripomastigotes sanguíneos de las cepas Tulahuén, Munantá y San Antonio de *T. cruzi*. El gráfico muestra la media y desviación estándar del número de pseudoquistes por campo en el curso de la infección y, en la tabla resumen, se ha incluido el número total de pseudoquistes detectados en el total de 50 campos analizados en los días 7 p.i., 14 p.i. y 21 p.i. El análisis de varianza de los resultados (Media \pm DE) permitió establecer diferencias significativas en el número de pseudoquistes entre las cepas Tulahuén y Munantá al día 21 p.i. ($p < 0,001$), entre las cepas San Antonio y Tulahuén a los días 7 p.i. y 14 p.i. ($p < 0,01$) y entre las cepas San Antonio y Munantá a los 7 p.i., 14 p.i. y 21 p.i.

Infiltrado inflamatorio

En la Figura 7 se muestran los resultados obtenidos al comparar, al examen microscópico directo, la evolución del infiltrado inflamatorio en 50 campos elegidos al azar, en el tejido cardiaco de los ratones infectados con las cepas Munantá, Tulahuén y San Antonio, de *T. cruzi*.

Los ratones infectados con la cepa Munantá mostraron un escaso infiltrado inflamatorio en el curso de la infección y el análisis de varianza de los resultados permitió establecer la existencia de diferencias significativas en el infiltrado inflamatorio entre las cepas Tulahuén y Munantá a los días 7 p.i., 14 p.i. y 21 p.i., ($p < 0,0001$), entre las cepas Tulahuén y San Antonio al día 21 p.i. ($p < 0,01$) y entre las cepas Munantá y San Antonio a los días 7, 14 p.i. y 21 p.i. ($p < 0,001$).

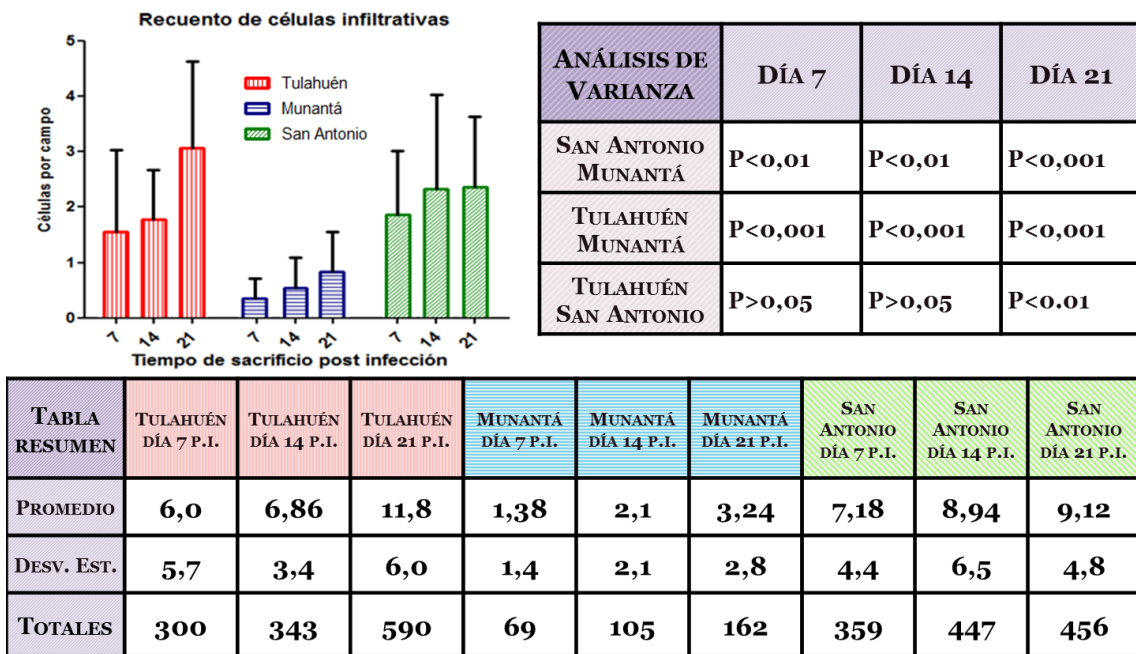


Figura 7.- Diferencias en la evolución del infiltrado inflamatorio mononuclear en el tejido cardiaco de ratones ACA infectados con 2.000 tripomastigotes sanguíneos de las cepas Munantá, Tulahuén y San Antonio de *T. cruzi*. Los ratones infectados con la cepa Munantá mostraron un leve infiltrado inflamatorio al día 7 p.i. y un moderado proceso inflamatorio al día 21 p. i. El análisis de varianza de los resultados permitió establecer la existencia de diferencias significativas en el infiltrado inflamatorio entre las cepas Tulahuén y Munantá a los días 7 p.i., 14 p.i. y 21 p.i., ($p < 0,0001$), entre las cepas Tulahuén y San Antonio al día 21 p.i. ($p < 0,01$) y entre las cepas Munantá y San Antonio a los días 7 p.i., 14 p.i. y 21 p.i. ($p < 0,001$).

DISCUSIÓN

En humanos, la Enfermedad de Chagas presenta una evolución clínica variable que incluye desde individuos asintomáticos de por vida, hasta pacientes que desarrollan una enfermedad crónica severa y potencialmente mortal, con daño nervioso, cardiovascular y/o gastrointestinal en la fase crónica de la infección. Los factores que determinan esta diversidad en las manifestaciones clínicas de la enfermedad no han sido claramente establecidos, pero se ha sugerido que tanto la presencia y la variabilidad genético-biológica del parásito (Rassi y Marin 2010, Ribeiro Machado y Dias da Silva, 2012), como el repertorio genético y los distintos mecanismos efectores de respuesta inmune del hospedero están involucrados en la patogénesis de la enfermedad (Gironès y Fresno 2003, Macedo *et al.*, 2004).

Tanto los resultados de supervivencia (Figura 2) como el análisis histopatológico (Figuras 3, 4 y 5) realizados en el presente trabajo permiten observar que los ratones ACA son altamente susceptibles a la infección con la cepa San Antonio de *T. cruzi*, puesto que la muerte de los animales ocurrió dentro de los primeros 21 días post infección, de manera similar a lo ocurrido con la cepa Tulahuén que, como se ha descrito anteriormente, presenta una alta letalidad para estos ratones (Zúñiga *et al.*, 2007). Sin embargo, los niveles de parasitemia y la severidad de daño cardíaco fueron distintos dependiendo de la cepa de *T. cruzi* utilizada en la infección experimental. Así, los ratones infectados con la cepa San Antonio, a pesar de presentar un escaso número de parásitos libres en circulación (Figura 1), desarrollaron una severa enfermedad inflamatoria a partir de la primera semana de infección, con un número significativamente más alto de pseudoquistes ($p < 0,01$), y acompañado de necrosis y severa degeneración tisular diseminada (Figuras 3, 4 y 5).

Los resultados aquí presentados permiten entonces, confirmar que, como se ha sugerido, el parasitismo intracelular y el daño tisular producido por el infiltrado inflamatorio mononuclear que acompaña a la infección dependen no sólo del repertorio genético del hospedero sino que también de las características biológicas del aislado o cepa del parásito utilizado en el periodo de infección experimental (Albuquerque *et al.*, 2008; Zúñiga *et al.*, 2007).

Por otro lado la persistencia del parásito en sangre, pese a ser necesaria, no es estrictamente suficiente para producir la enfermedad, puesto que en el caso de los ratones infectados con la cepa Munantá mostraron un escaso número de pseudoquistes

en el tejido cardíaco, acompañado de miocarditis y pericarditis leve con sólo un 25% de mortalidad, en el curso de la infección, a pesar de presentar niveles de parasitemia significativamente más elevados ($p < 0,001$) que los niveles alcanzados por los ratones infectados con la cepa Tulahuén o la cepa San Antonio de *T. cruzi*, en los cuales, a pesar de incluso presentar una disminución temprana en su parasitemia, está se asoció a un aumento progresivo del daño producido en el tejido cardíaco.

CONCLUSIÓN

Finalmente, la contribución más relevante del presente trabajo es la descripción del daño inflamatorio producido en el tejido cardíaco por la infección cepa San Antonio de *T. cruzi*, en el que han podido identificarse lesiones semejantes a las encontradas en la infección con la cepa Tulahuén, que ha sido descrita como altamente patogénica (Kagan y Norman, 1960, Knubel *et al.*, 2011).

Es importante además destacar que los resultados de daño inflamatorio aquí observados en el tejido cardíaco, pueden ser distintos en otros órganos o tejidos de los ratones infectado con las cepas Tulahuén, San Antonio y Munantá, debido al distinto tropismo celular que presentan las diferentes cepas o aislados de *T. cruzi* (Pereira y Navarro, 2013, Rodrigues *et al.*, 2013, Vizcaíno-Castillo *et al.*, 2014).

De esta manera, el estudio de otros tejidos y el uso de técnicas diagnósticas más específicas, como la tinción inmunohistoquímica, permitirán caracterizar las poblaciones leucocitarias involucradas tanto en el daño tisular producido por las cepas Tulahuén y San Antonio, como en la eventual respuesta inmune protectora que se produciría en los ratones ACA, infectados con la cepa Munantá de *Trypanosoma cruzi*.

BIBLIOGRAFÍA

ANDRADE, L. O.; MACHADO, C. R.; CHIARI, E.; PENA, S. D.; MACEDO, A. M. 2002. *Trypanosoma cruzi*: role of the host genetic background in the differential tissue distribution of parasite clonal populations. *Exp. Parasitol.* 100: 269-275

APT, W.; HERNÁNDEZ, E.; JERSIC, M.; MUÑOZ, P.; HAUCK, I.; OLEA, A.; RIVERA, M.; TORRES, M.; ZULANTAY, I. 2001. Guía de diagnóstico, tratamiento y prevención de la Enfermedad de Chagas. Ministerio de Salud, Gobierno de Chile. 2-35

ARENAS, M.; CAMPOS, R.; CORONADO, X.; ORTIZ, S.; SOLARI, A. 2012. *Trypanosoma cruzi* Genotypes of Insect Vectors and Patients with Chagas of Chile Studied by Means of Cytochrome b Gene Sequencing, Minicircle Hybridization, and Nuclear Gene Polymorphisms. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2012 Mar; 12(3): 196–205.

CUNHA-NETO, E.; BILATE, A.; HYLAND, K.; FONSECA, S.; KALIL, J.; ENGMAN, D. 2006. Induction of cardiac autoimmunity in Chagas heart disease: A case for molecular mimicry. *Autoimmunity* 39: 41–54

FERREIRA, M.; SILISTINO, R.; VARELA, M.; TERCILIA, M.; SILVA, A. 2012. Biologic and genetic aspects of Chagas disease at endemic areas *J. Trop. Med* Vol 2012: 11p

GIRONÈS, N.; FRESNO, M. 2003. Etiology of Chagas disease myocarditis: autoimmunity, parasite persistence, or both?. *Trends Immunol.* 19: 19-22.

GIRONÈS, N.; CUERVO, H.; FRESNO, M. 2005. *Trypanosoma cruzi*-Induced Molecular Mimicry and Chagas' Disease. 296:89–123

GUHL, F.; CURA, C.; SCHIJMAN, A.; KELLY, J.; ORNELAS, W.; TARLETON, R. 2013. *Trypanosoma cruzi* del genotipo a la clínica. IX Taller sobre la Enfermedad de Chagas. Barcelona *Rev. Esp. Salud Pública* pp. 1-74

HIGUERA, S.; GUHL, F.; RAMÍREZ, J. 2013. Identification of *Trypanosoma cruzi* Discrete Typing Units (DTUs) through the implementation of a High-Resolution Melting (HRM) genotyping assay. *Parasites & Vectors* 2013, 6:112

JERCIC, M; GONZÁLEZ, C.; OYARCE, A.; CANCINO, B.; MAC-LEAN, M. 2012. La Enfermedad de Chagas en Chile: componente vectorial y serología en menores de 5 años durante el periodo 2005-2010. Sección Parasitología, Departamento de laboratorio Biomédico. *ISPCh. El Vigía* 13: 7

- KAGAN, I.G.; NORMAN, L.** 1960. Immunologic studies on *Trypanosoma cruzi*. I. Susceptibility of CFW stock mice for the "Tulahuen" strain of *T. cruzi*. J Infect Dis. 107:165-167.
- KAPLAN, E.; MEIER, P.** 1958. Non parametric estimation incomplete observations. J. Am. Stat. Assoc. 53: 457-481.
- KIERSZEMBAUM, F.** 2005. Where do we stand on the autoimmunity hypothesis of Chagas disease?. Trends Parasitol. 21: 513-516
- KOWALSKA, A.; KOWALSKI, P.; TORRES, M.** 2011. Chagas disease – American trypanosomiasis. Pol. Ann. Med. 18: 156-167.
- KNUBEL, C.; MARTÍNEZ, F. F.; ACOSTA RODRÍGUEZ, E. V.; ALTAMIRANO, A.; RIVAROLA, H. W.; DIAZ LUJÁN, C.; FRETES, R. E.; CERVI, L.; MOTRÁN, C. C.** 2011. 3-Hydroxy kynurenine treatment controls *T. cruzi* replication and the inflammatory pathology preventing the clinical symptoms of chronic Chagas disease. PLoSOne. 6: 10
- MACEDO, A. M.; MACHADO, C. R.; OLIVEIRA, R. P.; PENA, S.D.J.** 2004. *Trypanosoma cruzi*: Genetic Structure of Populations and Relevance of Genetic Variability to the Pathogenesis of Chagas Disease. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 99: 1-12.
- MINSAL. MINISTERIO DE SALUD, CHILE.** 2011. Circular de vigilancia de enfermedad de Chagas. [En Línea] <[Http://epi.minsal.cl/epi/html/normas/circul/Circular-Chagas.pdf](http://epi.minsal.cl/epi/html/normas/circul/Circular-Chagas.pdf).> [Consulta: 15/2/2015]
- MOREIRA, O.; RAMIREZ, J.; VELÁSQUEZ, E.; DIAS, M.; LIMA, C.; GUHL, F.; SOSA, S.; MARIN, J.; MORILLOH, C.; BRITO, C.** 2013. Towards the establishment of a consensus real-time PCR to monitor *Trypanosoma cruzi* parasitemia in patients with chronic Chagas disease cardiomyopathy: A substudy from the BENEFIT trial. Acta Tropica 125: 23-31.
- ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD, OMS.** 2013. La enfermedad de Chagas (trypanosomiasis americana). [En Línea] <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/es/>> [Consulta: 15/4/2014]
- PALÁU, M. T.; MEJÍA, A. J.; VERGARA, U.; ZÚÑIGA, C.** 2003. Action of *Trypanosoma rangeli* in infections with virulent *Trypanosoma cruzi* populations. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 98: 543-548

- PEREIRA, P.; NAVARRO, E.** 2013. Challenges and perspectives of Chagas disease: a review. *J Venom Anim Toxins Incl. Trop. Dis.* 19:34.
- PIZZI, T. P.** 1957. *Inmunología de la Enfermedad de Chagas.* Ed. Universidad de Chile. Santiago. pp. 18-19.
- RASSI, A.; MARIN, J. A.** 2010. Chagas disease. *The Lancet* 375: 1388 – 1402.
- RASSI, A. Jr; RASSI, A.; MARCONDES, J.** 2012. Clinical phases and forms of Chagas disease. *Intect. Dis. Clin. North Am.* 26: 275-291
- RIBEIRO MACHADO, M. C.; DIAS DA SILVA, V. J.** 2012. Autonomic neuroimmunomodulation in chagasic cardiomyopathy. *Exp. Physiol.* 97: 1151- 1160.
- RODRIGUES, V.; DA SILVA, D.; SOUSA, K.; CUNHA, W.R.; SARAIVA, J.; KENUPP, J.; ANDRADE, M.; ALBUQUERQUE, S.** 2013. *In vivo* infection by *Trypanosoma cruzi*: a morphometric study of tissue change in mice. *Parasitol Res.* 112: 431-436.
- RODRÍGUEZ, P.; ESCALANTE, M.; DÍEZ, H.; CUERVO, C.; MONTILLA, M.; NICHOLLS, R.; ZARANTE, I.; PUERTA, C.** 2002. Estudio de la variabilidad de seis cepas colombianas de *Trypanosoma cruzi* mediante polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) y amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD). *Biomédica;* 22:263-71
- TANOWITZ, H.; MACHADO, F.; JELICKS, L.; SHIRANI, J.; CAMPOS DE CARVALHO, A.; SPRAY, D.; FACTOR, S.; KIRCHHOFF, L.; WEISS, L.** 2009. Perspectives on *Trypanosoma cruzi* induced heart disease (Chagas disease). *ProgCardiovascDis.* 51: 524-539
- TEIXEIRA, A.; HECHT, M.; GUIMARO, M.; SOUSA, A.; NITZ, N.** 2011. Pathogenesis of Chagas' Disease: Parasite Persistence and Autoimmunity. *ClinMicrobiol Rev.* 24: 592-630
- TOSO, A.; VIAL, F.; GALANTI, N.** 2011. Transmisión de la Enfermedad de Chagas por vía oral. *Rev. Med. Chile.* 139: 258-266.
- VIZCAÍNO-CASTILLO, A; JIMÉNEZ-MARÍN, A; ESPINOZA, B.** 2014. Exacerbated Skeletal Muscle Inflammation and Calcification in the Acute Phase of Infection by Mexican *Trypanosoma cruzi* DTUI Strain. *BioMed Research International.* 2014: 1-12

WRIGHTSMAN, R.; KRASSNER, S.; WATSON, J. 1982. Genetic control of response to *Trypanosoma cruzi* in mice: multiple genes influencing parasitemia and survival. *Infect. Immun.* 36: 637-644.

ZINGALES, B.; ANDRADE, S.G.; BRIONES, M.R.; CAMPBELL, D.A.; CHIARI, E.; FERNANDES, O.; GUHL, F.; LAGES-SILVA, E.; MACEDO, A.M.; MACHADO, C.R.; MILES, M.A.; ROMANHA, A.J.; STURM, N.R.; TIBAYRENC, M.; SCHIJMAN, A.G. 2009. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 104:1051-1054.

ZUÑIGA, C.; VARGAS, R.; VERGARA, U. 2002. Evolution of *Trypanosoma cruzi* infection in resistant and susceptible mice. *Arch. Med. Vet.* XXXIV, Nº 2: 183-188

ZUÑIGA, C.; CEPEDA, R.; PALAU, M.T.; VERA, A.; MEJIA, J.; VERGARA, U. 2007. Efecto protector de una cepa no virulenta contra la infección con una cepa virulenta de *Trypanosoma cruzi* en un modelo murino. *Arch. Med. Vet.* 39:77-82.

ZUÑIGA, C.; BINDER, N.; PALÁU, M.T.; LARENAS, J.; VERGARA, U. 2012. Edad del hospedero en la evolución de la infección experimental con *Trypanosoma cruzi* en un modelo murino. *Rev. Ibero-Latinoam. Parasitol.* 71: 23-33