



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**DETERMINACIÓN DE LA PARASITEMIA Y
ALTERACIONES HISTOPATOLÓGICAS EN
MIOCARDIO DE RATONES INFECTADOS CON
*Trypanosoma cruzi***

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
BIÓLOGA**

**P R E S E N T A:
JULIETA LAVÍN SAMPER**



**DIRECTORA DE TESIS:
M. en C. MARIANA CITLALLI DE ALBA
ALVARADO**

Ciudad Universitaria, CD. MX., 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Biología de Parásitos de la Facultad de Medicina de la UNAM con el apoyo financiero parcial de la Facultad de Medicina y de DGAPA-PAPIIT, proyectos IN-227816 “Estudio clínico y cardiológico en niños seropositivos a *Trypanosoma cruzi* en dos poblaciones rurales del estado de Chiapas, México”, IT-200913 “Validación de métodos para la confirmación del diagnóstico de la infección de *T. cruzi* mediante el uso de marcadores biológicos específicos”.

ABREVIATURAS

dpi – días post infección

ITRI/MX/1986/QRO – Aislado obtenido de *Triatoma barberi*, proveniente del estado de Querétaro

T. barberi – *Triatoma barberi*, vector

T. cruzi – *Trypanosoma cruzi*, parásito

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, Laura Samper y Sergio Lavín, por su apoyo y amor incondicional y por guiarme, acompañarme y motivarme no sólo durante este largo proceso, sino durante toda la vida.

A mi hermano, Matías Lavín, porque aunque estemos lejos, nos tenemos siempre el uno al otro y por ser un ejemplo a seguir a lo largo de los años.

A Majo, por hacer de la carrera la mejor de las experiencias, por compartir conmigo tanta risa y por luchar juntas en los malos momentos.

A Ricardo, por motivarme y llenarme de amor y paciencia en esta última etapa.

A mis roomies: Julia, Alex y Pavel, por hacerme reír en los malos momentos y por la amistad y el ambiente tan padre.

A mis amigos: Gabbs, Lisa, Marlon, Chucho, Chris, Yorch, a los de escalada, a los del suizo, etc., por estar presentes en mi vida y hacer de mis días algo mejor.

A mis profesores: Noé, Paco, Erick, Aquiles y Nancy, por formarme y darme semestres de tanto aprendizaje y diversión.

A todo el personal del laboratorio de Biología de Parásitos de la Facultad de Medicina, UNAM, por el apoyo brindado en las diferentes áreas y por el sano ambiente laboral.

AGRADECIMIENTOS TÉCNICOS

A la Dra. Paz María Salazar Schettino, por brindarme el espacio y la oportunidad de desarrollar este trabajo y por todo el apoyo brindado y el conocimiento en todos los aspectos de la parasitología, así como por sus valiosas aportaciones en todos los aspectos de la enfermedad de Chagas, además de su constante asesoría a todos los estudiantes.

A la M. en C. Mariana Citlalli De Alba Alvarado, por el diseño del protocolo y el desarrollo del presente trabajo bajo su dirección, por la asesoría en las técnicas empleadas y su apoyo y conocimiento brindado a lo largo de la realización de esta tesis.

A la Dra. Martha Bucio Torres, por todo el apoyo y el tiempo dedicado a mi formación académica y profesional, por las críticas referentes al trabajo, recomendaciones y revisión en la realización de este trabajo.

Al Dr. Enrique Sampedro, por su apoyo incondicional en el desarrollo de este proyecto, especialmente en el análisis histopatológico de las muestras, así como por todo el aprendizaje brindado y sus invaluable consejos.

A la Dra. Margarita Cabrera Bravo, por el conocimiento transmitido y por sus invaluable contribuciones en la crítica, revisión y desarrollo de este proyecto.

A la M. en C. Isabel Cristina Cañeda Guzmán, por las invaluable revisiones y aportaciones para la realización de este trabajo.

A la Técnico Académico Asociado A tiempo completo, Raquel Guerrero Alquicira, por la realización de los cortes histológicos.

A la M. en C. Elia Torres Gutiérrez, por todo el apoyo en las diferentes técnicas serológicas.

A Mariana Lizeth López Hernández por el apoyo en la inoculación del ratón.

A la M. en C. Yolanda Guevara, por el mantenimiento de los aislados en el laboratorio.

A la MC Teresa Uribarren Berrueta, por el apoyo en la corrección del manuscrito.

Al Biól. Mauro Omar Vences Blanco, por el mantenimiento de los aislados de *T. cruzi* en ratón.

A Rosalía Sánchez Fuentes, por el apoyo en la realización de curvas de parasitemia.

A la técnico laboratorista Evangelina Anaya Gil, por la preparación de los reactivos utilizados en este trabajo y el mantenimiento del material y equipo de laboratorio.

ÍNDICE

1. RESUMEN.....	1
2. INTRODUCCIÓN	2
3. MARCO TEÓRICO.....	3
3.1 Antecedentes en México	3
3.2 Biología del parásito.....	3
3.2.1 Ubicación Taxonómica	4
3.2.2 Morfología.....	4
3.2.3 Ciclo de vida.....	5
3.3 Mecanismos de transmisión	7
3.4 Epidemiología	7
3.5 Distribución.....	8
3.6 Cuadro clínico	9
3.7 Diagnóstico	9
3.7.1 Métodos parasitológicos.....	9
3.7.2 Métodos inmunológicos	10
3.8 Patogenia y patología	11
3.8.1 Infiltrado en la miocarditis chagásica.....	14
3.8.2 Fibrosis en la enfermedad de Chagas	14
3.8.3 El modelo murino en la enfermedad de Chagas.....	16
4. JUSTIFICACIÓN	17
5. HIPÓTESIS	18
6. OBJETIVOS	19
6.1 Objetivo general	19
6.2 Objetivos particulares.....	19
7. METODOLOGÍA	20
7.1 Aislado de <i>Trypanosoma cruzi</i>	20
7.2 Modelo animal	20
7.3 Estandarización de la infección por <i>T. cruzi</i>	20
7.3.1 Estandarización del inóculo	20
7.3.2 Infección en modelo murino	21
7.4 Determinación de curvas de parasitemia.....	21

7.5 Registro de signos clínicos.....	21
7.6 Procesamiento de corazón.....	21
7.6.1 Eutanasia	21
7.6.2 Extracción de corazón	22
7.6.3 Procesamiento histológico.....	22
7.7 Análisis histopatológico	22
7.7.1 Tinción con Hematoxilina-Eosina (H.E.).....	22
7.7.1 Microfotografías.....	23
7.8 Gráficos	23
7.9 Análisis estadísticos	24
8. RESULTADOS.....	25
8.1 Estandarización de la infección por <i>T. cruzi</i>	25
8.2 Determinación de curvas de parasitemia.....	27
8.3 Análisis histopatológico	28
8.3.1 Microfotografías de la lesión en miocardio a diferentes tiempos de infección	29
8.3.2 Células del infiltrado	36
8.3.3 Conteo con cuadrícula a diferentes tiempos de infección	37
8.3.4 Prevalencia de nidos de amastigotes	40
8.3.5 Prevalencia de infiltrado linfocitario y mixto.....	42
8.3.6 Prevalencia de lesiones fibróticas incipientes	44
8.3.7 Gráficos de correlación	45
8.4 Análisis estadísticos	51
9. DISCUSIÓN	53
10. CONCLUSIONES	58
11. PERSPECTIVAS	59
12. REFERENCIAS.....	60
13. ANEXOS.....	65

1. RESUMEN

Trypanosoma cruzi es un parásito con diversos tropismos a nivel tisular. ITRI/MX/1986/QRO es una cepa de Querétaro aislada de *Triatoma barberi*, conocida por su alta virulencia y cardiotropismo. En tejido, las alteraciones histopatológicas se deben a la reproducción del parásito; la presencia y progresión de las lesiones tisulares no han sido descritas durante la evolución de la fase aguda. En este estudio, se evalúa la correlación entre la presencia de nidos de amastigotes y la presencia y características del infiltrado inflamatorio durante la fase aguda. La metodología consistió en la estandarización del inóculo para lograr sobrevivida mayor a 30 días; a partir del momento en que se inocularon los ratones, se tomaron cada 72 horas muestras sanguíneas y de corazón para cuantificar parasitemia circulante, presencia de nidos de amastigotes y realizar el análisis histopatológico con las tinciones de H.E. y Masson. El inicio de la parasitemia fue a los 18 días, y el final de la fase *log* de crecimiento en promedio se presentó a los 33 días hasta el día 47, en que ya no se observaron parásitos. Los nidos de amastigotes se observaron a partir del día 15 y persistieron hasta el día 50, con mayor prevalencia al día 30. El análisis histopatológico a partir del día 8 mostró infiltrado principalmente linfocitario predominante en miocardio con lesiones fibróticas incipientes que persistieron hasta el día 50. En el análisis estadístico se encontró una correlación positiva y fuerte entre la parasitemia y el número de nidos de amastigotes ($r^2=0.93$, $P=0.0001$); también se encontró correlación positiva entre la presencia de lesiones fibróticas incipientes e infiltrado ($r^2=0.55$, $P=0.0358$) y correlación positiva y débil entre la presencia de lesiones fibróticas incipientes y los nidos de amastigotes ($r^2=0.886$, $P=0.0001$). Se concluye que la fase aguda tiene una duración de 57 días en este modelo. Se observaron lesiones fibróticas incipientes desde la fase aguda como un mecanismo constante. Con base en los resultados de este trabajo, se propone que las lesiones fibróticas incipientes, generadas principalmente por la presencia de nidos de amastigotes e infiltrado, pueden ser marcadores de daño precoz en la evolución natural de esta cardiopatía antes de establecerse la lesión crónica característica de la enfermedad.

2. INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas, también conocida como tripanosomiasis americana, es causada por el protozoo flagelado *Trypanosoma cruzi*, que afecta a diferentes mamíferos y tiene como vector a los insectos triatomíneos. En humanos, tiene tropismo hacia distintos órganos y sistemas, principalmente el corazón y aparato digestivo.

El parásito fue descubierto en 1909 en Minas Gerais, Brasil, por el médico e investigador Carlos Chagas, quien trabajaba en el control de la malaria. Posteriormente, aisló al parásito del transmisor *Panstrongylus megistus* e infectó animales como monos, cobayos, conejos, entre otros, lo cual le permitió describir con más detalle el ciclo biológico, así como la patología, clínica y epidemiología de la enfermedad (Chagas, 1909). Inicialmente, el Dr. Chagas nombró al parásito *Schyzotripanum cruzi*, ya que pensó que el parásito se reproducía por esquizogonia, igual que el agente etiológico del paludismo y, posteriormente, se cambió el nombre a *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909).

Actualmente, la enfermedad de Chagas es considerada una enfermedad fuertemente vinculada a condiciones de pobreza y pertenece al programa de la Organización Mundial de la Salud (OMS) de enfermedades tropicales desatendidas (OMS, 2014).

3. MARCO TEÓRICO

3.1 Antecedentes en México

En México, los dos primeros casos humanos reportados de la enfermedad de Chagas en fase aguda, al igual que los dos primeros vertebrados infectados conocidos, se describieron en el Estado de Oaxaca, en 1940 (Mazzotti, 1940). Desde ese momento hasta 1961, sólo se conocían seis casos humanos comprobados parasitológicamente, e investigadores como Biagi, Tay y posteriormente Salazar-Schettino realizaron estudios sobre la epidemiología de la enfermedad en diversas regiones de México. Hasta 1977 se reportaron 133 casos más, con un total de 139 casos (Tay et al, 1979). En 1979, Salazar-Schettino y colaboradores reportaron el tercer caso de miocardiopatía chagásica en México y el primero comprobado parasitológicamente en un paciente vivo, debido a que los dos casos anteriores habían sido reportados por Biagi y Arce (1965) en diagnósticos *post-mortem*. Posteriormente, se reportó el primer caso de megaesófago con serología positiva (Salazar-Schettino et al, 1984) y el primero de megacolon (Tay et al, 1986). En 1989, Salazar-Schettino y colaboradores reportaron también el primer caso de transmisión por transfusión sanguínea. Desde entonces, se han realizado diversos estudios sobre los vectores y los reservorios de la enfermedad de Chagas en México.

3.2 Biología del parásito

Trypanosoma cruzi es un organismo parásito, eucariota y unicelular que pertenece al orden Kinetoplastida, por lo que comparte algunas características con otros miembros de dicho orden, como una mitocondria única y el cinetoplasto; uno de los rasgos más característicos es esta acumulación de DNA notable ubicada dentro de la mitocondria (Tyler y Miles, 2003).

3.2.1 Ubicación Taxonómica

De acuerdo con el Sistema de Información Taxonómica Integral (ITIS), *T. cruzi* se clasifica de la siguiente forma:

Superreino: Eukarya

Reino: Protozoa

Infrarreino: Euglenozoa

Phylum: Euglenozoa

Clase: Kinetoplastida

Orden: Trypanosomatida

Familia: Trypanosomatidae

Género: *Trypanosoma*

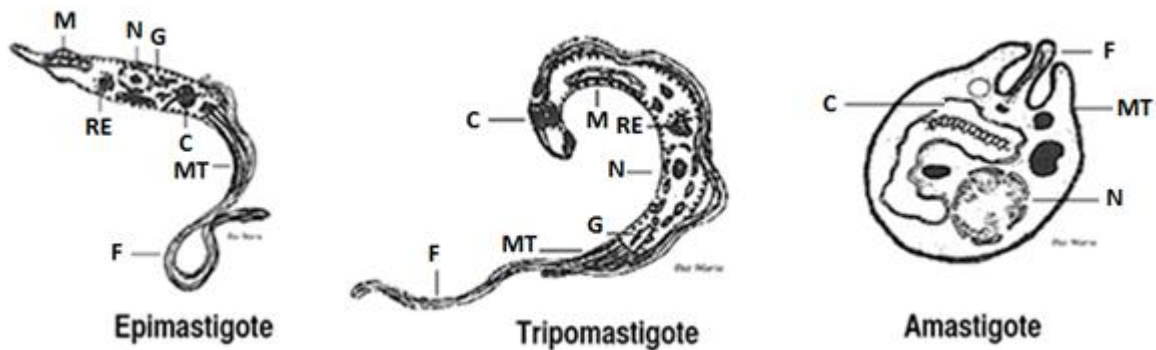
Especie: *T. cruzi* (Chagas, 1909)

3.2.2 Morfología

La morfología de *T. cruzi* cambia según las fases del ciclo de vida. Se describen tres fases principales, que son epimastigote, tripomastigote (con las formas metacíclico y sanguíneo) y amastigote. La primera está presente en el intestino medio del vector o en medios de cultivo. Los tripomastigotes metacíclicos están en el ámpula rectal del vector y son la forma infectante en el ciclo natural o rural, mientras que los tripomastigotes sanguíneos se encuentran en el hospedero mamífero y son la forma infectante durante la fase aguda por medio de transfusión o trasplante de órganos y otros tejidos. Los amastigotes son la fase replicativa intracelular y están en el hospedero mamífero, parasitando cualquier célula nucleada con tropismo por miocardio y músculo liso.

- Epimastigote. Es de aspecto alargado y fusiforme y mide entre 20 y 25 μm de longitud. El cinetoplasto está ubicado cercano al núcleo, en la región anterior. El flagelo forma una membrana ondulante característica. Ésta es la forma replicativa, no infectiva, localizada en el intestino medio del vector y la fase que se replica en los medios de cultivo preparados en laboratorio.

- Amastigote. Esta forma es aflagelar, redondeado y mide de 2 a 4 μm de largo. El núcleo es de gran tamaño. Con tinción Giemsa el cinetoplasto se observa como un bastoncillo azul intenso o violeta junto al núcleo, que presenta un color rojo.
- Tripomastigote metacíclico. Es de forma alargada y mide entre 18 y 21 μm de largo. Tiene un núcleo vesiculoso y un flagelo, el cual se origina en el cinetoplasto y es continuo con la membrana ondulante. El cinetoplasto en esta fase es generalmente de forma esférica y se localiza hacia la parte posterior del núcleo.
- Tripomastigote sanguíneo. Esta fase es morfológicamente similar al tripomastigote metacíclico y es la que se encuentra en la sangre del hospedero. Mide entre 18 y 21 μm de largo y es producto de la diferenciación del amastigote.



(Salazar-Schettino et al, 2011).

Figura 1: Principales estadios de *Trypanosoma cruzi*. C – cinetoplasto, M – mitocondria, RE – retículo endoplásmico, N – núcleo, G – aparato de Golgi, MT – microtúbulos, F – flagelo. Cortesía: Dra. Paz María Salazar-Schettino.

3.2.3 Ciclo de vida

En el ciclo biológico natural de *T. cruzi* participan el insecto triatomino (transmisor o vector) y diversos mamíferos, incluyendo el humano, algunos de éstos actúan como reservorios importantes en la epidemiología según la región (perro, tlacuache, ardilla, gato, zorro, entre otros). El triatomino infectado pica al mamífero para ingerir sangre y deyecta cerca de la picadura, liberando al parásito en su fase de tripomastigote metacíclico (fase infectante). Éstos entran al hospedero ya sea por el sitio de la picadura o a través de

membranas mucosas localizadas cerca de la misma. Dentro del hospedero, *T. cruzi* invade las células y se transforma en la fase de amastigote intracelular, la cual se multiplica por fisión binaria longitudinal y se diferencia en tripomastigotes sanguíneos, que lisan las células del hospedero y salen al torrente sanguíneo. Los tripomastigotes se transforman en amastigotes intracelulares en nuevos sitios de infección. Cuando otro insecto triatomino se alimenta del mamífero infectado e ingiere los tripomastigotes sanguíneos, éstos se transforman en epimastigotes en el intestino medio del insecto, donde se multiplican y en aproximadamente 15 a 30 días se diferencian nuevamente en tripomastigotes metacíclicos, los cuales pasan al ámpula rectal del triatomino para continuar con el ciclo biológico.

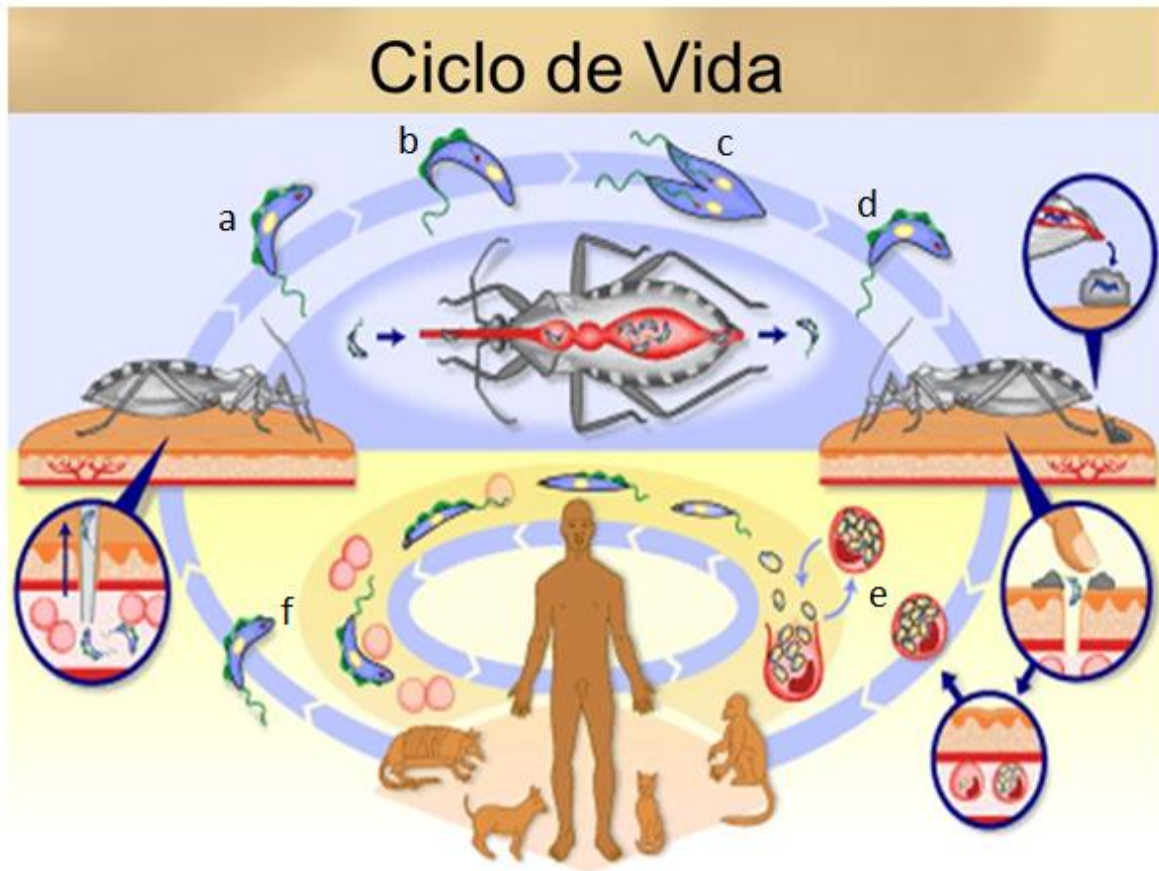


Figura 2: Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi* (OMS 2005). En la parte superior se encuentran las fases que se llevan a cabo dentro del vector: ingestión de tripomastigote sanguíneo (a), epimastigote (b), división del epimastigote por fisión binaria longitudinal (c) y tripomastigote metacíclico (d). En la parte inferior se observan las fases amastigote (e) y tripomastigote sanguíneo (f) en el hospedero.

3.3 Mecanismos de transmisión

La transmisión de *Trypanosoma cruzi* puede ocurrir por medio de la picadura de un triatomino infectado, que es la forma natural o rural; a través de trasplantes de órganos y tejidos, el cual es un mecanismo relevante en países como Bolivia con altas tasas de infección por transfusiones (Schmuñis, 1999); la transmisión vertical o materno-fetal se ha reportado en un 2% a 11% de mujeres embarazadas infectadas; además, se han reportado casos en los que se involucra la ingesta de alimentos o líquidos contaminados con las heces de triatominos infectados (Berger, 2015).

3.4 Epidemiología

La enfermedad de Chagas es la tercera enfermedad tropical más importante a nivel mundial después de la malaria y la esquistosomiasis. A nivel mundial se estiman aproximadamente 8 millones de personas infectadas y en América Latina, el 25% de la población se encuentra en riesgo de infección, lo que equivale a 121 millones de personas. Anualmente, se registran aproximadamente 56000 casos nuevos con la enfermedad de Chagas, lo cual ocasiona 12000 muertes al año (OMS, 2014; OPS, 2015).

En México, para los años del 2000 al 2012 la Secretaría de Salud (SS) reportó un total de 5,559 casos de humanos con enfermedad de Chagas. En 2013 se registraron 762 casos nuevos y en 2014, 729. A pesar de que los estados con mayor incidencia sean Chiapas, Veracruz, Morelos, Oaxaca, Yucatán, Guerrero y Jalisco, dos tercios del territorio mexicano tienen las condiciones apropiadas para que ocurra la transmisión vectorial con 32 especies de triatominos (Secretaría de Salud, 2016).

3.5 Distribución

La enfermedad de Chagas es endémica en 21 países de América Latina, entre 42°N y 40°S, es decir, del sur de Estados Unidos a Argentina y Chile; sin embargo, debido a las migraciones de personas infectadas, puede propagarse a países no endémicos de América y del mundo (OMS, 2014). La Organización Panamericana de la Salud (OPS) señala registros de la enfermedad en países como Japón, Estados Unidos, Canadá, Australia y algunos países de Europa (OPS, 2015).

Distribución mundial de casos de la enfermedad de Chagas con base en estimaciones oficiales, 2006-2010

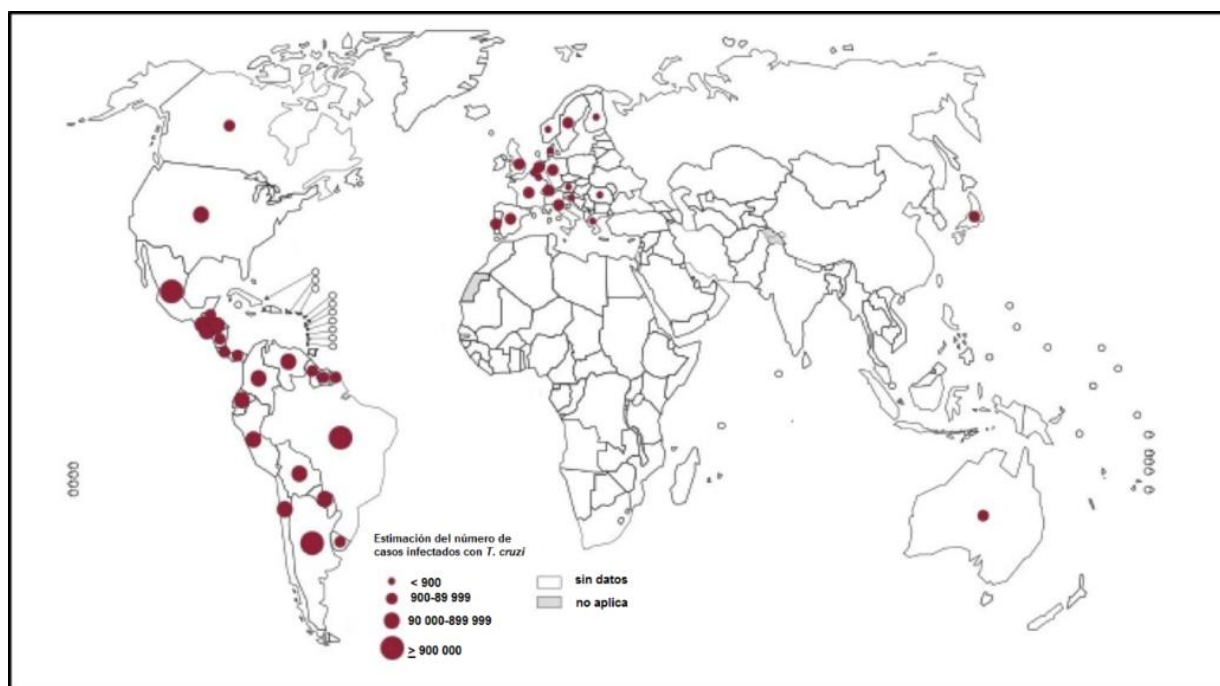


Figura 3. Mapa de la distribución global de casos de enfermedad de Chagas, según estimaciones oficiales y situación de la transmisión vectorial, 2006-2010.

Fuente: OMS, sostener el impulso para superar el impacto global de las enfermedades tropicales desatendidas: segundo informe de la OMS sobre enfermedades tropicales desatendidas, enero 2013.

3.6 Cuadro clínico

El cuadro clínico de la enfermedad de Chagas se divide en tres fases, aguda, crónica asintomática (indeterminada) y crónica sintomática.

- Fase aguda. En humanos puede durar de dos a cuatro meses. Se caracteriza por la presencia del parásito y puede ir acompañada de signos específicos como el signo de romaña (complejo oftalmo-ganglionar) o el chagoma de inoculación durante los primeros quince días, así como de signos inespecíficos como fiebre, adenitis y hepatoesplenomegalia, entre otros.
- Fase indeterminada. Tiene una duración variable que puede ser de 10 años o, incluso, varias décadas. En esta fase la parasitemia es muy baja, prácticamente no detectable.
- Fase crónica. La fase crónica sintomática se desarrolla en aproximadamente el 25 ó 30% de los pacientes con fase indeterminada y lleva a un compromiso visceral irreversible, como megaesófago, megacolon o cardiomegalia. La miocardiopatía es la manifestación más importante de la enfermedad de Chagas y se caracteriza por insuficiencia cardíaca y trastornos del ritmo cardíaco.

3.7 Diagnóstico

El diagnóstico etiológico de la enfermedad de Chagas se obtiene mediante la evaluación clínica, la epidemiología y diferentes pruebas de laboratorio. Los elementos más importantes para el diagnóstico de laboratorio dependen de la fase de la enfermedad y son la presencia del parásito (en fase aguda) y la de anticuerpos anti-*T cruzi* (en fase crónica); por lo cual los métodos de diagnóstico se clasifican en parasitológicos y serológicos.

3.7.1 Métodos parasitológicos

En la fase aguda, el diagnóstico se confirma mediante diversos métodos parasitológicos, que son los siguientes:

- Examen directo, gota gruesa y frotis sanguíneo. En éstos, se realiza la identificación de tripomastigotes sanguíneos, usando tinciones como Giemsa.

- Hemocultivo en medios como el de NNN. El parásito se multiplica en forma de epimastigote.
- Xenodiagnóstico. Éste método, actualmente en desuso, se realizaba usando un triatomino no infectado.
- Método histopatológico. Éste se hace mediante cortes histológicos únicamente en casos *post-mortem* o de trasplantes de órganos y se busca al parásito en su fase de amastigote.

(OMS, 2002)

3.7.2 Métodos inmunológicos

Si el paciente se encuentra cursando la fase crónica, es necesario recurrir a métodos serológicos, los cuales permiten evidenciar la presencia de anticuerpos anti-*T. cruzi* generados por el hospedero. La OPS/OMS señala el empleo de los siguientes métodos para el diagnóstico.

Métodos convencionales:

- Inmunoensayo enzimático (ELISA indirecta). Este método es de alta sensibilidad y especificidad y utiliza el parásito completo, fracciones antigénicas del parásito, o bien, cuando los antígenos que se utilizan son proteínas recombinantes o péptidos sintéticos.
- La lectura se realiza en espectrofotómetro y principalmente se usa con IFI.
- Inmunofluorescencia indirecta (IFI). Éste usa al parásito completo y es de reactividad intermedia. La lectura es visual.
- Hemaglutinación indirecta (HAI). Utiliza fracciones antigénicas del parásito y es de reactividad intermedia. La lectura es visual.

Métodos no convencionales:

- Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Este método permite amplificar secuencias de ADN del parásito con alta especificidad y sensibilidad. No es una prueba de rutina; sin embargo, puede ser útil en casos de infección congénita y en estudios de la eficacia terapéutica e investigación.

- Western-blot (WB). Éste utiliza diversos componentes de origen proteico y tiene buena sensibilidad y especificidad. Actualmente, la OPS/OMS recomienda estos procedimientos en casos de discordancias debido a las altas tasas de incidencia de muestras con resultados dudosos o en zona gris, especialmente observados en bancos de sangre (OPS/OMS, 2005-2007).

La OPS señala que para determinar seropositividad debe existir reactividad en dos pruebas de diferente principio (UNAM-SSA-OPS, 2006).

3.8 Patogenia y patología

Existen varios factores que contribuyen directa o indirectamente al daño ocasionado por la infección por *T. cruzi*, algunos son inherentes al parásito, otros relacionados con el hospedero, además de las características ambientales y socioculturales para que se lleve a cabo la cadena epidemiológica (Tafari et al, 1999; Marin-Neto et al, 2007).

Actualmente, se han propuesto principalmente los siguientes cuatro mecanismos patogénicos para comprender el desarrollo de la lesión en la enfermedad de Chagas (Marin-Neto et al, 2007):

1. Disautonomía cardíaca. Se refiere al parasitismo y, por tanto, al daño ocasionado en las neuronas. Fritz Köberle estandarizó un método de conteo neuronal cardíaco, con el cual mostró para la enfermedad de Chagas una reducción en la población de neuronas en pacientes chagásicos. Se ha descrito principalmente en fase aguda y por tres mecanismos: parasitismo directo de neuronas, degeneración ocasionada por una inflamación periganglionar y reacción autoinmune anti-neuronal.
2. Trastornos microvasculares. Éstos son causados por una inflamación perivascular y endotelial como mecanismo para la degeneración miocárdica. Hay un engrosamiento de la membrana basal de los capilares, así como un incremento de la agregación plaquetaria y en la adhesión al endotelio, lo cual genera trombosis plaquetaria con isquemia en miocardio. El incremento de endotelina se debe al daño al endotelio vascular y a que *T. cruzi* posee un complejo enzimático conocido como transialidasa neuraminidasa, que elimina el ácido siálico de la superficie de los miocardiocitos y

células endoteliales de los mamíferos, lo cual facilita la agregación plaquetaria y, por tanto, la trombosis microvascular (Marin-Neto et al, 2007).

3. Daño miocárdico directamente relacionado con la persistencia del parásito. Esencialmente, la miocardiopatía chagásica se caracteriza por alteraciones especialmente en miocardio y en el sistema de conducción (haz de His). Actualmente aún se desconocen algunos aspectos en la patogenia de este mecanismo durante la fase crónica (Marin Neto et al, 2007).

1. Mecanismos inmunológicos. La respuesta humoral que se presenta en la infección es útil en el diagnóstico serológico de la infección y, por otro lado, existe la teoría autoinmune, donde se ha comprobado que más del 80% de casos en esta miocardiopatía presenta anticuerpos autorreactivos en contra de diversos tejidos, estructuras tisulares, células e, incluso, contra receptores β adrenérgicos y muscarínicos (Tafari, 1987; Cunha-Neto et al, 2006; Borda y Sterin-Borda, 1996); por otro lado, respecto a la respuesta inmune celular, se ha comprobado la presencia de células T autorreactivas capaces de reconocer componentes proteicos del hospedero (Gutierrez et al, 2009).

El estudio de los mecanismos patogénicos de la enfermedad ha ido evolucionando conforme al avance científico, como se observa en la siguiente tabla:

Tabla 1. Evolución histórica de la interpretación de los mecanismos patogénicos (Viotti y Vigliano, 2015).

Autor	Año	Descripción
Carlos Chagas	1911	Fase aguda y crónica (alteraciones del ritmo cardíaco, bradicardia, bloqueo cardíaco, insuficiencia cardíaca. Miocarditis crónica).
Gaspar Vianna	1912	Amastigotes en células musculares y fibras parasitadas sin reacción inflamatoria pericelular.
Magarinos Torres	1929	Miocardiopatía chagásica crónica se da por miocarditis activa y progresiva, debida a la acción continua del parásito.
Fritz Köberle	1950	La disautonomía a partir de la denervación de las neuronas del sistema nervioso autónomo parasimpático ocasiona el megaesófago, el megacolon y la cardioneuropatía chagásica.

Rossi et al	1960	El daño cardíaco es consecuencia de una vasculopatía con arteritis y pérdida de componentes de la microcirculación cardíaca, que llevaría a la pérdida de unidades contráctiles por necrosis isquémica con inflamación y fibrosis reparativa.
Witebsky y Rose	1960's	La importancia de los mecanismos inmunológicos para producir daño al miocardio. Establecieron las bases de la autoinmunidad y los criterios para diagnosticar una enfermedad como autoinmunitaria. La presencia del parásito no es necesaria para la persistencia y agravamiento de la miocarditis. Desarrollaron modelos experimentales de infección crónica.
Marin-Neto	2007	Propuso 4 mecanismos patogénicos: disautonomía cardíaca, trastornos microvasculares, daño de miocardiocitos relacionado con la presencia del parásito y mecanismos inmunológicos.
Teixeira	2011	Propuso como teorías de la patogénesis de la enfermedad de Chagas la persistencia del parásito, la teoría neurogénica unificada y la autoinmunidad.

Tabla 2. Compilación de estudios sobre la histopatología de la enfermedad de Chagas en México.

Autor	Año	Descripción
Cárdenas et al.	1975	Estudio comparativo de las alteraciones ocasionadas por seis cepas mexicanas de <i>T. cruzi</i> en diversas vísceras. Se encontraron diferencias en la patogenicidad de las diferentes cepas estudiadas desde el punto de vista de las alteraciones anatomopatológicas. Las alteraciones más notorias ocurrieron en músculo esquelético, hígado y miocardio, en ese orden. Se reportan infiltrados perivasculares en corazón.
Salazar-Schettino et al.	1975	Se describe la primera cepa mexicana manejada en condiciones experimentales altamente virulenta y cardiotrópica.
Salazar-Schettino et al.	1978	Estudio comparativo de la patogenicidad de cuatro cepas de <i>T. cruzi</i> en el ratón blanco. Se reporta una gran variabilidad en la virulencia de las cepas de <i>T. cruzi</i> mexicanas.

3.8.1 Infiltrado en la miocarditis chagásica

La sangre está compuesta por eritrocitos, leucocitos y plaquetas; existen diferentes tipos de leucocitos, que son los neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monocitos y linfocitos; estos últimos constituyen la mayoría de la población de las células blancas y se encuentran en una cantidad homogénea en ratones sanos (Smith y Jarecki, 2011).

La miocarditis es una inflamación en el miocardio con la consiguiente lesión; es decir, el proceso inflamatorio es la causa de la lesión miocárdica. En la miocarditis chagásica, el infiltrado está compuesto por neutrófilos, macrófagos, escasos eosinófilos y linfocitos; estos últimos son las células predominantes. Durante la fase aguda, la inflamación se debe a la acción directa del parásito, que se multiplica en las células del miocardio y ocasiona daño miocítico con infiltrado que evoluciona hacia la fibrosis, característica en la fase crónica y que puede ocasionar bloqueos cardíacos (Tafari, 1999; Demarchi y Peixoto, 2015). Se han realizado diferentes estudios, en los cuales se ha descrito principalmente infiltrado de linfocitos y macrófagos, así como de neutrófilos con predominio perivasculares (Cárdenas et al, 1975).

Además, se sabe que la presencia del parásito en miocardio mantiene el proceso inflamatorio. En otros estudios, se ha referido una asociación de concordancia entre mayor número de nidos de amastigotes en miocardio con altos niveles de parasitemia en diferentes poblaciones de *T. cruzi* (Pizzi et al, 2005).

3.8.2 Fibrosis en la enfermedad de Chagas

Uno de los elementos fundamentales para la supervivencia del mamífero es la reparación; es decir, la recuperación de la estructura y función de los tejidos después de una lesión. Este proceso es característico en la patología cardíaca con el fin de conservar el equilibrio hemodinámico del corazón. El término “fibrosis” se refiere a la producción principalmente de colágena en tejido, característica en los procesos de inflamación crónica (Kumar et al, 2008).

Para el desarrollo de la fibrosis ocurren dos mecanismos, el primero, que es un reemplazo de las células muertas, forma cicatrices con tamaños proporcionales a la dimensión de la pérdida celular y el segundo es el desarrollo del infiltrado con sustancias que inducen la fibrogénesis. Las células responsables de formar las fibras de colágena son los fibroblastos, que además llevan a cabo la síntesis y el mantenimiento de la matriz extracelular, la cual mantiene la integridad del tejido conjuntivo. Estas células son importantes en la cicatrización, ya que cuando hay daño tisular se induce la mitosis de fibroblastos (Tafari, 1999). En los casos de fibrosis miocárdica, se han realizado estudios donde se ha visto que ésta está directamente relacionada con la reacción inflamatoria, la cual está compuesta también por linfocitos y macrófagos (Rossi, 1991).

Para el estudio de la patogénesis en la enfermedad de Chagas, existen numerosos trabajos de diferentes investigadores desde Carlos Chagas con Magarinos Torres, donde se describe ampliamente la histopatología de la enfermedad en el humano y posteriormente con Fritz Köberle, en donde se enriquece aún más con el estudio de las alteraciones neurológicas, pero que en el primer caso no existen evidencias de la evolución de la lesión en los casos que actualmente conocemos como asintomáticos, ya que su casuística se relacionaba a casos con patologías severas durante fase aguda o crónica estudiados *post-mortem*. En los estudios posteriores ha sido ampliamente descrita la patología cardíaca también en cardiópatas crónicos. Actualmente, el estudio de la patogénesis de la lesión se realiza principalmente en modelo murino, conejo o perro y no existe una descripción sistemática en ninguno de estos modelos acerca de la evolución de la lesión desde el momento de la primoinfección hasta el final de la fase aguda para continuar con la lesión crónica característica.

3.8.3 El modelo murino en la enfermedad de Chagas

Los ratones CD-1 tienen una alta variabilidad genética y se caracterizan por ser de fácil manejo y tener una tasa de reproducción rápida.

Tabla 3. Compilación de estudios sobre la histopatología de la enfermedad de Chagas en modelo murino.

Año	Autor	Cepa de ratón	Otras aportaciones	Lesiones histopatológicas en corazón
1966	Watkins	C3H y CD-1	Cepa CD-1 es más resistente que C3H	No descrito
1999	Jelicks, et al.	CD-1 y NOS2	En CD-1 aumentó el diámetro interno del ventrículo derecho.	Mionecrosis, inflamación, nidos. Fibrosis al día 80 post infección.
2005	Pizzi	BALB/c	Inflamación y nidos en músculo esquelético y miocardio auricular. Relación: lesión histopatológica - parasitemia. Mayor compromiso histológico en machos.	Nidos sin relación topográfica con inflamación. Infiltrado por linfocitos y pocos neutrófilos con preferencia subendocárdica. Fibrosis en los casos de larga evolución.
2009	Suárez	BALB/c	Relación inóculo-supervivencia. A mayor inóculo, menor supervivencia.	No descrito
2012	Mena-Marín, et al.	CD-1	El sexo influye en la infección por <i>T. cruzi</i>	Mayores alteraciones histopatológicas en machos. Macrófagos, pocos linfocitos, eosinófilos y neutrófilos.
2013	González, et al.	C3H/He	No descrito	Inflamación en miocardio y aumento de fibrosis ya con menos nidos de amastigotes en corazón.
2015	Birma, et al.	CD-1	Existe un vínculo entre la nutrición y las defensas del hospedero.	Una dieta alta en grasa favorece un aumento de parásitos en tejido adiposo blanco y una disminución en corazón.

4. JUSTIFICACIÓN

Trypanosoma cruzi es un parásito con diversos tropismos a nivel tisular. En México, se han referido cepas con diferente comportamiento biológico, principalmente cardiotrópicas (Salazar-Schettino et al, 1975; Aluja, 1985). Entre las cepas más relevantes en nuestro país se encuentra el aislado ITRI/MX/1986/QRO, que es una cepa aislada de *Triatoma barberi* y procedente del estado de Querétaro; esta cepa ha sido descrita con alta virulencia en ratón, asimismo se encuentra posiblemente relacionada a casos humanos, según lo reportado por De Haro en 1997. Se sabe que a nivel tisular en corazón, el infiltrado y la fibrosis son desencadenados por la presencia y reproducción del parásito (Marin-Neto et al, 2007); a la fecha, no existe una descripción completa y detallada de la histopatología cardíaca durante la fase aguda de la enfermedad de Chagas en modelos experimentales, así como del inicio, correlación y evolución de estas variables.

5. HIPÓTESIS

Durante la fase aguda de la enfermedad de Chagas se reproduce el parásito en el huésped, lo cual implica la presencia de infiltrado; por lo tanto, si en el modelo experimental se realiza la caracterización histopatológica del infiltrado, entonces se podrá identificar la correlación entre éste y la presencia del parásito para determinar lesiones incipientes antes de la fase crónica.

6. OBJETIVOS

6.1 Objetivo general

Determinar si existe una correlación entre la presencia de nidos de amastigotes, la presencia de infiltrado y la presencia de fibras de colágena en corazón durante la fase aguda de la infección.

6.2 Objetivos particulares

- Estandarizar y establecer la cronicidad de la infección por *T. cruzi* en modelo murino.
- Realizar curvas de parasitemia y registrar los signos clínicos observados en ratones infectados por *T. cruzi* con el inóculo estandarizado para obtener sobrevivida mayor a 30 días.
- Realizar cortes histológicos para caracterizar las lesiones en corazón por medio de:
 - Cantidad de nidos de amastigotes con la tinción de Hematoxilina-Eosina (H.E.)
 - Presencia y localización de las zonas de infiltrado con la tinción de H.E.
 - Presencia de fibras de colágena, identificadas con la tinción de Masson.
- Realizar gráficos y estadísticos de correlación para determinar si existe correlación entre las variables estudiadas (parasitemia, nidos de amastigotes, infiltrado y presencia de fibras de colágena) por medio del programa GraphPad Prism versión 6.0 para Windows, GraphPad Software ®

7. METODOLOGÍA

7.1 Aislado de *Trypanosoma cruzi*

Se empleó un aislado de *Trypanosoma cruzi*, el cual pertenece al cepario del Laboratorio de Biología de Parásitos de la Facultad de Medicina, UNAM. Esta cepa fue aislada por la Dra. Paz María Salazar en 1986 del vector *Triatoma barberi* en un estudio epidemiológico realizado en la localidad “La Cueva”, del estado de Querétaro, actualmente etiquetada según los lineamientos marcados por OPS como ITRI/MX/1986/QRO; en este estudio, se caracterizó este aislado como altamente virulento y posiblemente relacionado a casos humanos, debido a que el vector fue capturado dentro del domicilio (De Haro, 1997).

7.2 Modelo animal

Se emplearon ratones hembra de la especie *Mus musculus*, cepa CD-1, obtenidos del bioterio de la Facultad de Medicina de la UNAM. Se mantuvieron en contenedores especiales para 5 y 10 ratones por caja y se les suministró agua y comida *ad libitum*.

El manejo de los ratones se apegó en todo momento a las consideraciones éticas que señala la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999). El proyecto fue sometido a la evaluación por las Comisiones de Investigación y Ética de la División de Investigación de la Facultad de Medicina de la UNAM.

7.3 Estandarización de la infección por *T. cruzi*

7.3.1 Estandarización del inóculo

Para la estandarización del inóculo, se emplearon 33 ratones hembra con pesos entre 28 y 32 gramos.

Cada lote de animales, que consistió en 11 ratones, recibió un inóculo diferente de *Trypanosoma cruzi* por vía intraperitoneal (i.p.). El Grupo 1 fue inoculado con 100 000 parásitos/ratón, el Grupo 2 con 10 000 parásitos/ratón y el Grupo 3 con 1000 parásitos/ratón. El lote testigo consistió en 11 ratones inoculados con solución salina estéril, también por vía i.p.

7.3.2 Infección en modelo murino

Una vez estandarizado el inóculo, se procedió a infectar a 75 ratones hembra de un rango de 28-32 gramos de peso, los cuales se mantuvieron en 8 contenedores; cada ratón fue inoculado con 1000 parásitos por vía i.p. y marcado con ácido pícrico para su seguimiento; se inocularon 15 ratones testigo con solución salina estéril.

7.4 Determinación de curvas de parasitemia

La observación y cuantificación de tripomastigotes sanguíneos se realizó colocando 80 μ L de PBS y 10 μ L de citrato de sodio al 3.8% en un tubo Eppendorf de 500 μ L; posteriormente, se hizo un corte de la porción distal de la cola de cada ratón y se extrajeron 10 μ L de sangre, los cuales se mezclaron en el tubo Eppendorf; para la observación y cuantificación microscópica, se colocaron 10 μ L de la dilución en cámara de Neubauer. La parasitemia se cuantificó cada 72 horas hasta la muerte espontánea de los ratones o presencia de signos severos, en cuyo caso se realizó la eutanasia correspondiente.

7.5 Registro de signos clínicos

Se registró el día de inicio de los signos observados en cada ratón, los cuales fueron principalmente parálisis de cuartos traseros (PCT), crecimiento abdominal (CA), ptosis palpebral (PP) y erizamiento de pelo (E).

7.6 Procesamiento de corazón

7.6.1 Eutanasia

Se realizó una eutanasia cada 72 horas; que incluyó un ratón testigo y cinco ratones infectados elegidos al azar. Las eutanasias se realizaron con anestésico inhalable (éter) acorde con la NOM-062-ZOO-1999.

7.6.2 Extracción de corazón

Después de la eutanasia, se extrajo el corazón, al cual se le realizó una perfusión inicial con PBS al 1% y posteriormente con paraformaldehído (PFA) al 4%; se retiraron las aurículas y se realizó corte sagital de los ventrículos, los cuales se conservaron en PFA a -4°C hasta su procesamiento.

7.6.3 Procesamiento histológico

Para la realización de cortes traslúcidos, se deshidrataron las muestras con alcoholes de grados crecientes para finalmente su inclusión en bloques de parafina. Posteriormente se realizaron cortes de 5 µm con microtomo rotativo.

La tinción de los cortes se realizó con H.E. y tricrómico de Masson.

7.7 Análisis histopatológico

7.7.1 Tinción con Hematoxilina-Eosina (H.E.)

La caracterización histopatológica en los cortes consistió en la determinación de la presencia de nidos de amastigotes y la presencia, tipo y localización del infiltrado. El tipo de infiltrado se dividió en infiltrado de tipo linfocitario (linfocitos con escasos macrófagos) e infiltrado mixto (linfocitos y escasos macrófagos y con algunos neutrófilos). La localización del infiltrado se identificó en endocardio (capa interna de las cavidades), miocardio o epicardio (capa externa de las cavidades) (Figura 5). Para la determinación de la cantidad de nidos de amastigotes, se utilizaron dos metodologías; la primera, mediante observación al microscopio de 100 campos a 40x y la segunda, por medio de conteo por cuadrícula en campos de 40x al microscopio, según se señala en la figura 4 (Bologna-Molina et al, 2011):

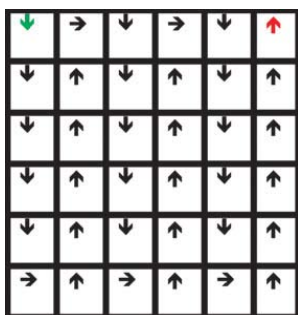


Figura 4. Esquema con el orden en que se realizó el conteo por cuadrícula.

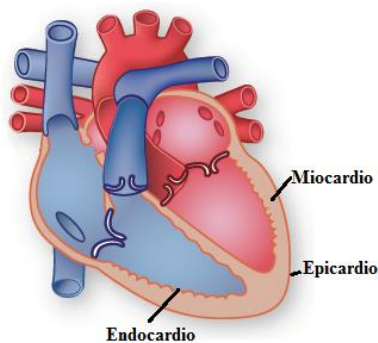


Figura 5. Esquema modificado de <http://www.texasheart.org/HIC/Topics/Cond/aseptal.cfm>, que muestra las capas del corazón.

7.7.2 Tinción con tricrómico de Masson

En estos cortes, se determinó la presencia de fibras de colágena.

Los criterios utilizados para determinar lesiones fibróticas incipientes fueron la presencia de fondo claro con fibras finas de colágena, infiltrado, desarreglo y/o destrucción de miocardiocitos adyacentes, con una extensión de dos o más miocardiocitos (lo que equivale aproximadamente entre 15 y 20 μm de espesor del tejido). Se descartó todo tejido que fuera tendinoso o haz de His. Se registraron las zonas de lesiones fibróticas incipientes utilizando los términos “unifocal” (si en todo el corte se encontraba un solo foco de lesión) y “multifocal” (si había dos o más focos de dichas lesiones).

7.7.1 Microfotografías

Tanto para el conteo por cuadrícula como para el resto del análisis histopatológico, se incluyeron las microfotografías más representativas de cada condición (día 0, día 10, día 20, día 30, día 40, día 50 y día 60). Las microfotografías fueron tomadas con una cámara Canon EOS Rebel T6i® en un microscopio marca Olympus ® a 40X y 100X.

7.8 Gráficos

Se utilizó el programa GraphPad Prism versión 6.0 para Windows, GraphPad Software ® para realizar los siguientes gráficos:

- Curvas de supervivencia para la estandarización del inóculo.
- Curvas de parasitemia. Se utilizaron 19 ratones debido a que en el experimento se sacrificaban 5 ratones cada 72 horas.
- Gráficos de prevalencia de nidos de amastigotes.
- Curvas de correlación de parasitemia y nidos de amastigotes. Se utilizó un promedio de 5 ratones por cada día post infección (dpi).
- Gráficos de prevalencia del tipo y localización del infiltrado.
- Gráficos de prevalencia de ratones con lesiones fibróticas incipientes unifocales o multifocales.

Todos los gráficos de prevalencia se realizaron usando como 100% los 5 ratones infectados de cada día de eutanasia.

7.9 Análisis estadísticos

Se realizó una prueba de normalidad D'Agostino & Pearson para corroborar si el conjunto de datos de las curvas de parasitemia tiene distribución normal y posteriormente se realizó un análisis Kruskal-Wallis para probar si los datos no paramétricos provienen de la misma población.

Para las curvas de supervivencia se realizaron las pruebas de Mantel-Cox (prueba de log-rank) y de Gehan-Breslow-Wilcoxon para contrastar las funciones de supervivencia de las poblaciones.

Para comprobar si existe correlación entre las diferentes variables estudiadas (parasitemia, nidos de amastigotes, infiltrado y lesiones fibróticas incipientes), se realizaron análisis de correlación de Spearman. En la correlación de Spearman, el valor del índice de correlación “r” varía en el intervalo (-1, 1), por lo que se considera una correlación positiva si $0 < r < 1$; asimismo, mientras más se acerque r a 1, más fuerte es la correlación.

Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa GraphPad Prism versión 6.0 para Windows, GraphPad Software ®

8. RESULTADOS

8.1 Estandarización de la infección por *T. cruzi*

Durante la estandarización de la infección, se encontraron variaciones en la presentación del periodo prepatente; como se puede observar con el inóculo de 100 000 parásitos y de 10 000 parásitos, dicho periodo fue a los 13 dpi (días post infección), a diferencia del periodo prepatente del inóculo de 1000 parásitos, que fue a los 15 dpi. El porcentaje de mortalidad fue menor para el inóculo de 1000 parásitos. Los signos iniciaron a los 32 dpi para el inóculo de 1000 parásitos, a diferencia de los otros inóculos, donde iniciaron a los 13 dpi para el inóculo de 100 000 y a los 21 dpi para el de 10 000 parásitos (Tabla 4).

Tabla 4. Datos de la estandarización del inóculo

Grupos según el inóculo de parásitos	Periodo prepatente Día	Porcentaje de mortalidad Día	Parasitemia máxima	Parasitemia mínima	Día de inicio de signos clínicos (porcentaje de ratones que las presentaron)
1 00 000 (Grupo 1)	13	45% (día 27) 100 % (día 41)	1.435 x10 ⁶ (día 25)	1	Día 13: PCT (9%) Día 21: PCT (18%) Día 25: PCT (45%), CA (18%), PP (27%), E (9%)
10 000 (Grupo 2)	13	54 % (día 34) 72% (día 41)	2.535 x10 ⁶ (día 25)	1	Día 21: PCT (27%), PCT (18%), CA (18%), PP (18%) Día 22: PCT (9%), PP (9%) Día 28: PCT (9%), CA (9%), PP (9%), E (9%)
1 000 (Grupo 3)	15	40% (día 44)	13.2 x10 ⁶ (día 34)	1	Día 32: PCT (9%) Día 34: PCT (27%), E (9%) Día 41: PCT (36%), PP (18%), E (9%)

Notas: el periodo prepatente es el primer día post infección (dpi) donde se detecta parasitemia. **E** - erizamiento de pelo; **CA** - crecimiento de abdomen; **PP** - ptosis palpebral; **PCT** - parálisis de cuartos traseros.

8.1.1 Curvas de supervivencia en la estandarización del inóculo

Los ratones inoculados con 1000 parásitos (Grupo 3) incrementaron su supervivencia a los 50 dpi, a diferencia de los ratones inoculados con 100 000 (Grupo 1) y 10 000 (Grupo 2) cuyo porcentaje de supervivencia fue menor del 30% a los 50 dpi (Figura 6).

Curva de supervivencia para la estandarización del inóculo

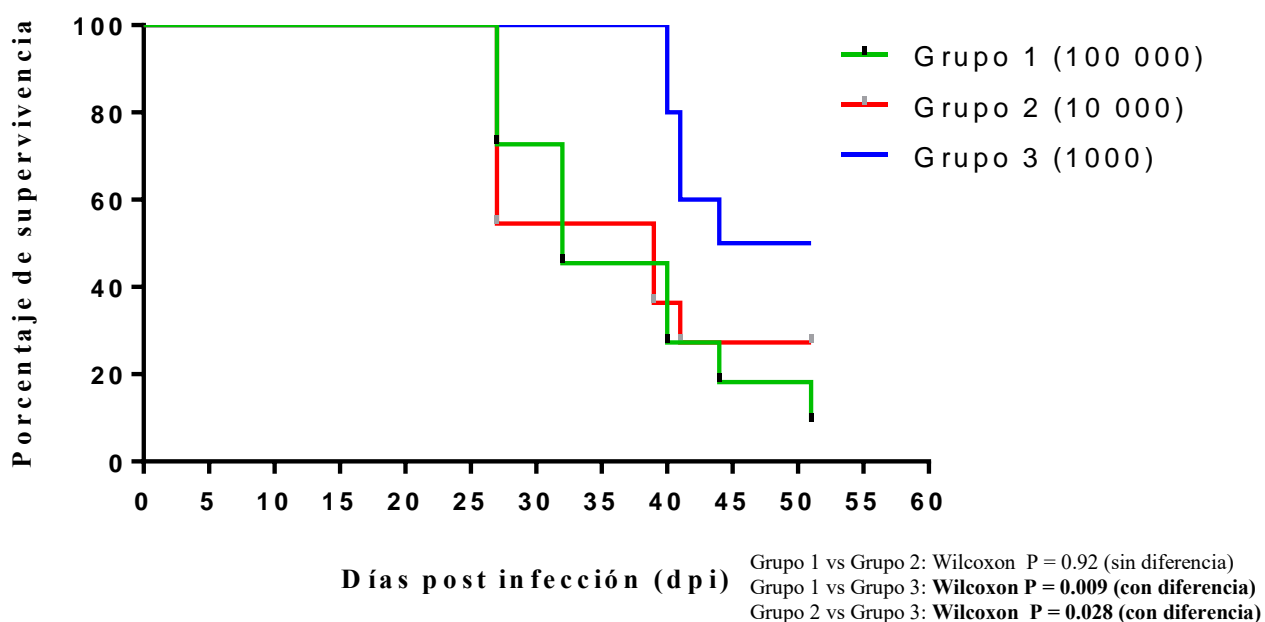


Figura 6. Curva de supervivencia para la estandarización del inóculo. Para cada grupo se utilizó un total de 11 ratones. N = 11.

8.2 Determinación de curvas de parasitemia

La parasitemia inició a los 18 dpi; el mayor número de parásitos (16.9×10^6 parásitos/mL) se observó a los 32 dpi. El promedio del final de la fase log de la curva de crecimiento se registró a los 33 dpi (Figura 7).

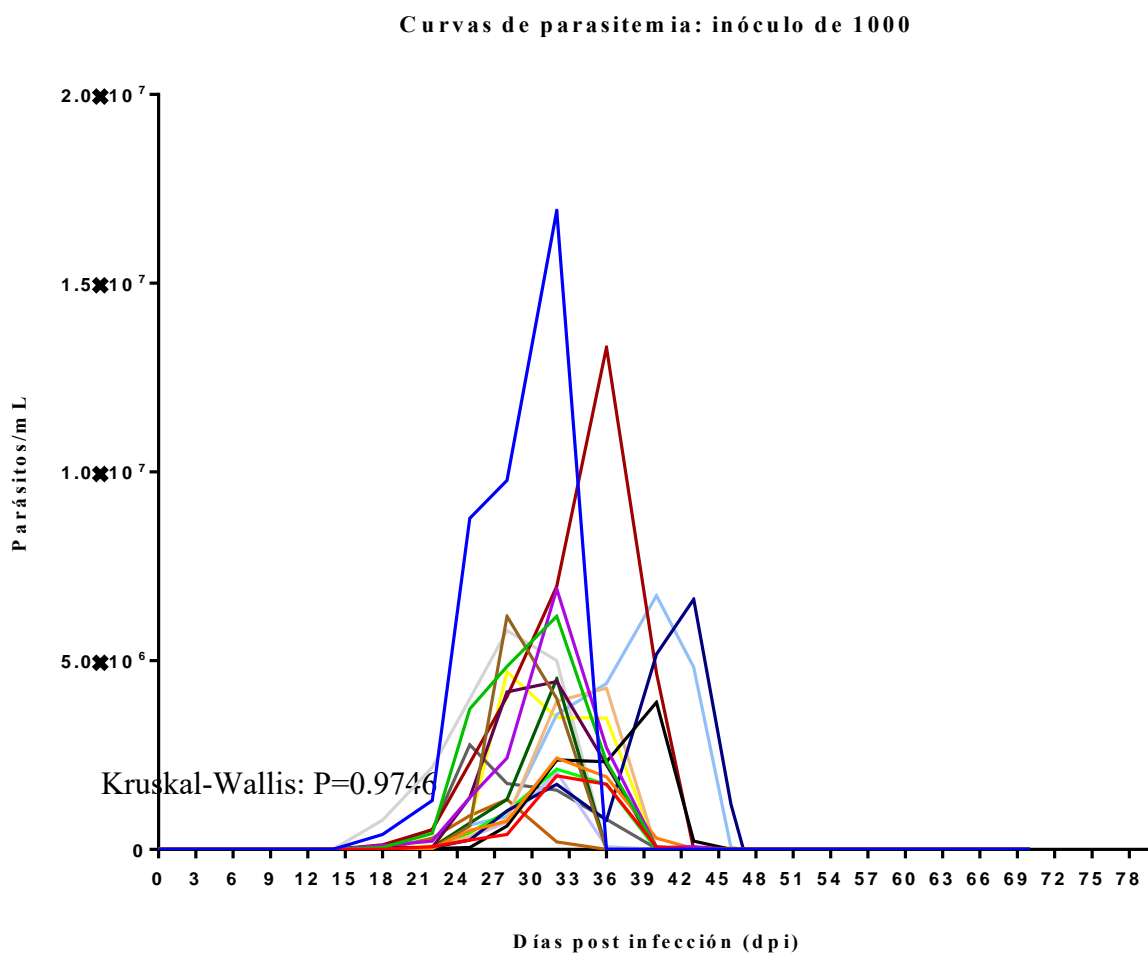


Figura 7. Curvas de parasitemia para el inóculo de 1000 parásitos en ratones hembras CD-1 . n/N = 19/75.

8.3 Análisis histopatológico

La presencia de nidos de amastigotes, infiltrado y lesiones fibróticas incipientes en comparación con la parasitemia a diferentes tiempos de infección se señala en la tabla 5.

Cabe destacar que a partir de los 20 dpi se encontró parasitemia y nidos de amastigotes en incremento hasta los 50 dpi; donde la cantidad de nidos decreció progresivamente. El infiltrado y las lesiones fibróticas incipientes se encontraron a partir de los 10 dpi y se mantuvieron hasta los 60 dpi (Tabla 5).

Día	Parasitemia	No. amastigotes	Infiltrado		Lesiones fibróticas incipientes	
			Ausente / Presente	Ausente / Presente		
0	0	0	0		0	
10	0	0		1		1
20	305,000	7		1		1
30	4.1 (x10 ⁶)	29		1		1
40	2.7 (x10 ⁶)	10		1		1
50	0	4		1		1
60	0	0		1		1

Tabla 5. Comportamiento de la cepa en corazón y comparación con parasitemia. Para los datos de parasitemia y nidos de amastigotes en esta tabla se utilizó para cada día de infección el promedio de cinco ratones infectados.

8.3.1 Microfotografías de la lesión en miocardio a diferentes tiempos de infección

Las microfotografías más representativas de la lesión en miocardio a diferentes tiempos de infección (0 dpi, 10 dpi, 20 dpi, 30 dpi, 40 dpi, 50 dpi y 60 dpi) se presentan en las figuras 8-14.

Día 0: No se observó infiltrado, nidos de amastigotes ni lesiones fibróticas incipientes

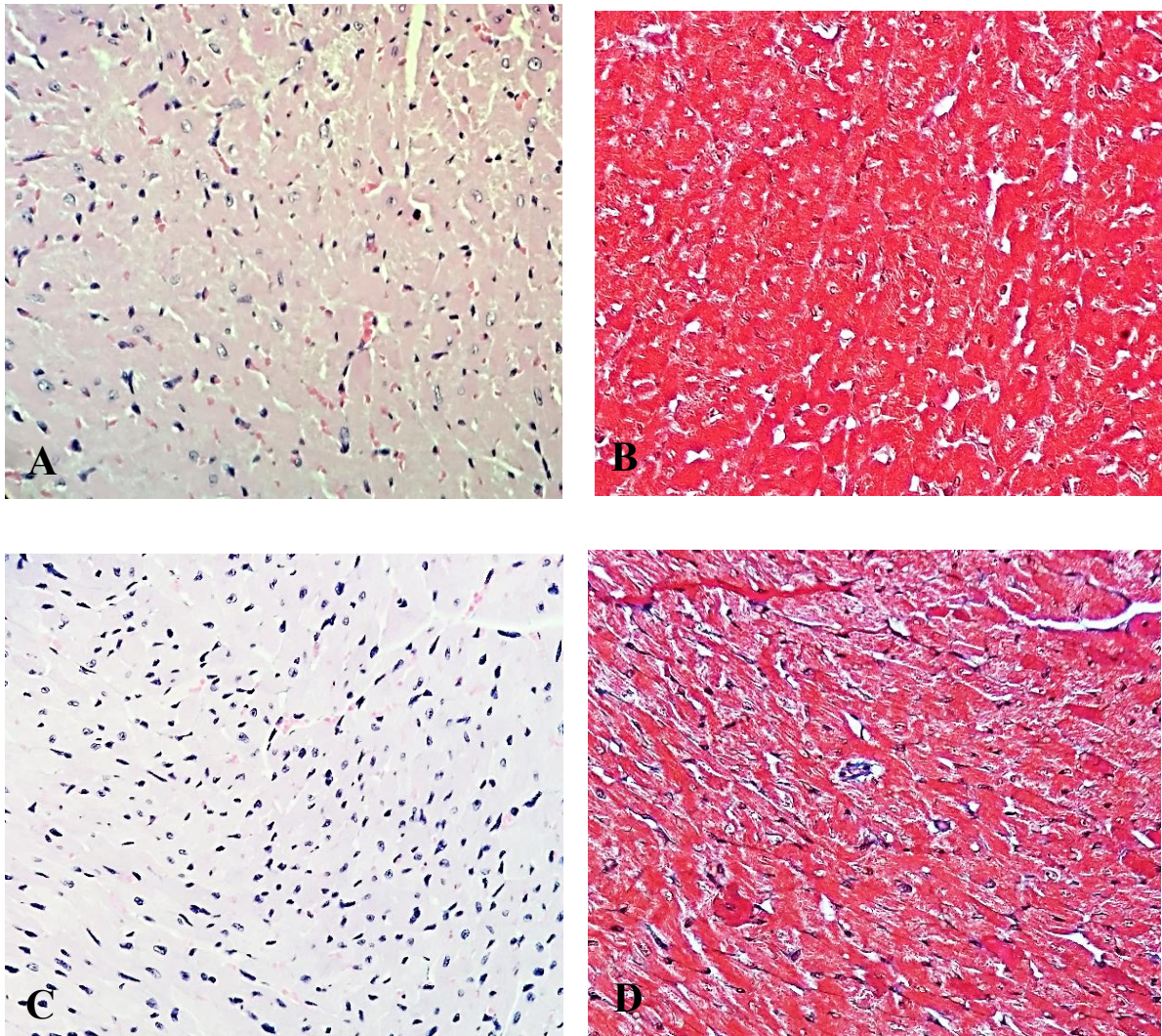


Figura 8: Día 0 **A** – Ventriculo izquierdo: miocardio de ratón infectado sin infiltrado ni nidos de amastigotes, tinción H.E., 40 X. **B** – Ventriculo izquierdo: miocardio de ratón infectado sin lesiones fibróticas incipientes, tinción Masson, 40 X. **C** – Ventriculo izquierdo: miocardio de ratón control, tinción H.E., 40 X. **D** - Ventriculo izquierdo: miocardio de ratón control, tinción Masson, 40 X.

Día 10 – Infiltrado de tipo linfocitario y lesiones fibróticas incipientes

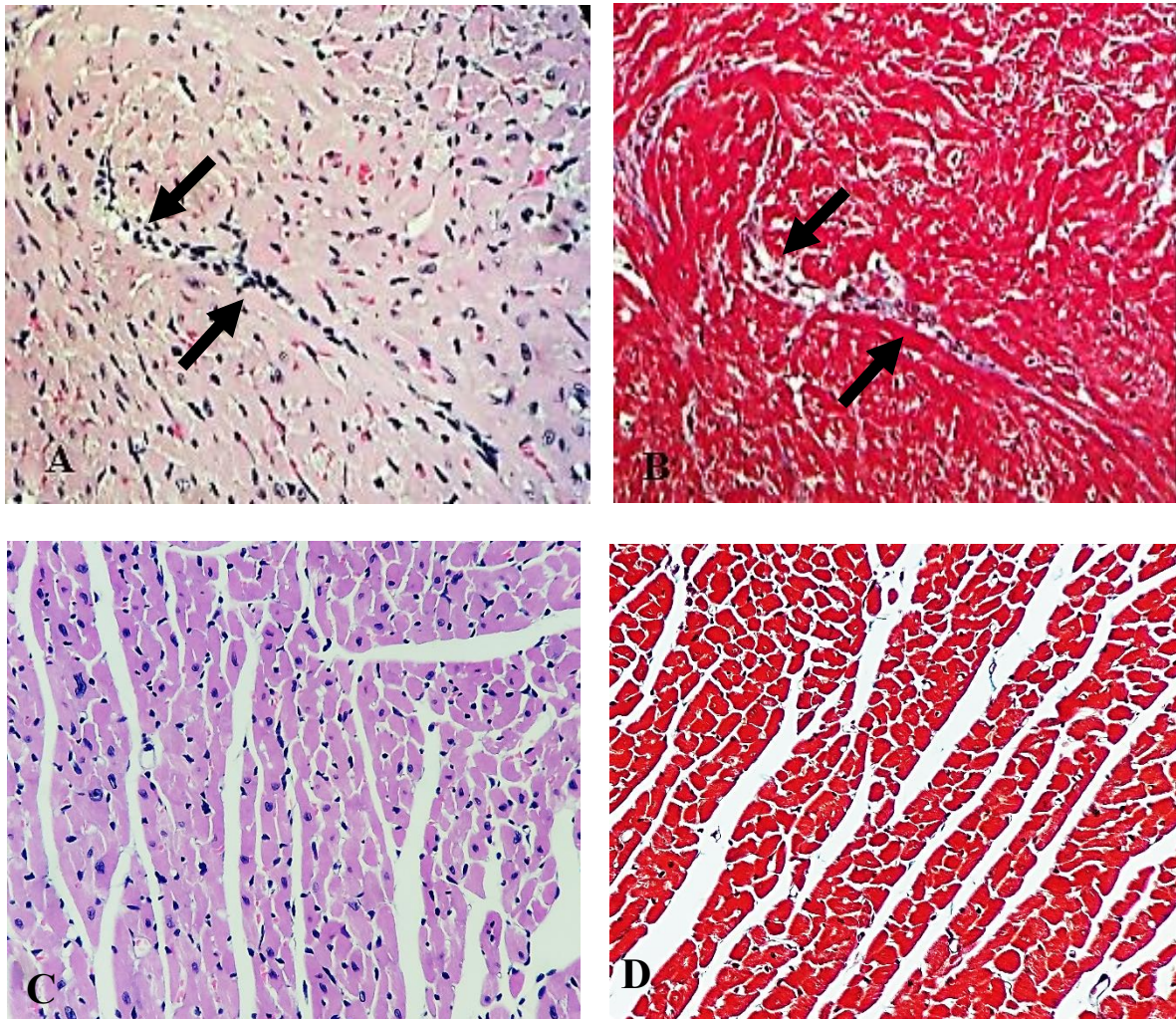


Figura 9: día 10. A - Ventriculo izquierdo: infiltrado intersticial miocárdico principalmente de tipo linfocitario sutil (flechas), tinción H.E., 40 X. **B -** Ventriculo izquierdo: lesiones irregulares de fibrosis incipiente con poco infiltrado (flechas), tinción Masson, 40 X. **C -** Ventriculo derecho: miocardio de ratón control, tinción H.E., 40 X. **D -** Ventriculo derecho: miocardio de ratón control, tinción Masson, 40 X.

Día 20 – Infiltrado linfocitario y lesiones fibróticas incipientes

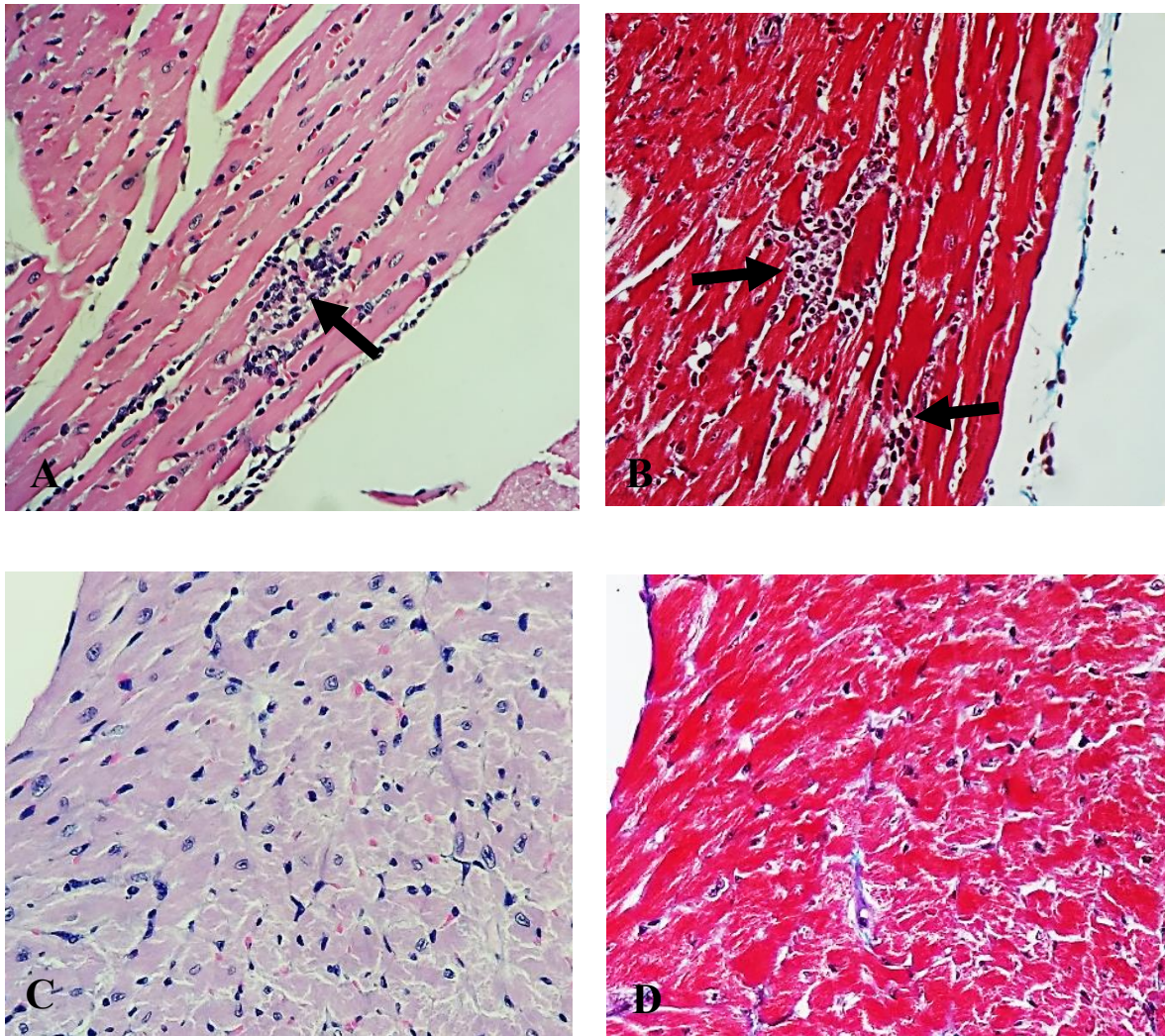


Figura 10: día 20. **A** - Ventriculo derecho: infiltrado intersticial miocárdico y endocárdico principalmente de tipo linfocitario (flechas), tinción H.E., 40 X. **B** - Ventriculo derecho: lesiones fibróticas incipientes con infiltrado adyacente (flechas), tinción Masson, 40 X. **C** - Ventriculo derecho: miocardio de ratón control, tinción H.E., 40 X. **D** - Ventriculo derecho: miocardio de ratón control, tinción Masson, 40 X.

Día 30 – Infiltrado, nidos de amastigotes, lesiones fibróticas incipientes

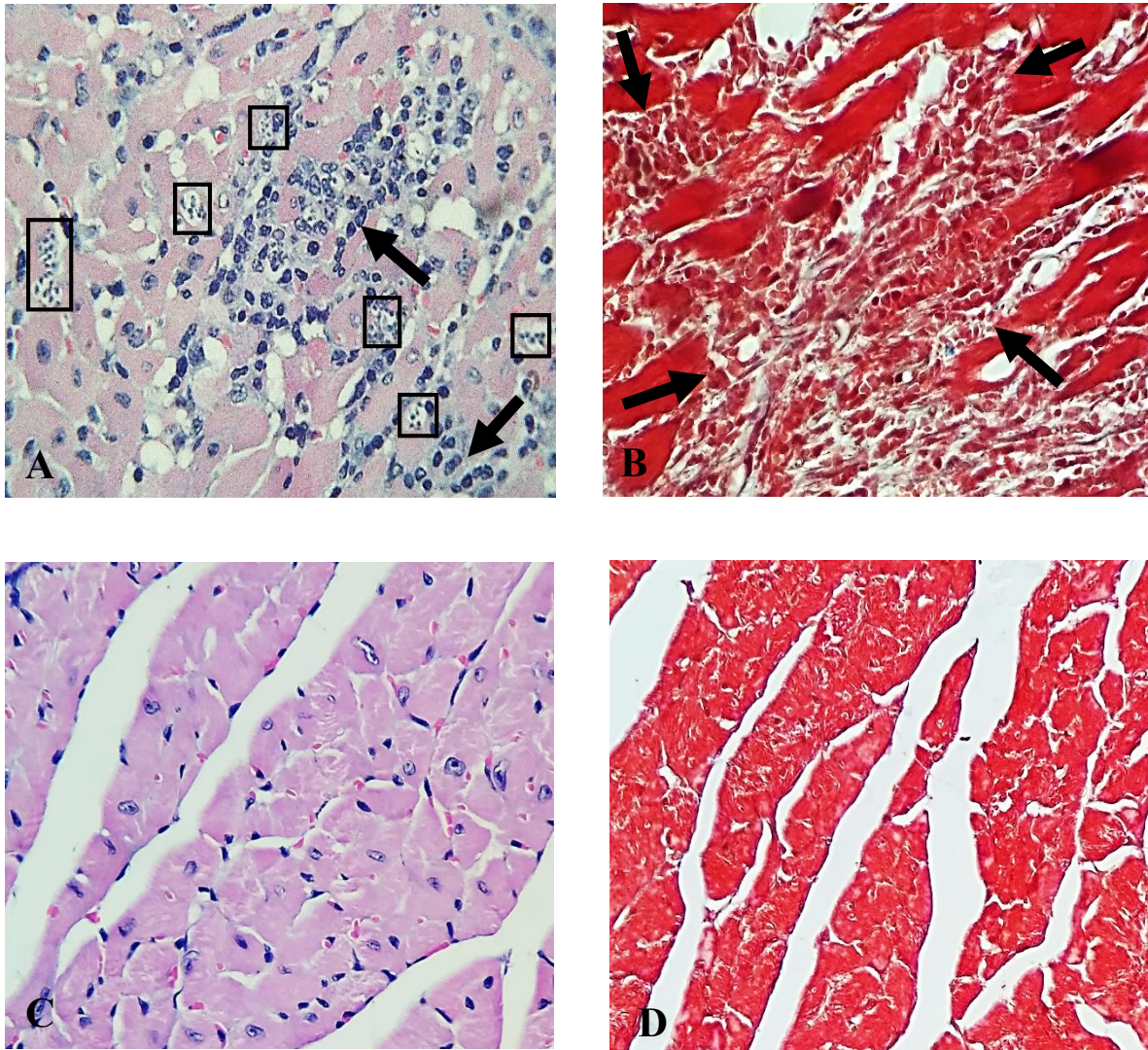


Figura 11: día 30. A – Ventriculo derecho: infiltrado intersticial miocárdico principalmente de tipo linfocitario (flechas) y nidos de amastigotes (cuadros), tinción H.E., 40 X. **B:** Lesiones fibróticas incipientes extensas con infiltrado y un intenso desarreglo de fibras (flechas), tinción Masson, 40 X. **C –** Ventriculo izquierdo: miocardio de ratón control, tinción H.E., 40 X. **D -** Ventriculo izquierdo: miocardio de ratón control, tinción Masson, 40 X.

Día 40 – Infiltrado linfocitario en miocardio y lesiones fibróticas incipientes

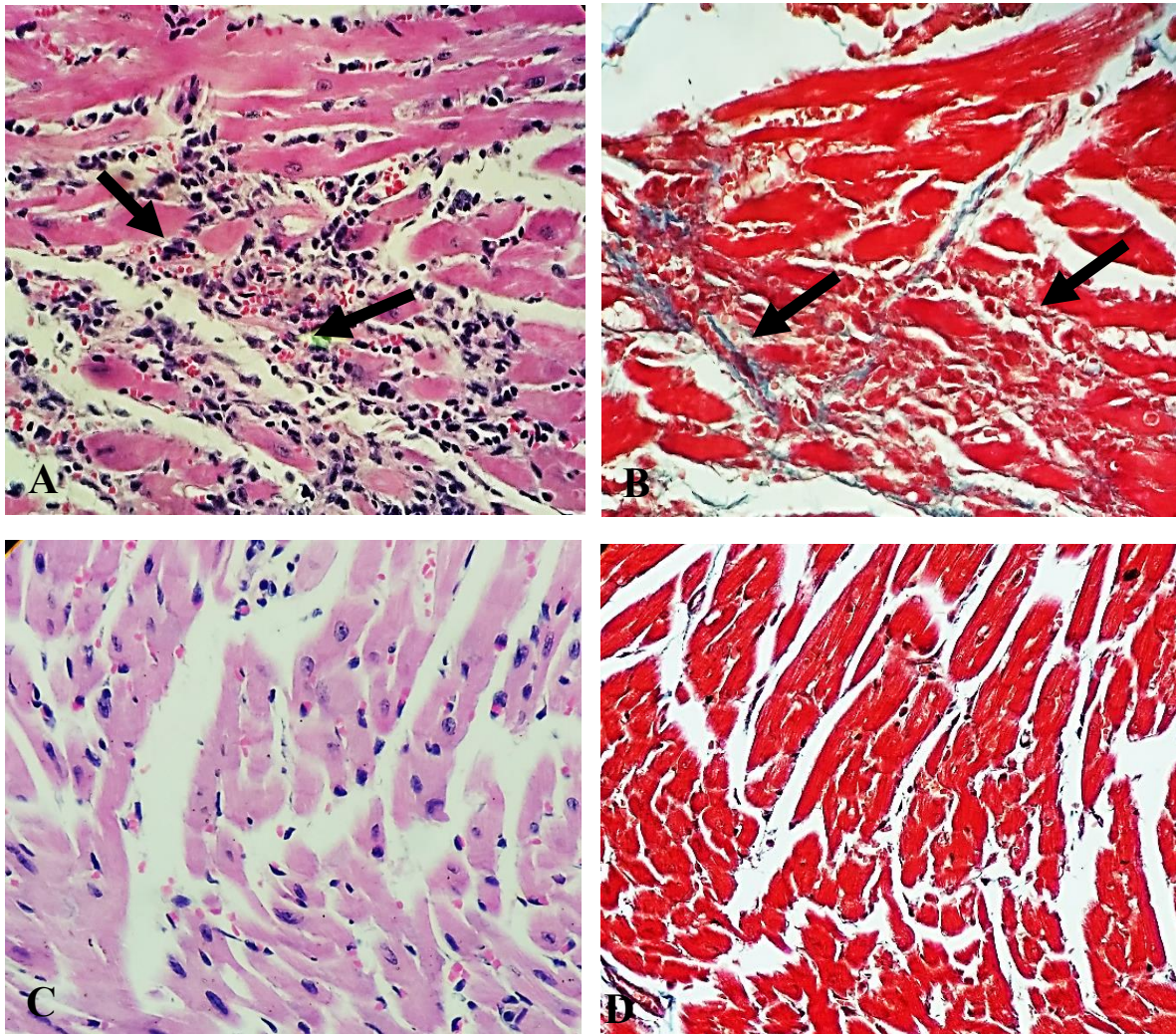


Figura 12: día 40. A – Ventriculo derecho: infiltrado intersticial miocárdico de tipo linfocitario (flechas), tinción H.E., 40 X. B – Ventriculo derecho: lesiones fibróticas incipientes extensas con infiltrado (flechas), tinción Masson, 40 X. C – Ventriculo derecho: miocardio de ratón control, tinción H.E., 40 X. D - Ventriculo derecho: miocardio de ratón control, tinción Masson, 40 X.

Día 50 – Infiltrado linfocitario en miocardio y lesiones fibróticas incipientes

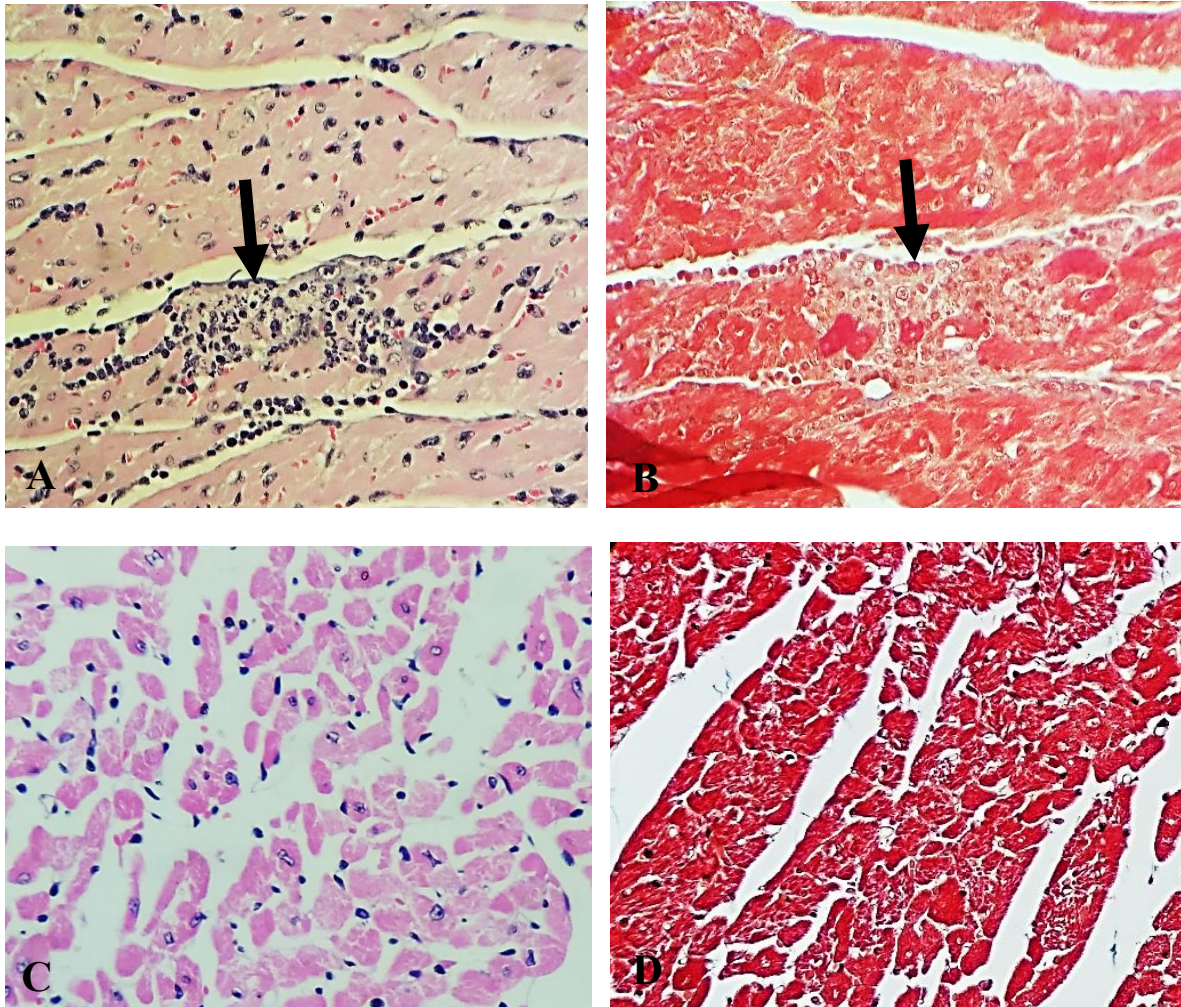


Figura 13: día 50. A – Ventriculo izquierdo: infiltrado intersticial miocárdico de tipo linfocitario (flechas), tinción H.E., 40 X. **B** – Ventriculo izquierdo: intensas lesiones fibróticas incipientes con infiltrado (flechas), tinción Masson, 40 X. **C** – Ventriculo izquierdo: miocardio de ratón control, tinción H.E., 40 X. **D** - Ventriculo izquierdo: miocardio de ratón control, tinción Masson, 40 X.

Día 60 – Infiltrado linfocitario y lesiones fibróticas incipientes

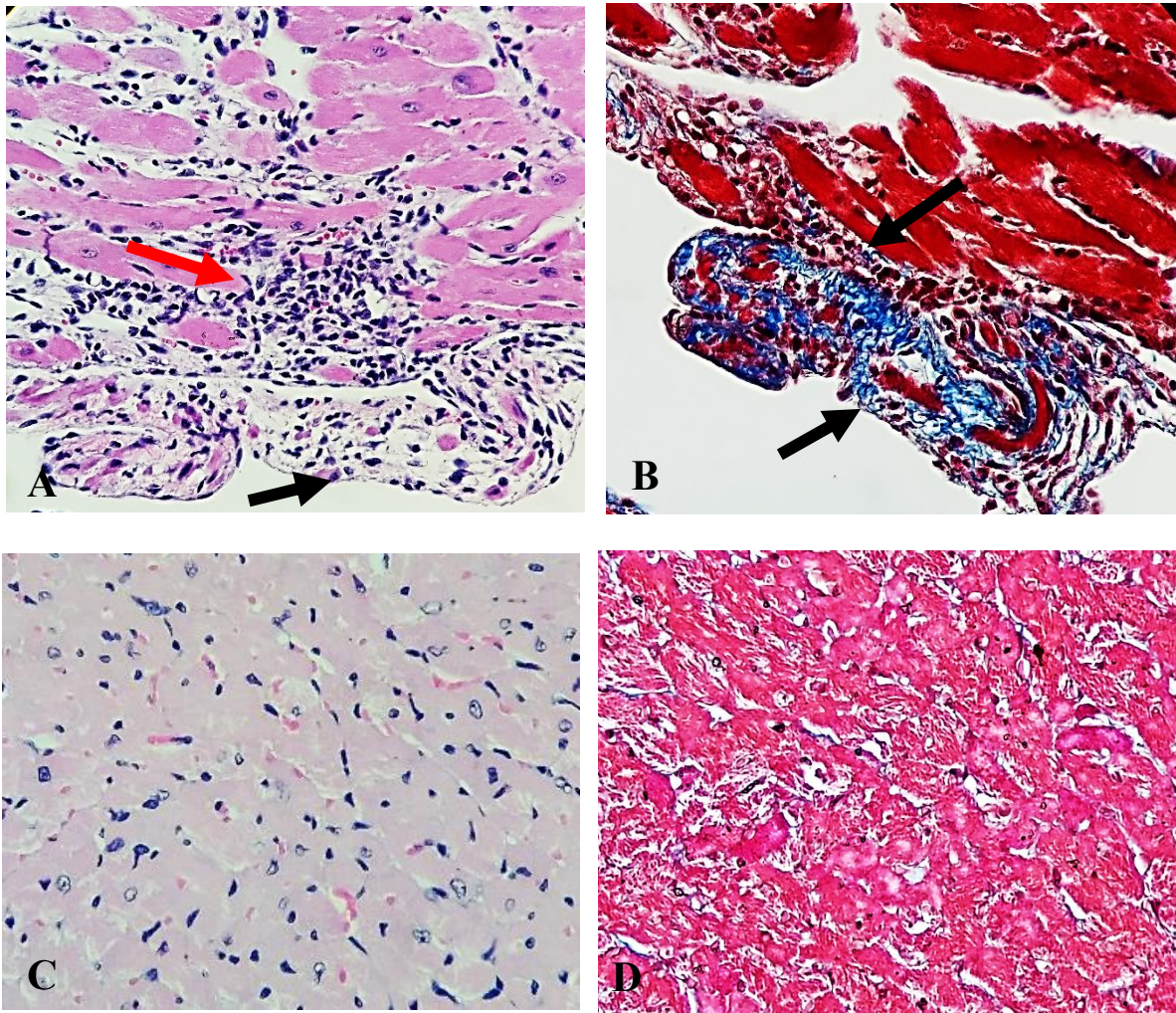


Figura 14: día 60. **A** – Ventriculo derecho: infiltrado intersticial miocárdico (flecha roja) y endocárdico (flecha negra) de tipo linfocitario, tinción H.E., 40 X. **B** – Ventriculo derecho: lesiones fibróticas incipientes con infiltrado (flechas), tinción Masson, 40 X. **C** – Ventriculo derecho: miocardio de ratón control, tinción H.E., 40 X. **D** - Ventriculo derecho: miocardio de ratón control, tinción Masson, 40 X.

8.3.2 Células del infiltrado

Las microfotografías representativas de los diferentes tipos de infiltrado se presentan en las figuras 15-18; infiltrado plasmocitario (Figura 15), linfocitario con escasos macrófagos (Figura 17) e infiltrado mixto, compuesto de linfocitos, escasos macrófagos y algunos neutrófilos (Figura 18). La figura 16 muestra un infiltrado de linfocitos con imágenes de lesión vacuolar de miocardiocitos, encontrado a los 57 dpi.

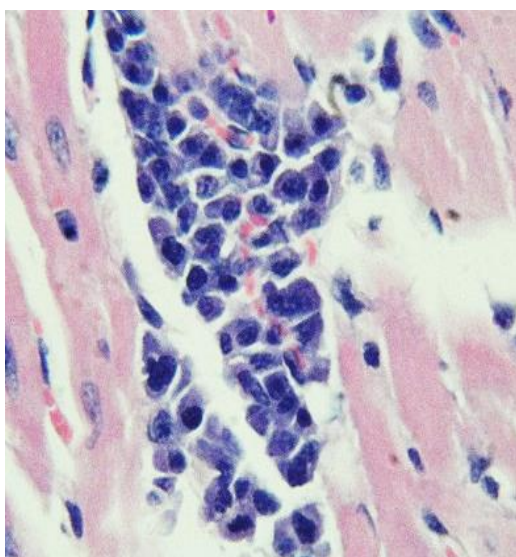


Figura 15: día 43 Ventriculo derecho. Infiltrado intersticial miocárdico de tipo plasmocitario, tinción H.E., 40 X.

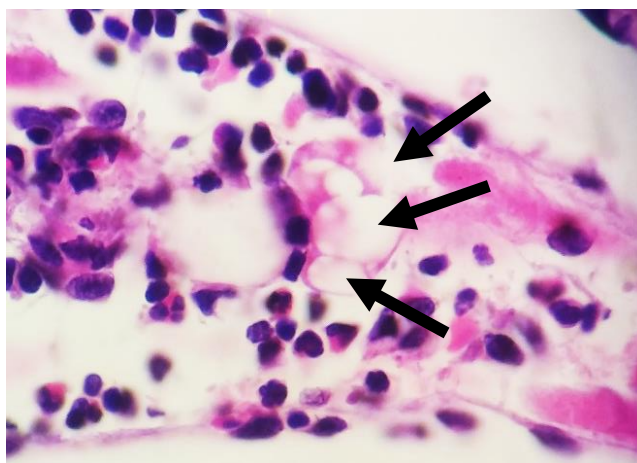


Figura 16: día 57 Ventriculo derecho. Infiltrado intersticial miocárdico de tipo linfocitario con imágenes de lesión vacuolar de miocardiocitos (flechas), donde se observa el citoplasma, tinción H.E., 100 X.

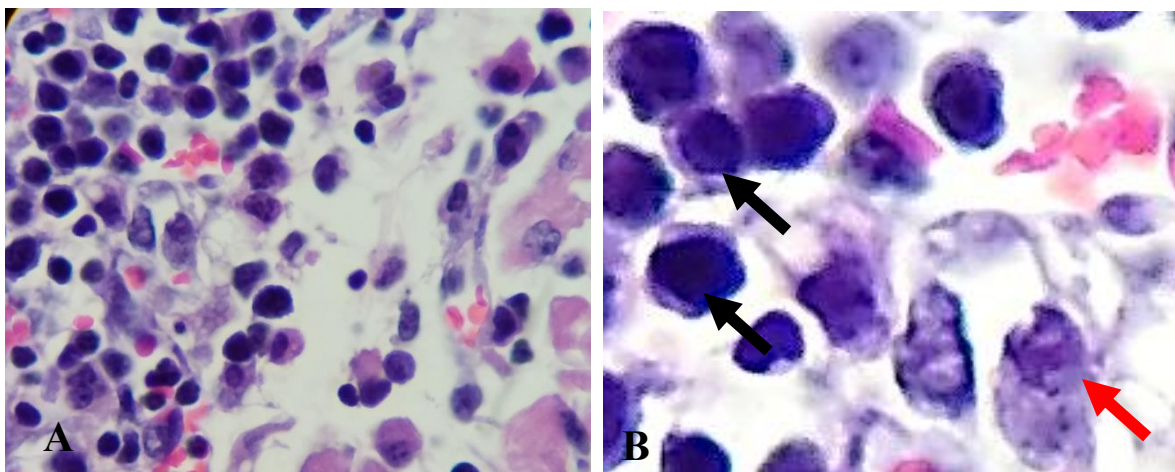


Figura 17: día 40 Ventriculo izquierdo. **A** - Infiltrado intersticial miocárdico de tipo linfocitario, tinción H.E., 100 X. **B** – Acercamiento del infiltrado linfocitario; se observan abundantes linfocitos (flechas negras) y escasos macrófagos (flecha roja).

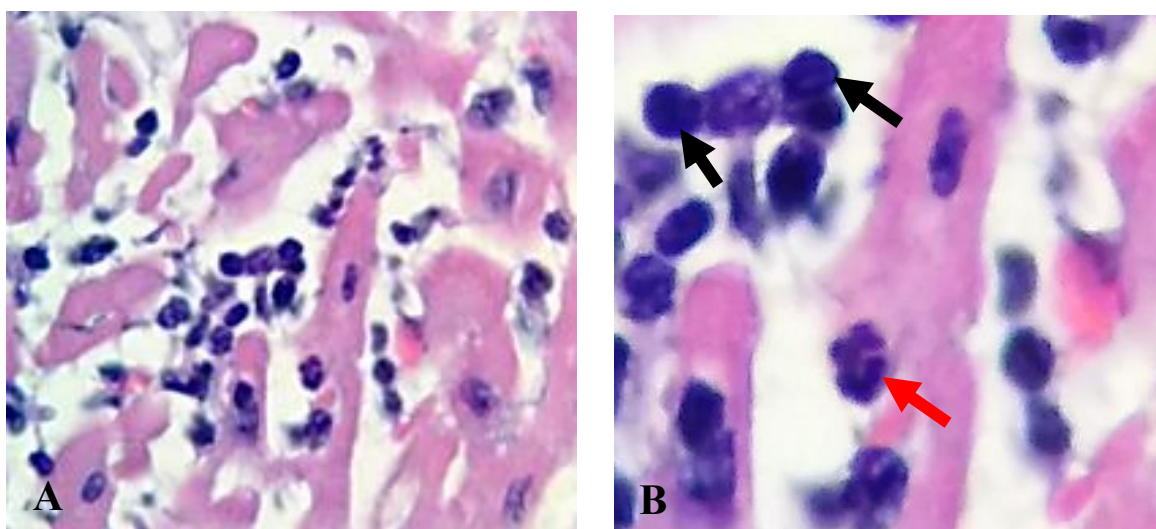


Figura 18: día 29 Ventriculo derecho. **A** - Infiltrado mixto intersticial miocárdico, tinción H.E., 100 X. **B** – Acercamiento del infiltrado mixto; se observan linfocitos (flechas negras) y neutrófilos (flecha roja), tinción H.E.

8.3.3 Conteo con cuadrícula a diferentes tiempos de infección

Las microfotografías más representativas de la lesión en miocardio a diferentes tiempos de infección (0 dpi, 10 dpi, 20 dpi, 30 dpi, 40 dpi, 50 dpi y 60 dpi) se presentan en las figuras 19-26.

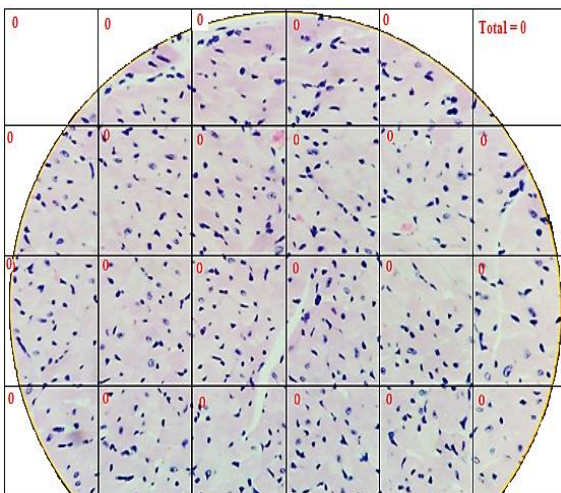


Figura 19. Día 0 Ventrículo izquierdo. Miocardio de ratón infectado al día 0 de la infección. No se encontraron nidos de amastigotes con el método de conteo por cuadrícula, tinción H.E., 40 X.

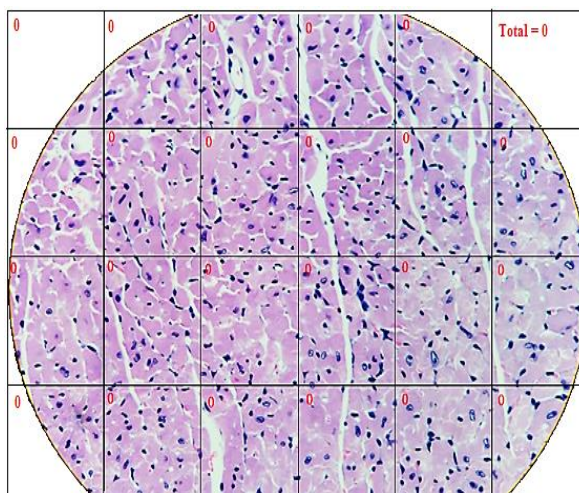


Figura 20. Día 10 Ventrículo derecho. Miocardio de ratón infectado al día 10 de la infección. No se encontraron nidos de amastigotes con el método de conteo por cuadrícula, tinción H.E., 40 X.

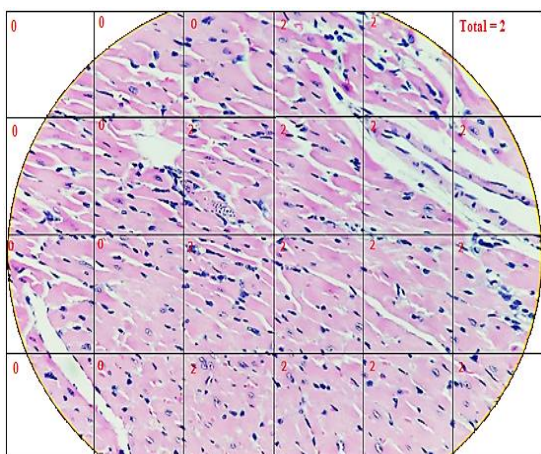


Figura 21. Día 20 Ventrículo izquierdo. Miocardio de ratón infectado al día 20. En este campo se contaron 2 nidos de amastigotes con el método de cuadrícula, tinción H.E., 40 X.

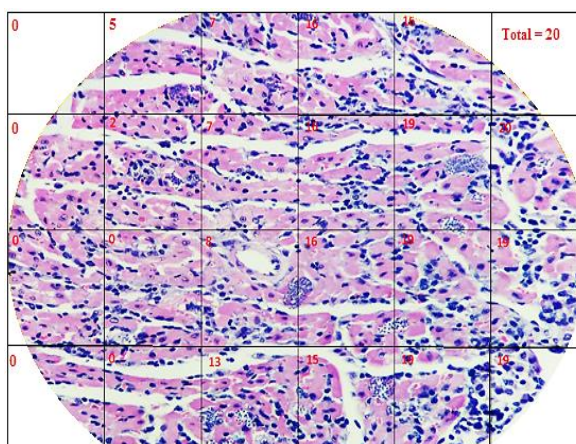


Figura 22. Día 30 Ventrículo izquierdo. Miocardio de ratón infectado a los 30 dpi. En este campo se contaron 20 nidos de amastigotes con el método de cuadrícula, tinción H.E., 40 X.

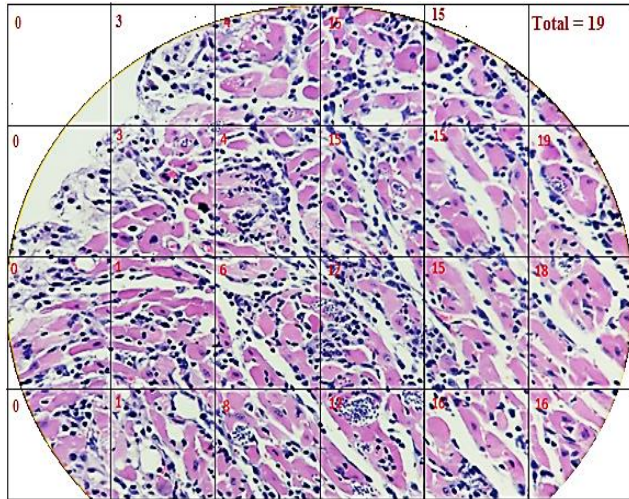


Figura 23. Día 33 Ventriculo derecho. Miocardio de ratón infectado a los 33 dpi. En este campo se contaron 19 nidos de amastigotes con el método de cuadrícula, tinción H.E., 40 X. Se incluyó este campo por ser un caso representativo.

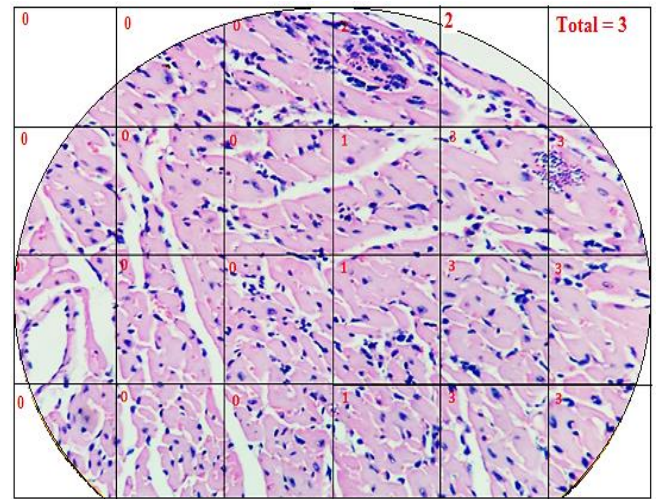


Figura 24. Día 40 Ventriculo derecho. Miocardio de ratón infectado a los 40 dpi. En este campo se contaron 3 nidos de amastigotes con el método de cuadrícula, tinción H.E., 40 X.

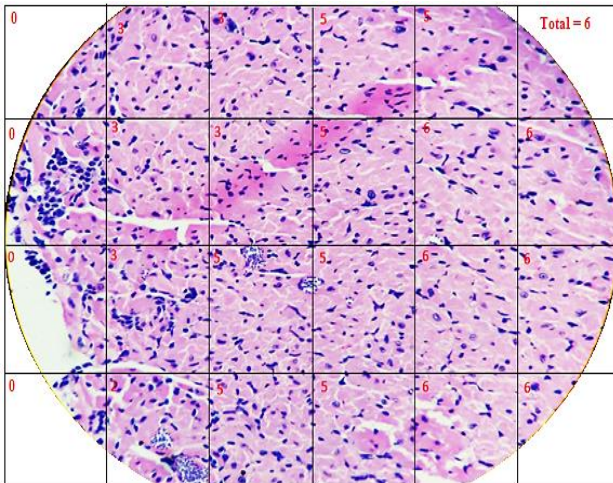


Figura 25. Día 50. Ventriculo izquierdo. Miocardio de ratón infectado a los 50 dpi. Se contaron 6 nidos de amastigotes en este campo con el método de cuadrícula, tinción H.E., 40 X

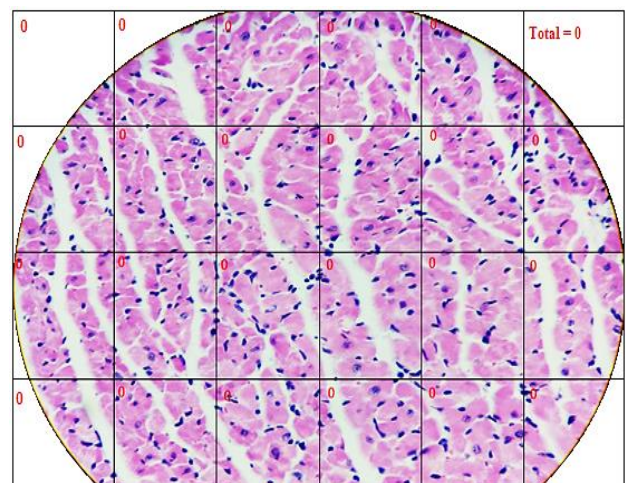


Figura 26. Día 60 Ventriculo derecho. Miocardio de ratón infectado a los 60 dpi. No se encontraron nidos de amastigotes con el método de cuadrícula, tinción H.E., 40 X.

8.3.4 Prevalencia de nidos de amastigotes

Como se observa en la Figura 27, la prevalencia de nidos de amastigotes aumentó conforme al tiempo después de la inoculación, a partir del día 15 y desapareció a los 57 dpi.

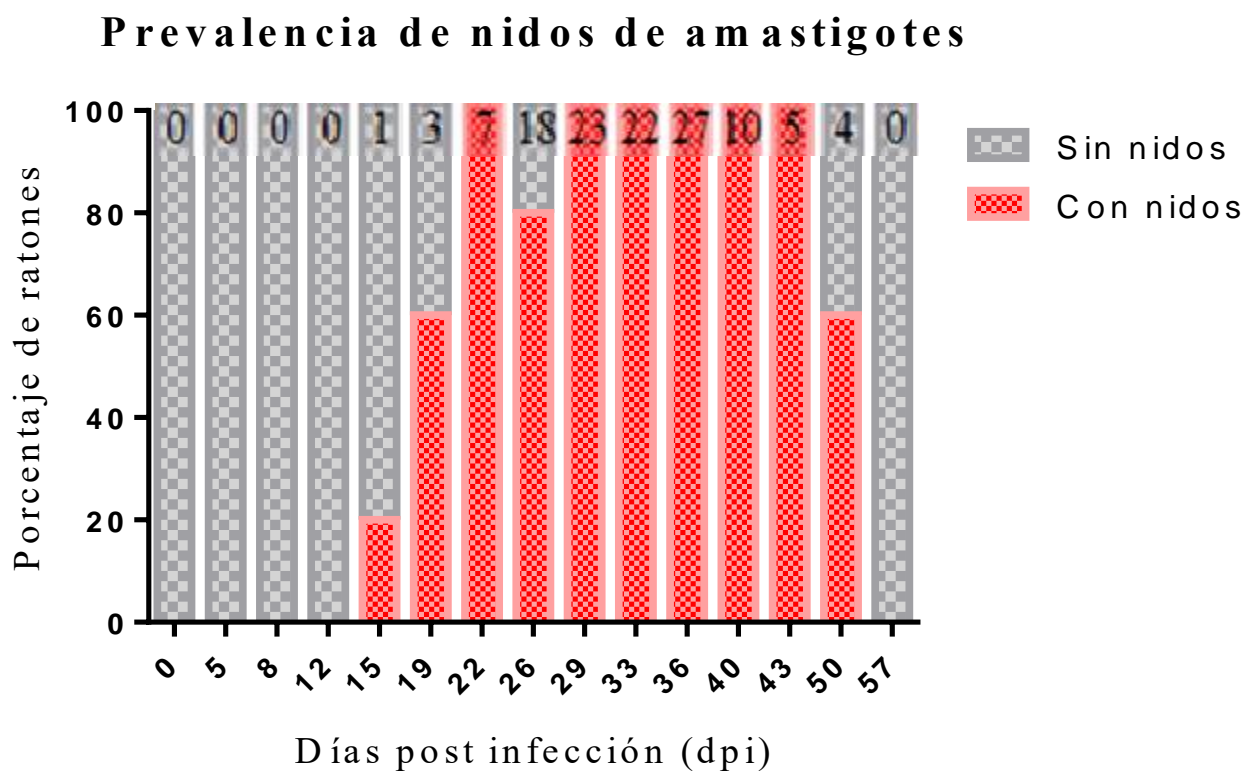


Figura 27. Gráfico de la prevalencia de nidos de amastigotes en ratones. En cada día de eutanasia se utilizaron en total cinco ratones infectados. En la parte superior de cada columna se encuentra el promedio de los nidos de amastigotes que presentaron los ratones de acuerdo con el día.

En la comparación entre la curva de parasitemia y la curva de nidos de amastigotes, se observó un comportamiento similar con un máximo de parasitemia de 10.9×10^6 parásitos/mL con inicio a los 33 dpi, mientras que el máximo de nidos de amastigotes fue de 28 por corte e inició a los 36 dpi. En la curva de parasitemia se observa decremento progresivo a partir de los 36 dpi, a diferencia de la curva de nidos de amastigotes, la cual decayó a partir de los 40 dpi (Figura 28).

Es relevante señalar que a partir de los 50 dpi no se observaron parásitos en sangre con persistencia de nidos de amastigotes en corazón hasta los 57 dpi (Figura 28).

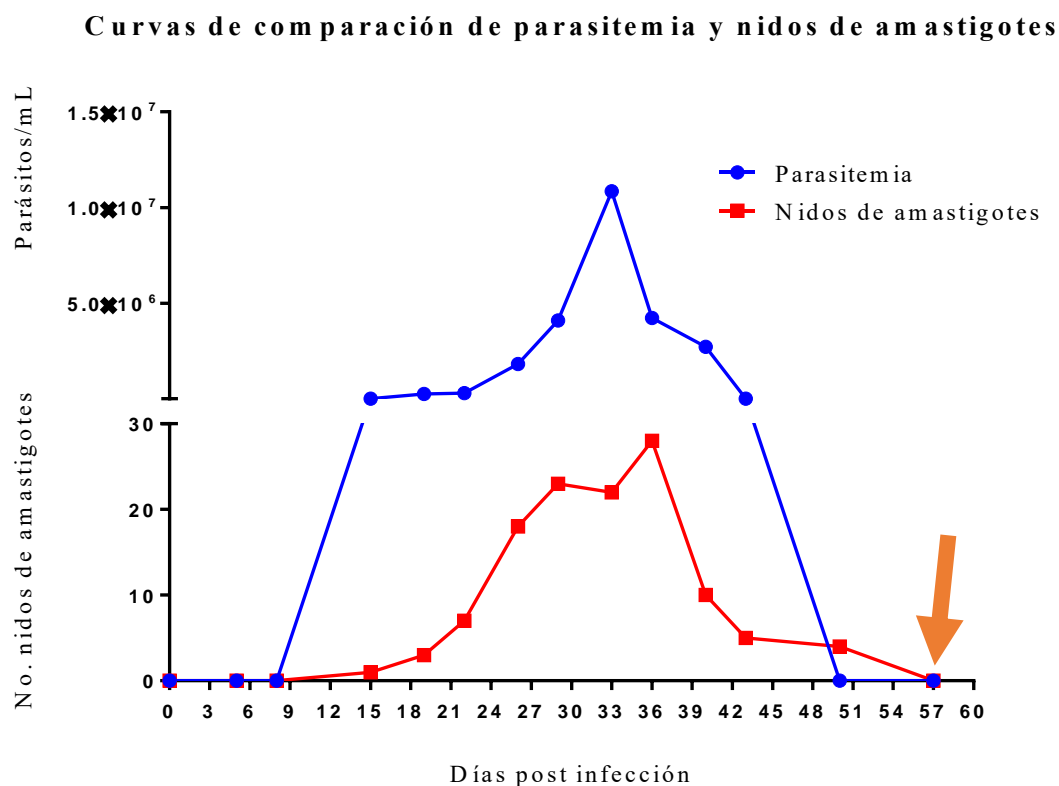


Figura 28. Curvas comparativas de parasitemia y nidos de amastigotes, ambas realizadas con los promedios. La flecha sugiere el posible inicio de la fase crónica en este modelo.

8.3.5 Prevalencia de infiltrado linfocitario y mixto

Como se observa en la Figura 29, se encontró predominantemente infiltrado de tipo linfocitario (como se ilustró en la figura 17) desde los 8 dpi hasta los 57 dpi. Asimismo, se registró la presencia de zonas de infiltrado mixto (como se ilustró en la figura 18), las cuales se observaron principalmente entre los 22 dpi y los 36 dpi.

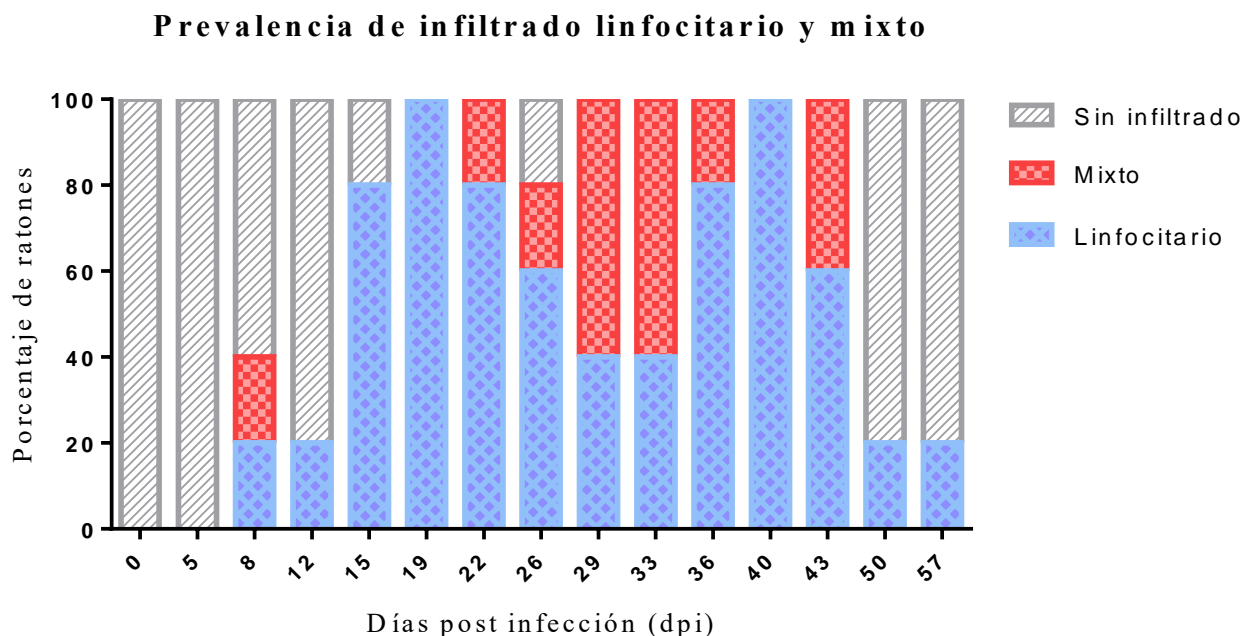


Figura 29. Gráfico del tipo de infiltrado. Linfocitario: linfocitos con algunos macrófagos; Mixto: linfocitos con escasos macrófagos y neutrófilos.

En todos los casos, el infiltrado se encontró en miocardio; sin embargo, también se observó en endocardio y/o epicardio en menor proporción. Cabe destacar que a partir de los 33 dpi hasta los 43 dpi, la mayoría de los ratones tuvo infiltrado en todas las capas observadas al corte (Figura 30).

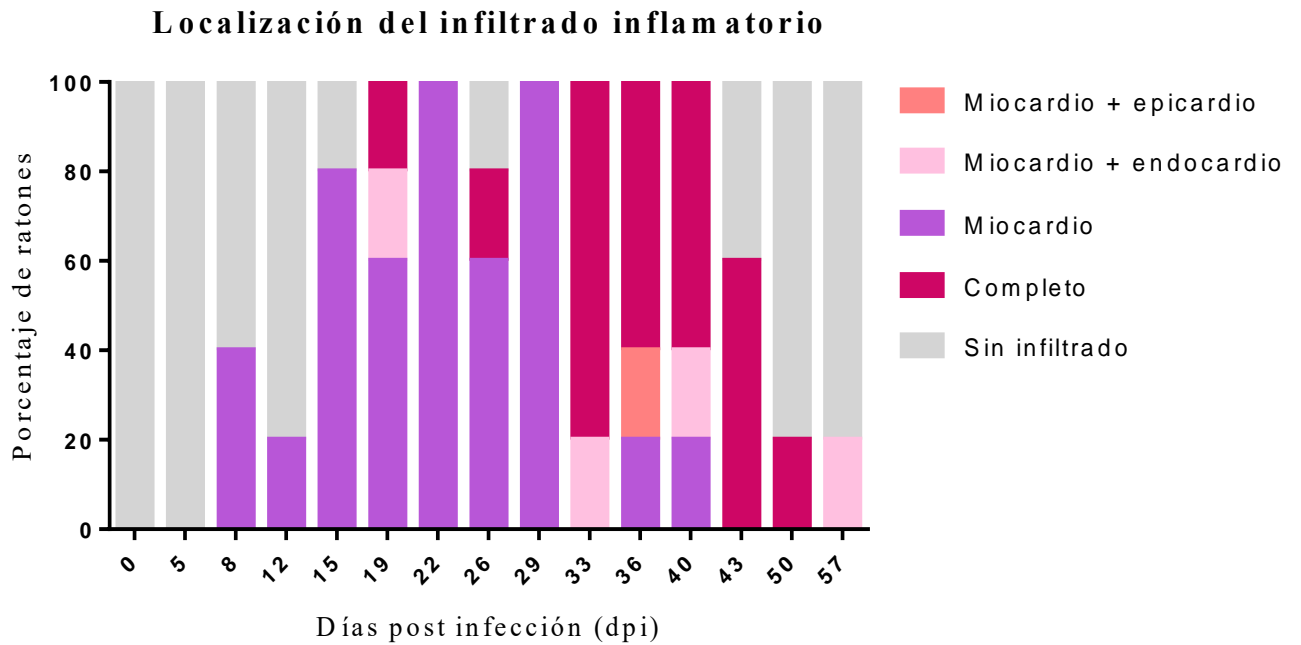


Figura 30. Gráfico de la localización del infiltrado. Se utilizó el término “completo” para denominar la presencia del infiltrado tanto en miocardio como en epicardio y endocardio.

8.3.6 Prevalencia de lesiones fibróticas incipientes

Se encontraron lesiones fibróticas incipientes a partir de los 8 dpi y de los 15 dpi a los 57 dpi se observaron con patrón unifocal y multifocal. Se destaca la presencia de lesiones fibróticas incipientes multifocales en la mayoría de los cortes a los 33 dpi, a diferencia de los demás días, donde en la mayoría de los cortes se encontró un patrón de predominio unifocal (Figura 31).

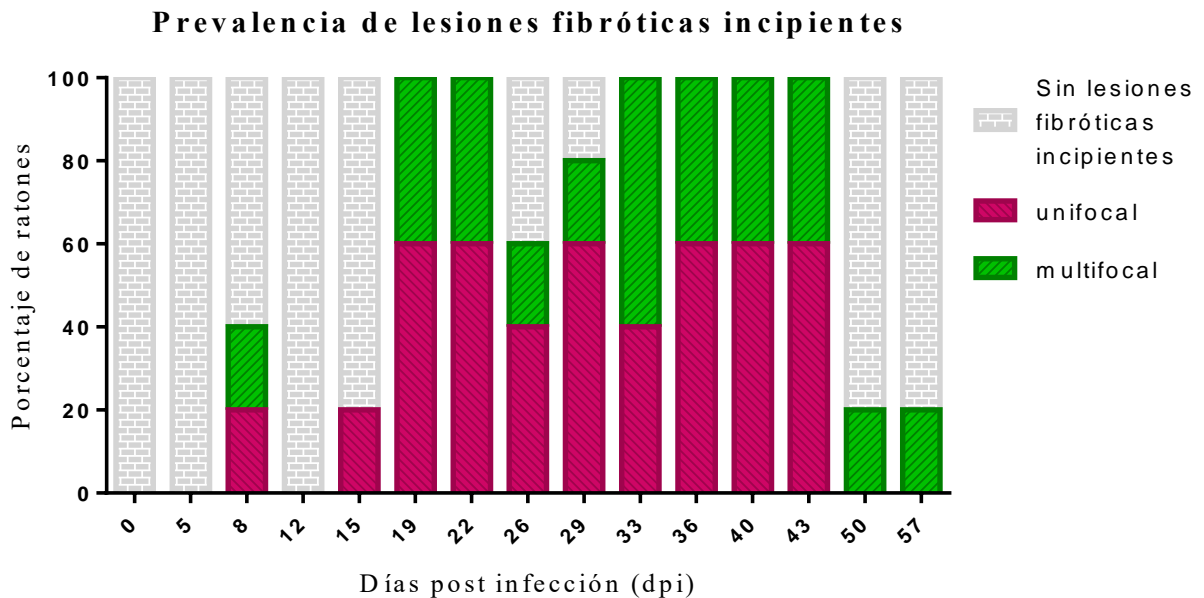


Figura 31. Gráfico de la prevalencia de lesiones fibróticas incipientes.

8.3.7 Gráficos de correlación

En el gráfico de correlación entre el número de nidos de amastigotes y la parasitemia se observa que existe una correlación fuerte y positiva entre dichas variables (Figura 32).

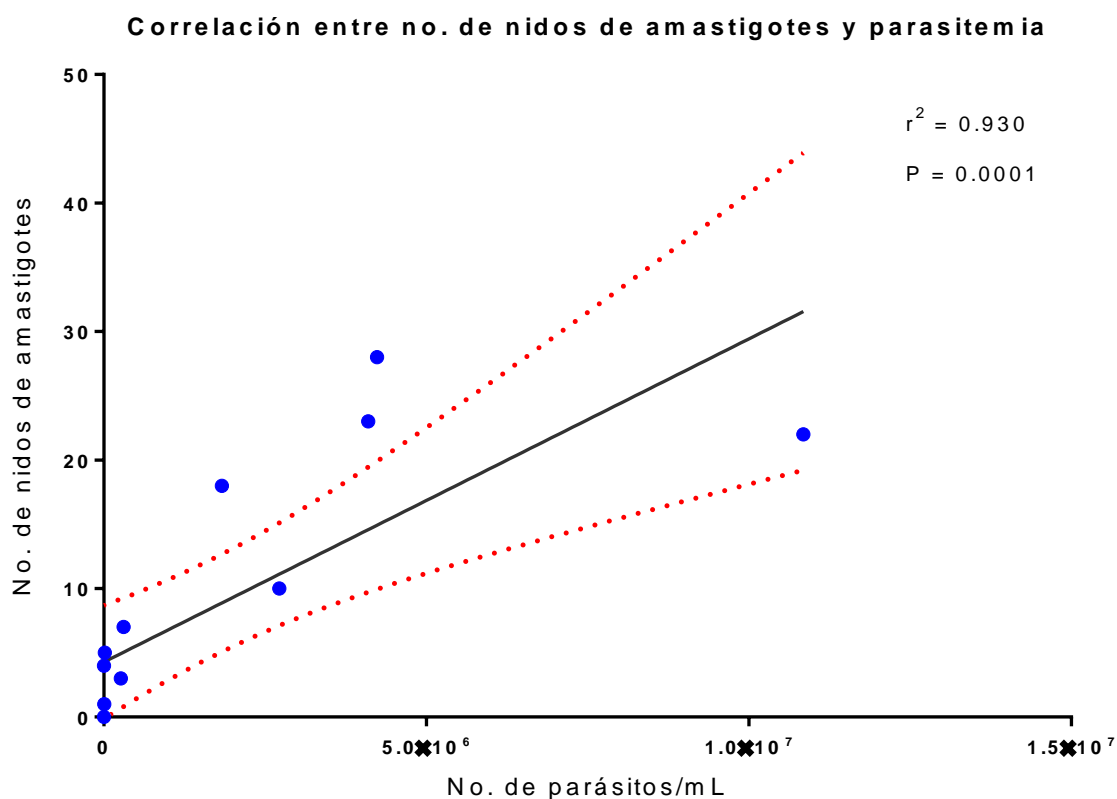


Figura 32. Gráfica de correlación entre parasitemia y nidos de amastigotes. El coeficiente de correlación de Spearman es $r = 0.930$ y el valor de $P < 0.0001$, por lo que la correlación es fuerte y positiva ($0 < r < 1$); el intervalo de confianza es de 95%, de 0.781 a 0.979.

En la Figura 33, se observa el gráfico de correlación entre la parasitemia y el infiltrado, donde no existe una correlación estadísticamente significativa.

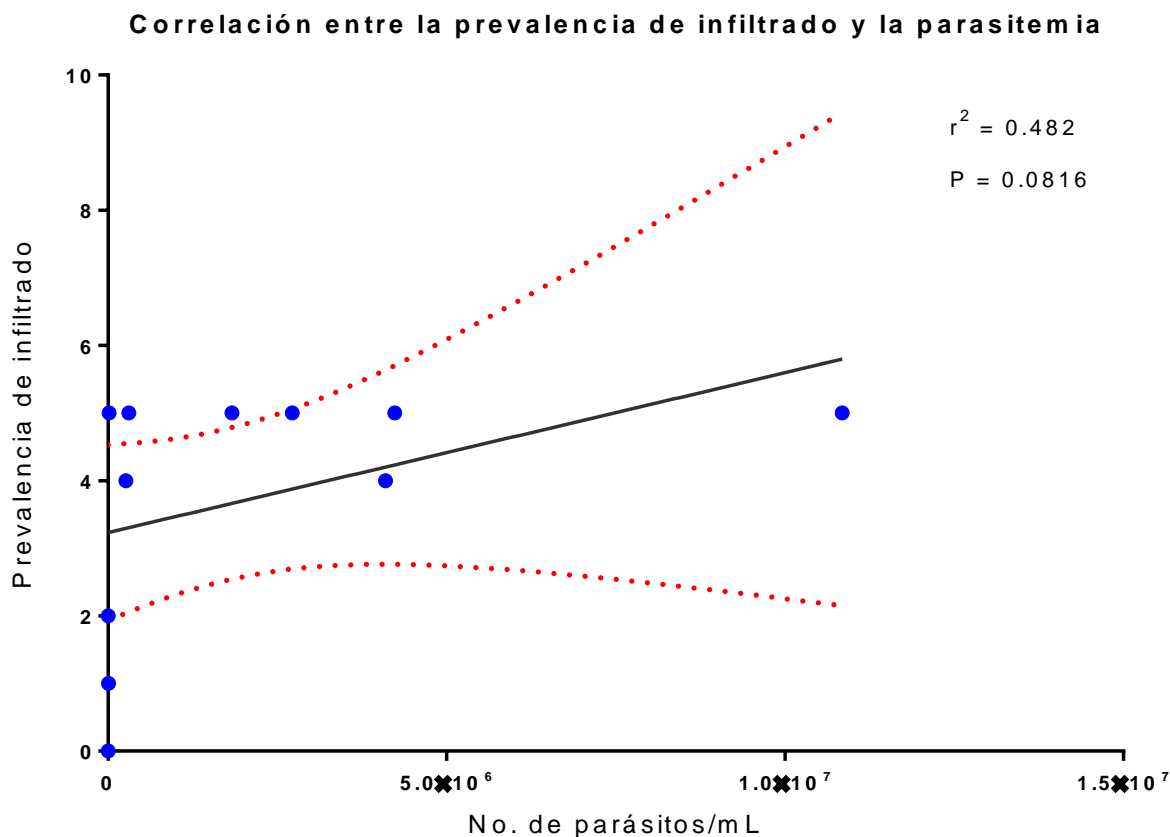


Figura 33. Gráfica de correlación entre parasitemia e infiltrado. El coeficiente de correlación de Spearman es $r = 0.482$ ($0 < r < 1$); sin embargo, el valor de $P < 0.0816$, por lo que dicha correlación no es estadísticamente significativa; el intervalo de confianza es de 95%, de -0.0832 a 0.812.

En el gráfico de correlación entre la parasitemia y las lesiones fibróticas incipientes se observa que no existe una correlación estadísticamente significativa entre dichas variables (Figura 34).

Correlación entre prevalencia de lesiones fibróticas incipientes y parasitemia

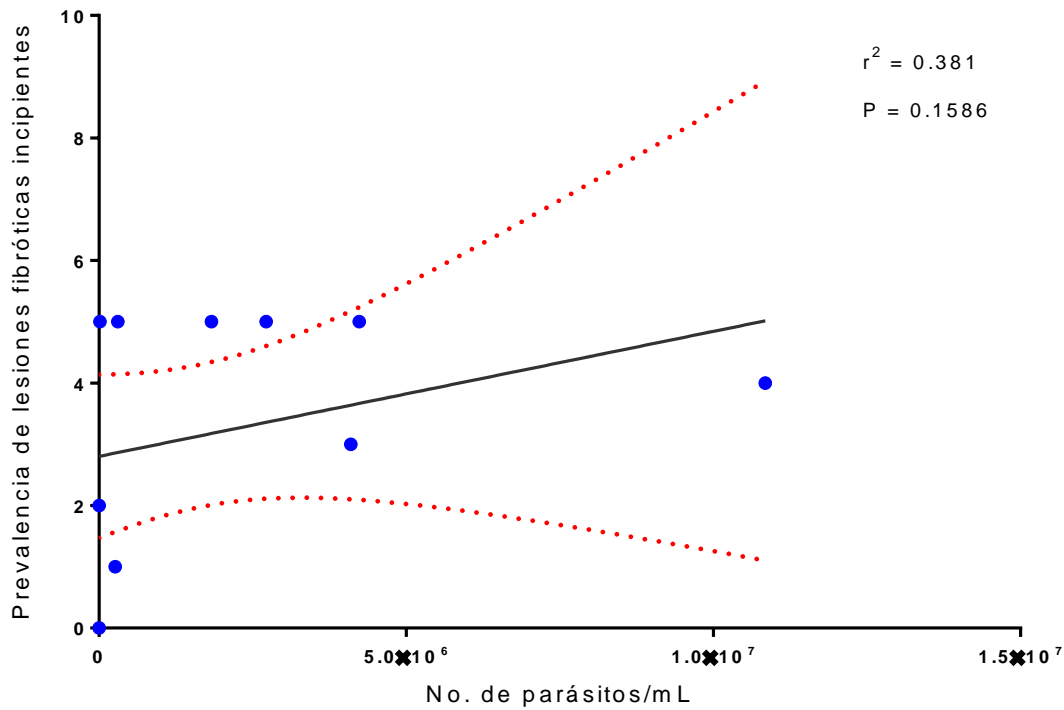


Figura 34. Gráfica de correlación entre parasitemia y lesiones fibróticas incipientes. El coeficiente de correlación de Spearman es $r = 0.381$ ($0 < r < 1$); sin embargo, el valor de $P < 0.1586$, por lo que dicha correlación no es estadísticamente significativa; el intervalo de confianza es de 95%, de -0.179 a 0.755.

En el gráfico de correlación entre los nidos de amastigotes y el infiltrado, se observa que no existe una correlación estadísticamente significativa entre dichas variables (Figura 35).

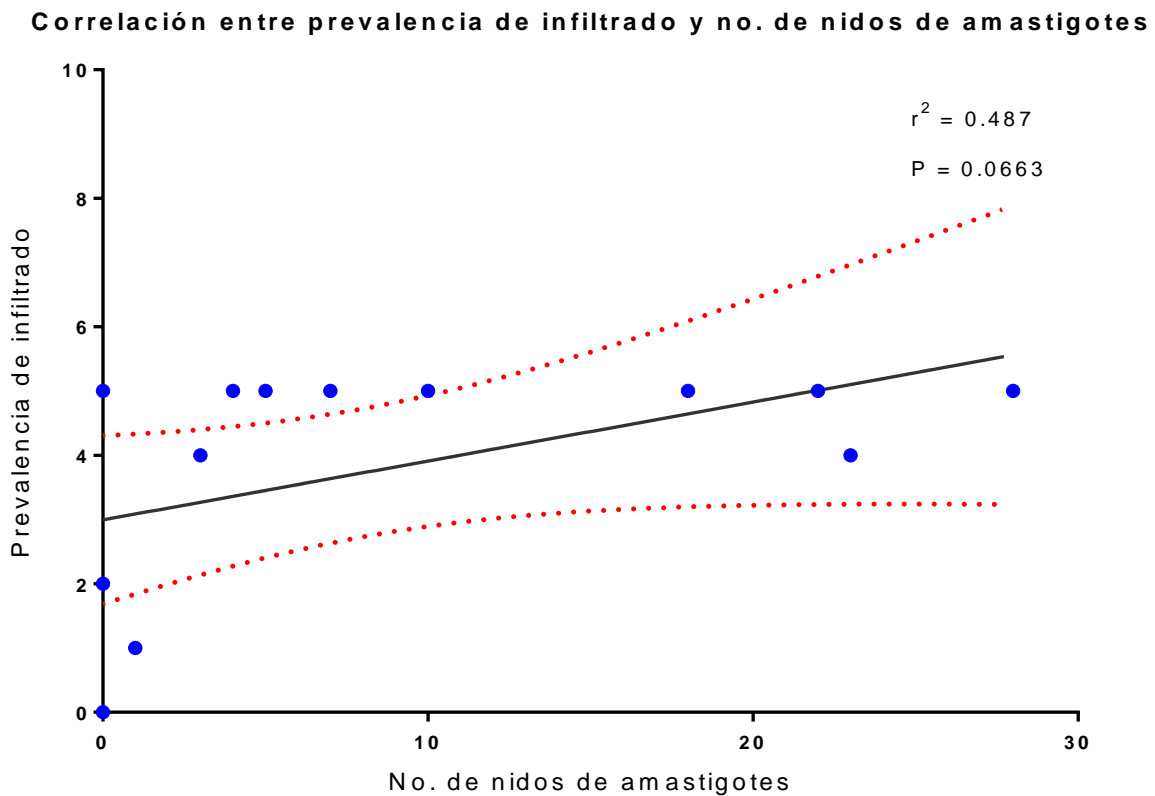


Figura 35. Gráfica de correlación entre nidos de amastigotes e infiltrado. El coeficiente de correlación de Spearman es $r = 0.487$ ($0 < r < 1$); sin embargo, el valor de $P < 0.0663$, por lo que dicha correlación no es estadísticamente significativa. El intervalo de confianza es de 95%, de -0.0501 a 0.806.

En el gráfico de correlación entre los nidos de amastigotes y la prevalencia de lesiones fibróticas incipientes, se observa que existe una correlación débil y positiva entre dichas variables (Figura 36).

Correlación entre prevalencia de lesiones fibróticas incipientes y no. de nidos de amastigotes

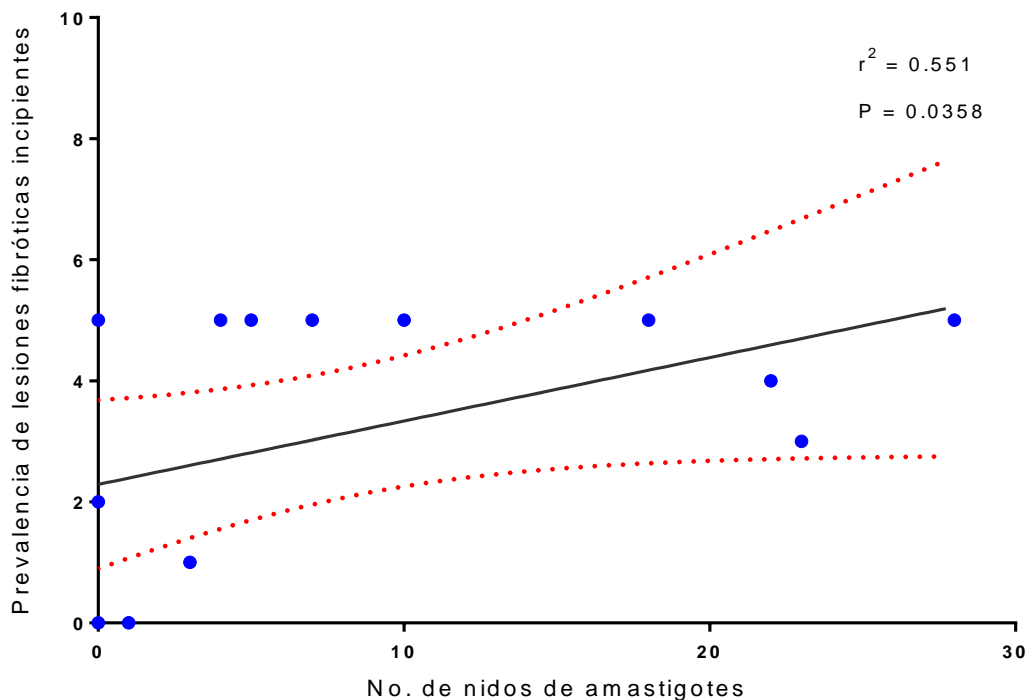


Figura 36. Gráfica de correlación entre nidos de amastigotes y lesiones fibróticas incipientes. Es una correlación positiva, ya que el coeficiente de correlación de Spearman es $r = 0.551$ ($0 < r < 1$) y el valor $P < 0.05$; el intervalo de confianza es de 95%, de 0.0371 a 0.0834.

En el gráfico de correlación entre el infiltrado y la prevalente de lesiones fibróticas incipientes, se observa que existe una correlación fuerte y positiva entre dichas variables (Figura 37).

Correlación entre prevalencia de lesiones fibróticas incipientes y prevalencia de infiltrado

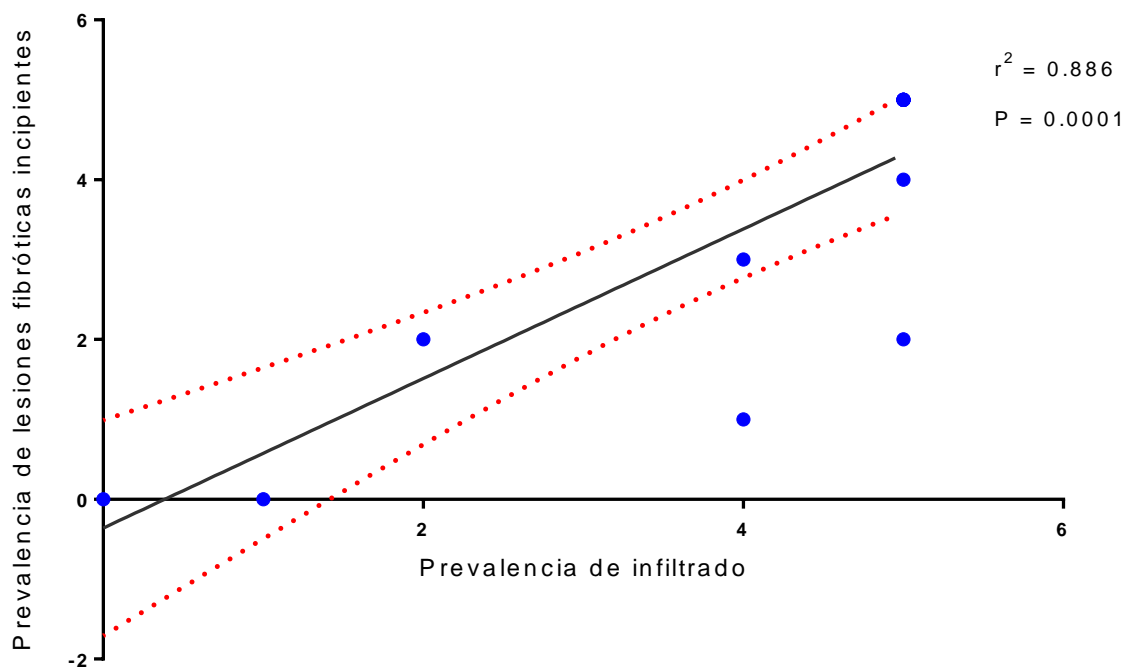


Figura 37. Gráfica de correlación entre infiltrado y lesiones fibróticas incipientes. Es una correlación positiva, ya que el coeficiente de correlación de Spearman es $r = 0.886$ ($0 < r < 1$) y el valor $P < 0.05$; el intervalo de confianza es de 95%, de 0.674 a 0.963.

8.4 Análisis estadísticos

Al realizar la prueba D'Agostino & Pearson para las curvas de parasitemia se observa un valor de $P = 0.0001$ y un valor promedio de $K^2 = 24.03$, lo cual demuestra que los datos no tienen una distribución normal; asimismo, en la prueba de Kruskal-Wallis para las curvas de parasitemia se observa un valor de $P=0.9748$, lo cual indica que el modelo es estable y que, a pesar de que se encontraran valores fuera de rango en las gráficas, el comportamiento de la parasitemia es homogéneo en todos los ratones (Tabla 6).

Tabla 6. Tabla con los promedios de los valores mínimos y máximos de la parasitemia y valor de P del análisis de Kruskal-Wallis.

	<i>Promedio de valores mínimos</i>	<i>Promedio de valores máximos</i>	<i>D'Agostino & Pearson</i>	<i>Kruskal-Wallis</i>
<i>Parasitemia</i>	0	5.427895×10^6	$P = 0.0001$ $K^2 = 24.03$	$P = 0.9746$

En las pruebas de Mantel-Cox y Gehan-Breslow-Wilcoxon para el análisis de supervivencia se observaron diferencias estadísticas significativas entre el Grupo 1 (inóculo de 100 000) y el Grupo 3 (1000), así como entre el Grupo 2 (10 000) y el Grupo 3 (1000), contrario a la comparación entre el Grupo 1 y el Grupo 2, donde no se observó una diferencia estadística significativa (Tabla 7).

Tabla 7. Tabla con los valores de P y de x^2 para las pruebas de Mantel-Cox y Gehan-Breslow-Wilcoxon en el análisis de supervivencia.

	Grupo 1 vs Grupo 2	Grupo 1 vs Grupo 3	Grupo 2 vs Grupo 3
Mantel-Cox	$P = 0.6199$ $x^2 = 0.2460$	$P = 0.0134$ $x^2 = 6.111$	$P = 0.0896$ $x^2 = 2.881$
Gehan-Breslow-Wilcoxon	$P = 0.9196$ $x^2 = 0.01019$	$P = 0.0086$ $x^2 = 6.906$	$P = 0.0282$ $x^2 = 4.819$

Al realizar el análisis de correlación de Spearman se encontró correlación positiva estadísticamente significativa entre las variables parasitemia y nidos de amastigotes, así como nidos de amastigotes y lesiones fibróticas incipientes y, por último, entre infiltrado y lesiones fibróticas incipientes. Es relevante destacar que sólo la correlación entre parasitemia y nidos de amastigotes y la de infiltrado con lesiones fibróticas incipientes son correlaciones fuertes, mientras que la correlación entre nidos de amastigotes y lesiones fibróticas incipientes es débil. Las demás variables no mostraron correlaciones estadísticamente significativas (Tabla 8).

Tabla 8. Tabla de correlación entre parasitemia, nidos de amastigotes, infiltrado y lesiones fibróticas incipientes.

	Parasitemia	Nidos de amastigotes	Infiltrado	Lesiones fibróticas incipientes
Parasitemia	-	r²=0.930 P=0.00001	r ² =0.482 P=0.0816	r ² =0.604 P=0.1586
Nidos de amastigotes	r²=0.930 P=0.00001	-	r ² =0.598 P=0.0663	r²=0.669 P=0.0358
Infiltrado	r ² =0.482 P=0.0816	r ² =0.598 P=0.0663	-	r²=0.725 P=0.0001
Lesiones fibróticas incipientes	r ² =0.604 P=0.1586	r²=0.669 P=0.0358	r²=0.725 P=0.0001	-

Notas: se observa el coeficiente de correlación de Spearman, así como el valor de P para cada una de las variables correlacionadas.

9. DISCUSIÓN

Trypanosoma cruzi es un parásito con una gran heterogeneidad genética, lo cual se refleja en la diversidad de comportamientos clínico-patológicos en el vertebrado, incluido el humano.

Borges y colaboradores, en 2013, demuestran que el incremento del número de parásitos en el inóculo influye disminuyendo las tasas de supervivencia e incrementando la patología de la enfermedad. Con base en esto, en el presente trabajo se confirma que en la cepa que se utilizó existe una diferencia estadísticamente significativa entre la mortalidad de los ratones con los mayores inóculos.

La cepa de estudio ha sido registrada como altamente virulenta, donde se reportó mortalidad en modelo murino a partir de los 18 dpi (De Haro, 1997); sin embargo, en el presente estudio, con el inóculo de 1000 parásitos, la mortalidad se presentó hasta los 40 dpi. Esta diferencia observada en el día de inicio de la mortalidad de los ratones en el estudio reportado por De Haro se debe a un mayor inóculo (1×10^6 parásitos). Dicho inóculo evidentemente induce una mayor mortalidad, que para fines de esta tesis no hubiese permitido el estudio de la fase aguda durante los 60 días referidos.

Respecto al comportamiento biológico del inóculo observado en las curvas de parasitemia, el análisis estadístico permitió inferir que el comportamiento respecto a la variable parasitemia fue homogéneo en el modelo de estudio empleado ($P=0.9746$). A pesar de encontrar un comportamiento homogéneo, se encontraron tres valores fuera de rango, los cuales pueden deberse a las variaciones biológicas inherentes al modelo murino, como genética o sistema inmune de cada hospedero.

La correlación entre las variables parasitemia y nidos de amastigotes muestra que la cantidad de parásitos en sangre se relaciona directamente con la cantidad de nidos de amastigotes en corazón; respecto a esto, Pizzi y colaboradores (2005) señalan que el daño durante la fase aguda se relaciona con la intensidad de la parasitemia y Marin-Neto y colaboradores (2007) refieren el mismo concepto en la evolución de la cardiopatía crónica, donde la presencia y persistencia del parásito desencadenan todos los factores de patogenicidad involucrados en la lesión.

De los demás análisis, en el presente trabajo sólo se encontró correlación entre nidos de amastigotes y lesiones fibróticas incipientes, así como entre infiltrado y lesiones fibróticas incipientes; la primera es positiva y débil, probablemente debido a que inicialmente se presenta el parásito en corazón y, posterior a la lisis de los miocardiocitos, se generan los mecanismos de cicatrización tisular evidenciados por la presencia de fibras de colágena. Por otro lado, el infiltrado linfocitario muestra una relación directa con la presencia de lesiones fibróticas incipientes, lo cual puede deberse al proceso inflamatorio inducido por los linfocitos, que finalmente termina en mecanismos de reparación y remodelación del órgano por medio de fibrosis, característico de la fase crónica, como ha sido descrito por diversos autores (Teixeira et al, 2011; Marin-Neto et al, 2007).

Respecto al análisis histopatológico, la prevalencia de nidos de amastigotes en corazón se incrementó conforme al tiempo de evolución a los 50 dpi para no ser detectable a los 57 dpi. El periodo de tiempo en el que se observan parásitos en sangre ni en miocardio posiblemente corresponde a la transición de la fase aguda hacia la fase crónica de la enfermedad, ya que, como está reportado en la literatura, uno de los factores que caracterizan la fase crónica de la enfermedad es la presencia de parásitos poco detectable (Tafari, 1999). Este periodo ocurre sumamente rápido. Se propone que a partir de los 57 dpi se encuentra el probable inicio de la cronicidad en este modelo; no obstante, sería interesante analizar los criterios a nivel histopatológico que definan dicho inicio. La definición de este periodo es de suma importancia para estudiar con detalle los factores que están involucrados en la evolución de esta fase.

Con respecto al tipo de infiltrado, en este estudio se observaron pequeños infiltrados de tipo principalmente linfocitario y algunos polimorfonucleares, definidos morfológicamente como neutrófilos; De Haro, en 1997, reportó para la misma cepa, aunque con un mayor inóculo, intensos infiltrados multifocales a base de polimorfonucleares, algunos linfocitos y escasos plasmocitos, así como la presencia de nidos de amastigotes, llevando a un cuadro de una miocarditis severa. De manera general, en el presente trabajo se encontraron tres casos de infiltrados compuestos mayoritariamente por células plasmáticas a los 43 dpi y un caso a los 50 dpi. La presencia de estas células está dada por una respuesta humoral prolongada directamente en miocardio e indica una alta producción de anticuerpos

de manera local (Owen et al, 2014). También se encontró la presencia de infiltrado mixto (compuesto de linfocitos y escasos macrófagos y algunos neutrófilos) en menor proporción a partir de los 8 dpi, lo cual concuerda con la literatura, ya que los neutrófilos son las células que responden primero a la infección (Owen et al, 2014). Alrededor de los 30 dpi, se encontró una importante respuesta de neutrófilos a nivel histológico, lo cual sugiere que dichas células son relevantes durante la fase aguda de la enfermedad. Köberle, en 1968, reportó que el infiltrado durante la fase aguda está compuesto principalmente por neutrófilos y eosinófilos, lo cual no fue encontrado en esta tesis.

En cuanto a la localización del infiltrado, en estudios similares se encontraron focos de inflamación de los mismos tipos celulares de ubicación tanto miocárdica (Cárdenas et al, 1975) como subendocárdica (Pizzi et al, 2005), epicárdica y endocárdica (Magarinos Torres, 1941), a diferencia de esta tesis, donde la ubicación predominante fue miocárdica, a pesar de que se encontraron escasos focos de inflamación endocárdica y epicárdica. Evidentemente, ITRI/MX/1986/QRO es una cepa cardiotrópica, donde se encontró el infiltrado prevalentemente en miocardio, lo cual es importante por las implicaciones de las funciones a nivel orgánico. La presencia de infiltrado en epicardio podría implicar un cuadro más severo de la enfermedad, ya que el infiltrado se origina en miocardio y posteriormente se extiende hacia la periferia. Es probable que debido a este comportamiento se observe que, a partir de los 30 dpi, se registraron varios casos con pancarditis. Posteriormente, a partir de los 50 dpi, disminuyó tanto la localización como la cantidad de infiltrado. Aunado a esto, no se observó ninguna asociación estadísticamente significativa entre la localización del infiltrado y las zonas de nidos de amastigotes, lo cual concuerda con estudios previos al respecto (Cárdenas et al, 1975; Marin-Neto et al, 2007). Es importante referir que el infiltrado se genera en respuesta a la presencia del parásito, por lo que a pesar de que en esta tesis no se haya observado una diferencia estadística, sí se observó en los cortes algunas zonas de infiltrado con nidos de amastigotes. Para encontrar una relación más estrecha entre estos dos factores, se puede incrementar los planos de corte.

Con respecto a las lesiones fibróticas incipientes, se encontraron fibras musculares cardíacas con lesiones fibróticas incipientes intersticiales a partir de los 8 dpi y se mantuvieron de los 15 dpi a los 57 dpi, lo cual no está reportado en la literatura durante la

fase aguda de la enfermedad de Chagas. Debido a los resultados observados, se puede inferir que durante la fase aguda las lesiones fibróticas incipientes se van dando a través del tiempo como reparación constante al daño ocasionado al miocardio directamente por la presencia del parásito. En la literatura está reportado que la fibrosis representa una etapa tardía en el desarrollo de las lesiones chagásicas durante la fase crónica (Rossi, 1991); en este modelo, se observa que todos los factores ocurren al mismo tiempo durante la fase aguda de la enfermedad. Es destacable la presencia de lesiones fibróticas incipientes desde la fase aguda de la enfermedad, ya que, al ser un mecanismo irreversible, puede afectar gravemente las funciones del órgano. En casos reportados previamente por Salazar y colaboradores en 2016, se ha señalado daño a nivel orgánico, como hipertrofia septal y parietal como consecuencia de procesos inflamatorios y fibróticos en miocardio, lo cual lleva al deterioro de las funciones cardíacas; asimismo, en este estudio se reporta daño incipiente, que puede ser producto de una fibrosis inicial. La detección de estas lesiones incipientes puede determinar el inicio de las lesiones cardíacas ocasionadas por *Trypanosoma cruzi*, como lo mencionan Salazar y colaboradores en 2016.

Finalmente, con respecto a las modificaciones histológicas atípicas del miocardio, se observaron espacios que refieren miocardiocitos con lesión vacuolar; es posible que se trate de espacios que deja el amastigote al llevar a cabo los 9 ciclos de reproducción referidos después de la primoinfección (Andrade y Andrews, 2005); si bien éstos no fueron motivo de este estudio, en la caracterización histopatológica fueron referidos por su alta prevalencia.

Por último, a continuación se encuentra una descripción gráfica del inicio y la evolución de la parasitemia y la presencia de nidos de amastigotes, infiltrado y lesiones fibróticas incipientes para esta cepa.

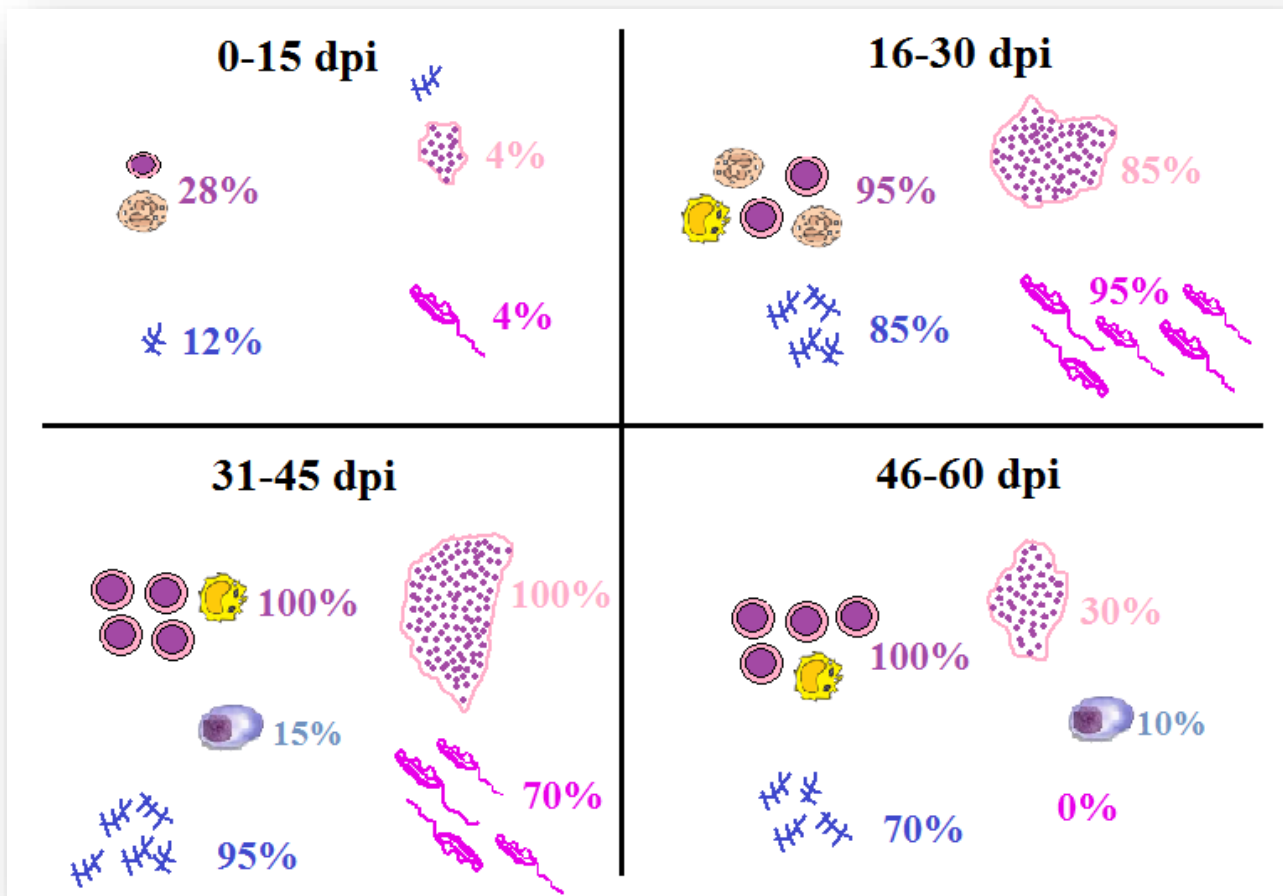







Figura 38. Esquema de la evolución de la lesión por la cepa ITRI/MX/1986/QRO (cardiotrópica). Se observa el porcentaje de ratones que presentaron cada una de las variables estudiadas:

 = nidos de amastigotes,
  = lesiones fibróticas incipientes,
  = infiltrado linfocitario y mixto,
  = parasitemia,
  = infiltrado plasmocitario.

10. CONCLUSIONES

- El inóculo de 1000 parásitos fue adecuado para obtener una sobrevida en el modelo murino que permitiera observar la evolución de las lesiones durante la fase aguda e inicio de la cronicidad a partir del día 57.
- Durante la fase aguda se encontró un infiltrado principalmente linfocitario y acompañado de neutrófilos en miocardio; se infiere que esta última célula es indicadora de esta fase.
- La presencia de lesiones fibróticas incipientes observadas en este modelo como un mecanismo de reparación que se presenta de manera constante durante la fase aguda no ha sido reportada anteriormente durante dicha fase y probablemente corresponde al inicio de la lesión crónica descrita tradicionalmente.
- El número de nidos de amastigotes y parásitos en sangre tiene una correlación fuerte y positiva. Se determina una marcada disminución de la presencia de parásitos en sangre y posteriormente en corazón.
- Los nidos de amastigotes y el infiltrado tienen una correlación directa con las lesiones fibróticas incipientes, lo cual implica que ambos son generadores de daño en corazón durante la fase aguda.

11. PERSPECTIVAS

- Es necesario ampliar los estudios a partir de los 57 dpi para analizar con mayor detalle la posible transición de la fase aguda a la fase crónica de la enfermedad.
- Es pertinente analizar la función de las células encontradas en el infiltrado, como macrófagos, neutrófilos y linfocitos por inmunohistoquímica o citometría de flujo.
- Se requiere de estudios para analizar el tipo de anticuerpos están produciendo los plasmocitos presentes a los 43 y 50 dpi.
- Es necesario analizar la presencia de fibroblastos con relación a las lesiones fibróticas incipientes, ya sea haciendo un marcaje de fibroblastos por medio de inmunohistoquímica o realizando cortes semifinos.

12. REFERENCIAS

- Aguilar JH. 2004. Caracterización biológica e inmunohistoquímica de cuatro aislados de *Trypanosoma cruzi*. Tesis para obtener el título de Biólogo. Facultad de Ciencias, UNAM.
- 62^a Asamblea Mundial de la Salud. Punto 12.12, Orden del Día Provisional, 20 de marzo de 2009. Enfermedad de Chagas: control y eliminación. OMS/A62/17/2009.
- Aluja A. 1985. Miocarditis por *Trypanosoma cruzi* en un perro. Veterinaria México. 16: 41-44.
- Andrade L and Andrews N. 2005. The *Trypanosoma cruzi*-host-cell interplay: location, invasion, retention. Nature Reviews Microbiology. doi:10.1038.
- Andrade S, Stocker-Guerret S, Pimentel A and Grimaud J. 1991. Reversibility of cardiac fibrosis in mice chronically infected with *Trypanosoma cruzi*, under specific chemotherapy. Oswaldo Cruz Institute. Brazil. 86 (2): 187-200.
- Baruch A. 2013. Parasitología Humana. McGraw-Hill Interamericana Editores, S.A. de C.V. México. pp. 282-296.
- Becerril M. 2014. Parasitología Médica. Cuarta Edición. McGraw Hill Interamericana Editores, S.A. de C.V. México. pp. 95-104.
- Berger S. 2015. American Trypanosomiasis: Global Status. GIDEON Informatics, Inc. Estados Unidos. pp. 5-12.
- Biagi F y Arce GE. 1965. Los dos primeros casos de miocarditis chagásica comprobados en México. Instituto de Cardiología. México; 35: 611-623.
- Borda ES and Sterin-Borda L. 1996. Antiadrenergic and muscarinic receptor antibodies in Chagas' cardiomyopathy. International Journal of Cardiology; 54(2):149-56.
- Borges D, Araujo N, Cardoso C and Lazo J. 2013. Different parasite inocula determine the modulation of the immune response and outcome of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. Immunology. Blackwell Publishing Ltd. 138: 145-156.
- Cárdenas L, Tay J y Salazar-Schettino PM. 1975. Cambios histopatológicos producidos en el ratón por cepas mexicanas de *Trypanosoma cruzi*. Revista Inv Salud Pública. México. 35: 131-153.
- Chagas C. 1909. Nova tripanozomiaze humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz; 1: 159-218.

- Colville T and Bassert J. 2016. *Clinical Anatomy and Physiology for Veterinary Technicians*. Tercera Edición. Elsevier, Inc. Canadá.
- Cunha-Neto E, Bilate AM, Hyland KV, Fonseca SG, Kalil J and Engman DM. Induction of cardiac autoimmunity in Chagas heart disease: a case for molecular mimicry. *Autoimmunity* 2006;39(1):41-54.
- De Haro, I. 1997. *Enfermedad de Chagas en una comunidad del altiplano mexicano*. Tesis para obtener el título de Doctor en Ciencias Biomédicas. Facultad de Medicina. UNAM.
- Demarchi V and Peixoto F. 2015. Chronic Chagas Cardiomyopathy. *Autopsy Case Reports*. 5(3): 7-9.
- Gutiérrez F, Guedes P, Gazzinelli R and Silva J. 2009. The role of parasite persistence in pathogenesis of Chagas heart disease. *Parasite Immunology*. Brazil. 31: 673-685.
- Higuchi M, Benvenuti A, Reis M and Metzger M. 2003. Pathophysiology of the heart in Chagas' disease: Current status and new developments. *Cardiovascular Research* 60: 96-107.
- Imaz Iglesia I, García San Miguel L, Blasco Hernández T, Martín Águeda B, González-Enríquez J, Ayala Morilas LE, García Pérez L y Sarría Santamera A. 2015. Evaluación económica de distintas estrategias de cribado de la enfermedad de Chagas en España. Agencia de Evaluación de Tecnologías Sanitarias (AETS) - Instituto de Salud Carlos III. España. 1-60.
- Köberle F. 1961. Patología y anatomía patológica de la enfermedad de Chagas. *Boletín de la oficina sanitaria panamericana*. Universidad de Sao Paulo, Brasil. pp. 404-428.
- Köberle F. 1968. Chagas' disease and Chagas' syndromes: the pathology of American Trypanosomiasis. University of Sao Paulo, Brazil. Pp. 63-116.
- Köberle F, Oliveira J y Becker P. 1973. Patogenia de la cardiopatía chagásica crónica. Universidad de Sao Paulo, Brasil. *CNPq. Proc*, 10.192/73
- Kumar V, Abbas A, Fausto N y Mitchell R. 2008. *Robbins Patología humana*. Octava Edición. Elsevier Saunders.
- Magarinos Torres C. 1941. *Sobre la anatomía patológica de la enfermedad de Chagas*. Memorias del Instituto Oswaldo Cruz. Brasil.
- Marin-Neto J, Cunha-Neto E, Maciel B y Simões M. 2007. Pathogenesis of Chronic Chagas Heart Disease. American Heart Association, Inc. Brazil. 115: 1109-11123.
- Mazzotti, L. 1940. Dos casos de a enfermedad de Chagas en el Estado de Oaxaca. *Gaceta Médica*. México; 70: 417-420.ca

- Mendoza MI. 2015. Caracterización biológica y bioquímica de cuatro aislados de *Trypanosoma cruzi*. Tesis para obtener el título de Química Farmacéutica Bióloga. Facultad de Química, UNAM.
- Molina H y Kierszenbaum F. 1987. A study of human myocardial tissue in Chagas disease: distribution and frequency of inflammatory cell types. *International Journal of Parasitology*. 17 (7): 1297-1305.
- OMS/OPS: Reporte sobre la enfermedad de Chagas. Grupo de trabajo científico. 17 a 20 de abril de 2005. Actualizado en julio de 2007. Buenos Aires, Argentina. www.who.int/tdr. Disponible en: http://whqlibdoc.who.int/hq/2007/TDR_SWG_09_spa.pdf
- Organización Mundial de la Salud. 2003. Control para la enfermedad de Chagas. Informe de Ginebra. Recuperado de http://www.who.int/whr/2003/en/whr03_es.pdf el 6 de julio de 2016.
- Organización Mundial de la Salud. 2014. Enfermedad de Chagas. Recuperado de http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=article&id=10&Itemid=40743&lang=es el 23 de junio de 2016.
- Organización Panamericana de la Salud. 2015. Enfermedad de Chagas. Recuperado de http://www.paho.org/uru/index.php?option=com_content&view=category&id=663&layout=blog&Itemid=232 el 23 de junio de 2016.
- Owen J, Punt J, Stranford S y Jones P. 2014. *Kuby Inmunología*. Séptima Edición. McGraw Hill Education. pp. 33-39.
- Palau M. 2000. Relación hospedero-parásito *Trypanosoma cruzi*. *INS Grupo de parasitología*. Bogotá, Colombia. 5:(1), 33-37.
- Pizzi T, Wallace A, Villagra R, Muñoz S, Ortiz S y Solari, A. 2005. Concordancia de lesiones histológicas en ratones infectados por dos poblaciones de *Trypanosoma cruzi* de Chile. *Revista Médica de Chile*. 133: 432-438.
- Rassi A Jr, Rassi A and Marin-Neto JA. 2010. Chagas Disease. *Lancet*; 375: 1388e1402.
- Rossi MA. 1991. The pattern of myocardial fibrosis in chronic Chagas' heart disease. *International Journal of Cardiology*. 30 (3):335-40.
- Sabino EC, Riberio AL, Salemi VM, Di Lorenzo Oliveria C, Antunes AP and Menezes. 2013. Ten-year incidence of Chagas cardiomyopathy among asymptomatic *Trypanosoma cruzi*-seropositive former blood donors. *Circulation*;127:1105e1115.

- Salazar PM, Tay J, Navarrete F y Ramos S. 1975. Comportamiento en el ratón de una cepa mexicana de *Trypanosma cruzi* de peculiar virulencia. Revista Inv Salud Pública; 35:37-45.
- Salazar PM, Jiménez M, Tay J y Cárdenas L. 1978. Estudio comparativo de la patogenicidad de cuatro cepas de *T. cruzi* en el ratón blanco. Revista latinoamericana de Microbiología. 20: 51-57.
- Salazar PM, Tay J, Bucio MI, Haro I de, Anzures ME y Flores-Ayala S. 1984. Primer caso de megaesófago con serología positiva a *Trypanosoma cruzi*. Salud Pública Mex; 26: 452-455.
- Salazar PM, Barrera M y Bucio MI. 1989. Transmisión de *Trypanosoma cruzi* por transfusión sanguínea, Primer caso humano en México. Revista Mexicana de Patología Clínica; 36: 57-59.
- Salazar Schettino PM, Rojas Wastavino GE, Cabrera Bravo M, Bucio Torres MI, Martínez-Ibarra A, Moroy-Escobar MC, Rodas-Retana A, Guevara-Gomes Y, Veneces-Blanco MO, Ruiz-Hernández AL y Torres-Gutiérrez E. 2010. Revisión de 13 especies de la familia Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) vectores de la enfermedad de Chagas en México. Journal of the Selva Andina Research Society. 1(1): 57-80.
- Salazar Schettino PM, Cabrera Bravo M, Bucio Torres MI y Haro Arteaga I de. Diagnóstico morfológico de las parasitosis. 3a. ed. México: Méndez Editores, SA de CV. ISBN 978-607-7659-16-7. Tiraje: 1 000 ejemplares. 328 p. 2011.
- Salazar PM, Bucio M, Cabrera M, De Alba M, Castillo D, Zenteno E, Rojo J, Fernández N y Perera M. 2016. Enfermedad de Chagas en México. Artículo de revisión. Vol 59 (3):6-16.
- Salazar-Shettino PM, Cabrera-Bravo M, Vázquez-Antona C, Zenteno E, De Alba-Alvarado M, Torres-Gutiérrez E, Guevara Gómez Y, Perera-Salazar MG, García de la Torre G and Bucio-Torres MI. 2016. Chagas Disease in Mexico: Report of 14 cases of Chagasic Myocardiopathy in Children. The Tohoku Journal of Experimental Medicine, 240. 243-249.
- Schmuñis G. 1999. Riesgo de la enfermedad de Chagas a través de las transfusiones en las Américas. Simposio internacional. Academia nacional de Medicina. Argentina. 59 (2):125-134.
- Scorza C and Scorza JV. 1972. Acute myocarditis in rats inoculated with *Trypanosoma cruzi*: Study of animals sacrificed between the fourth and twenty-ninth day after infection. Revista do Instituto de Medicina Tropical. Brasil. 14 (3): 171-177.
- Secretaría de Salud. 2016. Recuperado de <http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/doctos/boletin/2015/sem01.pdf>,

- <http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/doctos/boletin/2016/BOL-EPID-2016-SE01.pdf>,
<http://www.pda.salud.gob.mx/cubos/cmortalidadxp.html> el 4 de agosto de 2016.
- Smith C and Jarecki A. 2011. Atlas of Comparative, Diagnostic and Experimental Biology. Second edition. Blackwell Publishing Ltd. Estados Unidos.
- Suárez N, Cabrera R, Cartagena L y Ayaqui R. 2009. Características biológicas de una cepa de *Trypanosoma cruzi* en un modelo murino y análisis de supervivencia. Revista de Perú de Medicina Experimental, Salud Pública; 26(2):187-192.
- Tafuri WL. 1999. Immunopathology of Chagas Disease – A Historical Overview. Departamento de Patologia Geral. Brasil. Vol. 94. 247-248.
- Tafuri WL. 1987. Patogenia da doença de Chagas. Revista do Instituto de Medicina Tropical, São Paulo;29(4):194-9.
- Tay J, Salazar PM, Bucio MI, Zárata R y Zárata L. 1979. Estado actual de nuestros conocimientos sobre la enfermedad de Chagas en la República Mexicana. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical; 14 (1-3): 1-41.
- Tay J, Salazar PM, Ontiveros A, Jiménez J, Haro I de, García Yañez Y and Gutiérrez QM. 1986. Epidemiologic study of Chagas' Disease in a town in Oaxaca, Mexico. PAHO Bulletin; 20(4): 358-65.
- Teixeira A, Hecht M, Guimaro M, Sousa A and Nitz N. 2011. Pathogenesis of Chagas' disease: Parasite Persistence and Autoimmunity. Clinical Microbiology Reviews. American Society for Microbiology. Vol. 24. 3: 592-630.
- Tyler K and Miles M. 2003. World Class Parasites. American Trypanosomiasis. Vol. 7. Springer Science and Business Media, LLC. Estados Unidos. pp. 1-8.
- UNAM, SSA, OPS. 2006. Manual para el Diagnóstico de la Infección por *Trypanosoma cruzi*. México D.F. p. 45
- Vianna G. 1911. Contribución para el estudio de la anatomía patológica de la enfermedad de Chagas. Pp. 277-294.
- Viotti R y Vigliano C. 2015. Enfermedad de Chagas: un enfoque práctico basado en la investigación médica. Editorial Médica Panamericana. Argentina.
- Zingales B, Andrade SG, Briones MRS, Campbell DA, Chiari E, Fernandes O, Guhl F, Lages-Silva E, Macedo AM, Machaco CR, Miles MA, Romanha AJ, Sturm NR, Tibayrenc M and Schijman AG. 2009. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature:

second revisión meeting recommends TcI to TcVI. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz vol. 104. No. 7. Rio de Janeiro.

13. ANEXOS

Anexo I

Registro de signos

Los signos clínicos observados en los ratones infectados con 1000 parásitos por ratón comenzaron el día 30 después de la infección y fueron aumentando conforme de aprecia en la Tabla 5. Después del día 40 se observó una mejora en los signos de los ratones.

Tabla 5. Tabla de los signos clínicos observados en los ratones con el inóculo de 1000 parásitos.

Día	Signos clínicos	porcentaje de ratones que las presentaron
30	PCT	7%
35	PCT	23%
	CA	3%
	PP	1%
	E	3%
40	PCT	21%
	PP	5%
	E	1%

Notas: el porcentaje de ratones fue obtenido de un total de 75 ratones.