

Influencia del sexo en la susceptibilidad de ratones Swiss a *Trypanosoma cruzi* *Sex influence on the susceptibility of Swiss mice to Trypanosoma cruzi*

Ana Laura Mena-Marín^{1*}, Rodrigo Zeledón², Juan Alberto Morales³, Mauricio Pereira⁴ & Andrea Urbina¹

RESUMEN

Algunos estudios han reportado que los ratones hembras son más resistentes al *Trypanosoma cruzi* que los machos. Para probar lo anterior, se realizó un estudio comparativo con cuatro cepas de *T. cruzi* de Costa Rica midiendo parámetros como niveles de parasitemia, porcentajes de mortalidad e histopatología, en un total de 240 ratones (160 para parasitemia y mortalidad y 80 para histopatología). Todas las cepas correspondieron al genotipo TcI. En todos los casos los ratones machos resultaron más susceptibles a la infección ($P < 0,001$). Se observaron parasitemias hasta cinco veces más altas en los machos que, en general, mueren antes que las hembras. La cepa Oswaldo fue la que presentó una mayor mortalidad y niveles de parasitemia más altos. El tejido cardíaco fue el más afectado tanto en los ratones machos como en las hembras, con las cepas Bolita y Capitán el número de nidos en el miocardio fue significativamente mayor en los machos que en las hembras. Una vez concluido el análisis comparativo se eligió la cepa humana GA, para determinar su efecto en ratones machos y hembras castrados, al lado de ratones normales (150 ratones en total). Las hembras normales se mostraron como las más resistentes, con parasitemias menores que las castradas ($P < 0,001$), y los machos normales como los más susceptibles, con parasitemias significativamente más altas ($P < 0,001$) y supervivencias menores ($P < 0,01$), que los ratones castrados. No se observó diferencia significativa en cuanto al número de nidos en los tejidos entre ratones normales y castrados. Se concluye que el sexo tiene influencia en la resistencia a la infección experimental por *T. cruzi*.

Palabras clave: *Trypanosoma cruzi*, parasitemia, castración, estrógenos, testosterona.

INTRDUCCIÓN

Diversos autores han reportado, en varios estudios, una diferencia en la susceptibilidad entre ratones machos y hembras a la infección con *Trypanosoma cruzi*, en la cual las hembras han presentado una mayor resistencia con respecto a

SUMMARY

Some authors have reported that female mice are more resistant to *Trypanosoma cruzi* infections than male mice. In order to test this hypothesis we did a comparative study using four isolates of *T. cruzi* from Costa Rica in a total of 160 mice, and observed several parameters such as: parasitemia levels, percent mortality and histopathology. All isolates were identified as genotype TcI. Male mice were more susceptible to infection ($P < 0.001$). Parasitemias reached levels up to five times higher in males and shorter survival periods were observed in males than in females. The Oswaldo isolate showed the highest parasitemias and mortality rates. The heart tissue was the most affected in both males and females. In two isolates the number of parasites in the heart was significantly higher in males than in females. In separate experiments, the human GA isolate was selected in order to observe its effect in castrated male and female mice. Non-castrated females were the most resistant, with lower parasitemias than castrated females, and non-castrated males were the most susceptible with higher parasitemias ($P < 0.001$) and lower survival periods than castrated males ($P < 0.01$). There was no significant difference in the number of parasites in tissues between normal and castrated mice. The final conclusion is that there is a marked sex influence in the susceptibility of mice to *T. cruzi* experimental infections.

Key words: *Trypanosoma cruzi*, parasitemia, castration, estrogen, testosterone.

los machos (Hauschka, 1947; Goble, 1951; Bice & Zeledón, 1970; McHardy, 1978; Tay *et al.*, 1978; Alexander & Stimson, 1988, Rodríguez *et al.*, 2000). Do Prado *et al.*, (1998) trabajaron con hembras castradas del roedor *Calomys callosus* y notaron que estas hembras presentaban mayor parasitemia con respecto a las normales y Tartalini *et al.*, (2011)

¹ Laboratorio de Zoonosis, Universidad Nacional

² Escuela de Biología, Universidad de Costa Rica

³ Servicio de Patología, Universidad Nacional

⁴ Hospital de Especies Menores, Universidad Nacional

*Autora de correspondencia: almen2211@gmail.com

estudiaron el efecto de los esteroides en la infección experimental de ratas machos con *T. cruzi* y observaron un aumento en la parasitemia en aquellas que recibieron testosterona. Sin embargo, otros autores como Pizzi & Prager (1953), Kagan & Norman (1960), Zúñiga *et al.*, (1997), Souza *et al.*, (2001) y Pizzi *et al.*, (2005) sostienen que las diferencias observadas son inexistentes. También existe evidencia de diferencia en la severidad de la enfermedad de Chagas entre hombres y mujeres. Widmer & Azevêdo (1972) analizaron casos de autopsias de personas que habían tenido insuficiencia cardíaca como consecuencia de la enfermedad, y observaron una menor prevalencia y severidad de las secuelas chagásicas en las autopsias de las mujeres con respecto a las de los hombres. En un estudio de miocardiopatías humanas se observaron más anomalías en hombres que en mujeres (Maguire *et al.*, 1983).

Mota *et al.* (1984), hicieron un estudio serológico y clínico en 680 personas de cinco o más años para determinar la prevalencia de esta enfermedad y la presencia de megasíndromes. Aunque no hubo diferencia significativa en la morbilidad entre ambos sexos, sí se observó una mayor severidad en las lesiones de los hombres.

Ahmed *et al.*, (1985) evaluaron miocardiopatías chagásicas, y observaron una inequívoca ventaja femenina en la supervivencia, ya que se comprobó una mayor proporción de miocardiopatías crónicas en hombres. Además, la diferencia en la susceptibilidad entre ambos sexos se ha observado en una serie de enfermedades infecciosas y parasitarias en las que las hembras tienden a ser más resistentes, como por ejemplo a *Giardia intestinalis*, *Leishmania* spp y *T. brucei* (Roberts *et al.*, 2001).

En vista de los criterios opuestos existentes en la literatura en relación con la influencia del sexo en la infección experimental por *T. cruzi*, decidimos llevar a cabo varios experimentos controlados en ratones con el fin de contribuir a dilucidar este importante aspecto.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ratones y Cepas de T. cruzi

La cría original de los ratones Swiss utilizados en este experimento fue donada al

Laboratorio de Zoonosis de la Universidad Nacional de Costa Rica en el 2001 por el Ministerio de Agricultura y Ganadería de Costa Rica, y procedía de los Laboratorios Charles River en Massachusetts, Estados Unidos. Los ratones tenían un peso entre 23 y 25 gramos y tenían 4 semanas de edad. Las cepas de *T. cruzi* utilizadas fueron aisladas de *Triatoma dimidiata* (Capitán y Oswaldo), un perro (Bolita) y un ser humano (GA). Con el fin de determinar su linaje filogenético, se realizó la prueba de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para el gen mini-exón en las cuatro cepas usadas durante el experimento, según el protocolo de Souto *et al.* (1996).

Infecciones experimentales

En varios experimentos se inocularon intraperitonealmente 1×10^4 parásitos sanguíneos a 4 grupos de 20 ratones hembras y 20 machos cada uno, genéticamente uniformes, con un peso entre 23 y 25 g para un total de 160 ratones.

Recuento de parasitemia

Tres veces por semana, a partir del día ocho postinoculación, se realizaron recuentos de parasitemia de los 160 ratones en lotes de 40 cada uno con ayuda de cámara de Neubauer y solución hipotónica de NaCl al 0,3%. Según los resultados en los niveles de parasitemia y tiempo de supervivencia, se seleccionó la cepa que permitiera observar, con mayor tiempo, en experimentos posteriores, la influencia del sexo.

Histopatología

Se inocularon 4 grupos de ratones de 10 machos y 10 hembras cada uno con 1×10^4 parásitos de cada una de las cepas de estudio para un total de 80 ratones, y fueron sacrificados por procedimiento eutanásico un mes después. Se fijaron varios tejidos en formalina al 10% (corazón, músculo esquelético, lengua, vejiga y colon), y se hicieron cortes histológicos de 5 μ m, se tiñeron con hematoxilina eosina o con Giemsa para determinar los tropismos del parásito y su número relativo en cada órgano. Asimismo, para estimar cuantitativamente los nidos de tripomastigotos, estos se contaron en la totalidad del corte del tejido de 10 ratones para cada sexo, en un aumento de 250x.

El grado de inflamación de los diferentes tejidos de los ratones inoculados con las cepas de estudio, se dividió cualitativamente en nula (-), leve (+), moderada (++) y severa (+++).

Castración

En tres experimentos se inocularon 10 000 parásitos a cada uno de 30 ratones machos normales, 30 ratones hembras normales, 30 ratones machos castrados y 30 ratones hembras castradas (para un total de 120 ratones) con la cepa seleccionada (GA). Se hicieron recuentos tres veces por semana en la totalidad de los ratones para determinar su parasitemia. El proceso quirúrgico utilizado es una adaptación de la técnica estándar usada en caninos y felinos en el Hospital de Especies Menores de la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional de Costa Rica. Los ratones sometidos a castración se sedaron con vaporizaciones de Isoflurano en concentraciones al 2% y se sometieron a cirugía sobre una manta térmica para controlar la hipotermia sufrida durante el período anestésico. Inmediatamente al concluir el procedimiento quirúrgico se les aplicó: enrofloxacin (5mg/kg), dipirona sódica (10 mg/kg) y dextrosa al 5% por vía subcutánea (10ml/kg).

Adicional a esto, se inoculó otro grupo de trabajo de 20 ratones (5 hembras normales, 5 hembras castradas, 5 machos normales y 5 machos castrados) que fueron sacrificados por procedimiento eutanásico a las cuatro semanas post inoculación para estudio histopatológico. Asimismo, se sacrificaron 5 machos y 5 hembras normales (no infectados ni castrados), del mismo peso y edad, para control.

Análisis estadístico

Se hicieron análisis de varianza (ANOVA) para determinar la existencia de diferencias significativas entre los datos de máxima parasitemia, días de supervivencia (para comparar la supervivencia entre sexos, se consideró el día en que al menos murió el 80% de los ratones pertenecientes a un sexo), y cantidad de nidos del parásito en los tejidos, entre ratones machos y hembras inoculados con las 4 cepas y entre machos y hembras normales y castrados inoculados con la cepa GA.

Consideraciones Éticas

El uso de animales en este trabajo fue autorizado por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales (CICUA) de la Universidad de Costa Rica en su oficio CICUA-032-08.

RESULTADOS

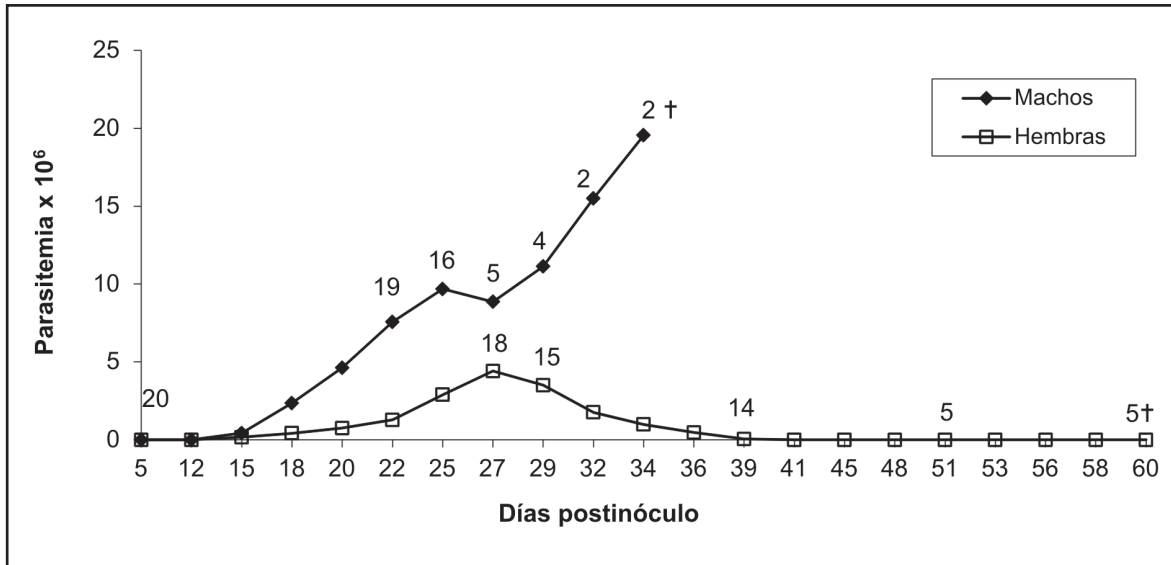
Parasitemia: Infección experimental en ratones normales (sin castrar)

Todas las cepas del estudio correspondieron al genotipo TcI. Los machos inoculados con la cepa GA presentaron una parasitemia promedio más elevada con respecto a las hembras; el pico de parasitemia de los primeros fue de 2×10^7 en el día 34 post inoculación mientras que el de las hembras fue de 5×10^6 el día 27 ($P < 0,001$). Mientras los últimos dos machos murieron a los 34 días después de una marcada mortalidad en los días anteriores, la mortalidad en las hembras fue moderada con tendencia a la cronicidad, por lo que las 5 hembras que quedaron vivas fueron sacrificadas a los 60 días. A los 29 días la mortalidad de los machos fue de un 80% mientras que la de las hembras fue de un 25% ($P < 0,001$) (Fig. 1).

Para los ratones inoculados con la cepa Bolita (Fig. 2), el pico de parasitemia de los machos de $5,5 \times 10^6$ el día 28, más del doble que el de las hembras que fue de $2,5 \times 10^6$ ($P < 0,001$). La parasitemia de los machos fue en aumento hasta el día de mortalidad total, mientras que en las hembras empezó a disminuir a partir del día 28 hasta no ser detectada en las muestras de sangre por observación microscópica. Asimismo la supervivencia de las hembras fue considerablemente mayor que la de los machos: mientras que los últimos 5 machos murieron a los 28 días, la última hembra alcanzó los 74 días ($P < 0,001$).

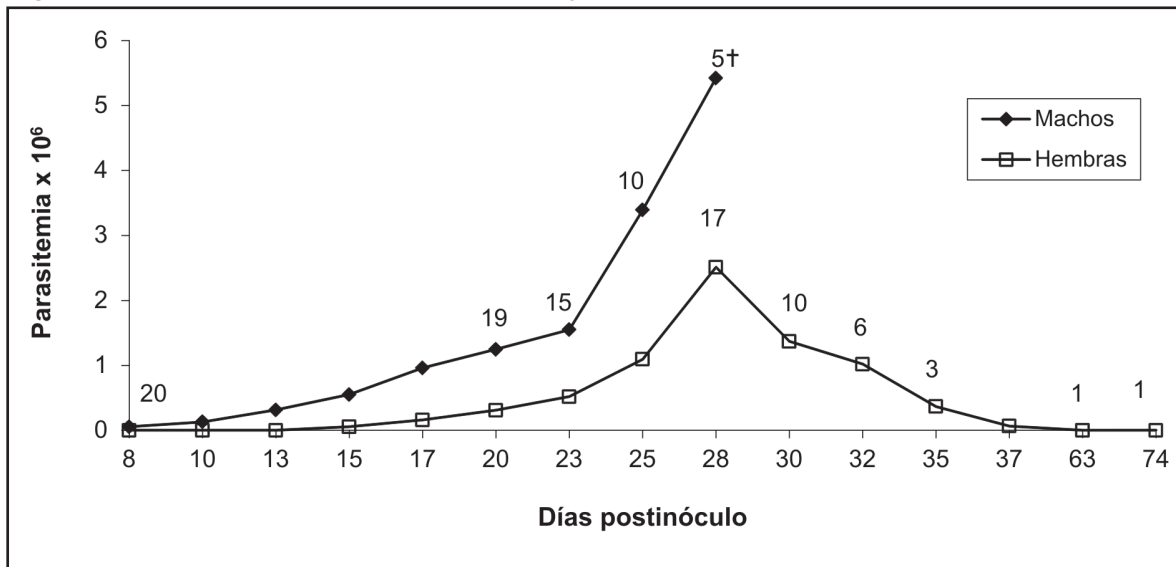
En cuanto a la cepa Oswaldo (Fig. 3) los machos alcanzaron en promedio $2,5 \times 10^7$ de parásitos el día 26 postinoculación, día en el que también murieron los últimos tres ratones, mientras que las hembras obtuvieron un pico de parasitemia casi cuatro veces menor, correspondiente a $5,5 \times 10^6$ de parásitos el día 23 ($P < 0,001$). A partir de ese momento la tendencia a la cronicidad fue evidente hasta el día 40, en el cual se sacrificaron las últimas dos hembras sobrevivientes.

Fig. 1*. Parasitemia promedio de ratones machos y hembras inoculados con la cepa GA.



*Las Fig. 1-6 poseen un número en cada punto de la gráfica que indica el número de ratones sobrevivientes el día del conteo, cuando no aparezca número es porque no murió ningún ratón desde el último día de conteo. En los casos en los que se encuentre una cruz, esta indica la muerte del total de los ratones.

Fig. 2. Parasitemia promedio de ratones machos y hembras inoculados con la cepa Bolita.



Tomando como referencia el día 26 postinoculación, la mortalidad de las hembras fue de un 35% mientras que la de los machos fue de 100% ($P < 0,001$).

Los machos inoculados con la cepa Capitán (Fig. 4) alcanzaron su pico promedio de parasitemia de $4,5 \times 10^6$ de parásitos a los 25 días después de la inoculación; para el día 27 hubo una ligera reducción en el promedio de la parasitemia y ese mismo

día murieron los ratones sobrevivientes hasta ese momento. Las hembras alcanzaron cerca de la mitad de la parasitemia de los machos ($2,5 \times 10^6$ de parásitos) y un 45% de mortalidad también el día 27 ($P < 0,001$); a partir de ese momento la parasitemia se redujo hasta no ser detectada al microscopio y el porcentaje de mortalidad aumentó de modo que para el último día del experimento, solo sobrevivió una hembra que fue sacrificada.

Fig. 3. Parasitemia promedio de ratones machos y hembras inoculados con la cepa Oswaldo.

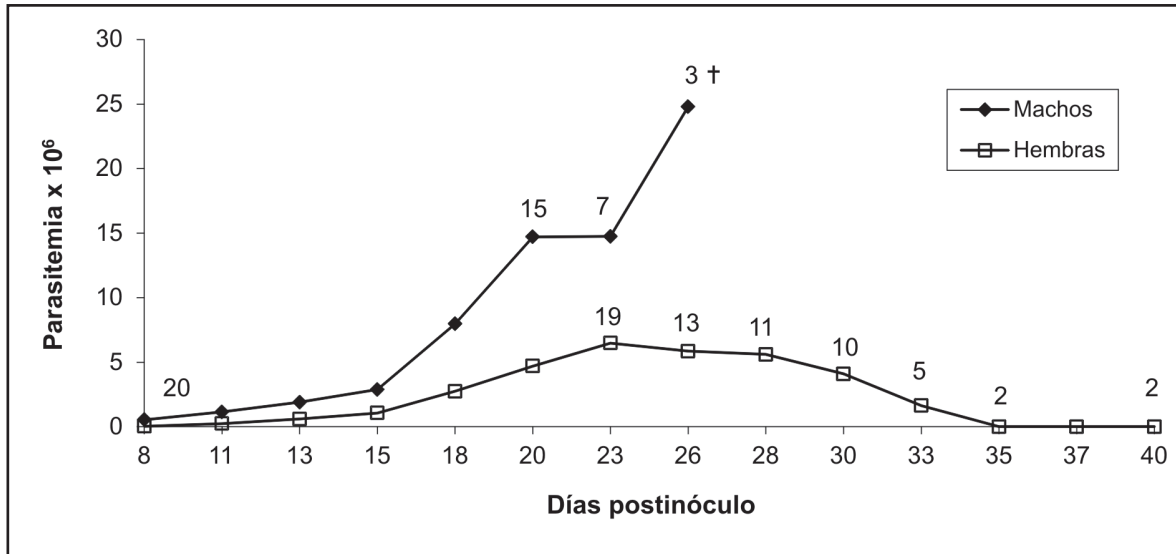
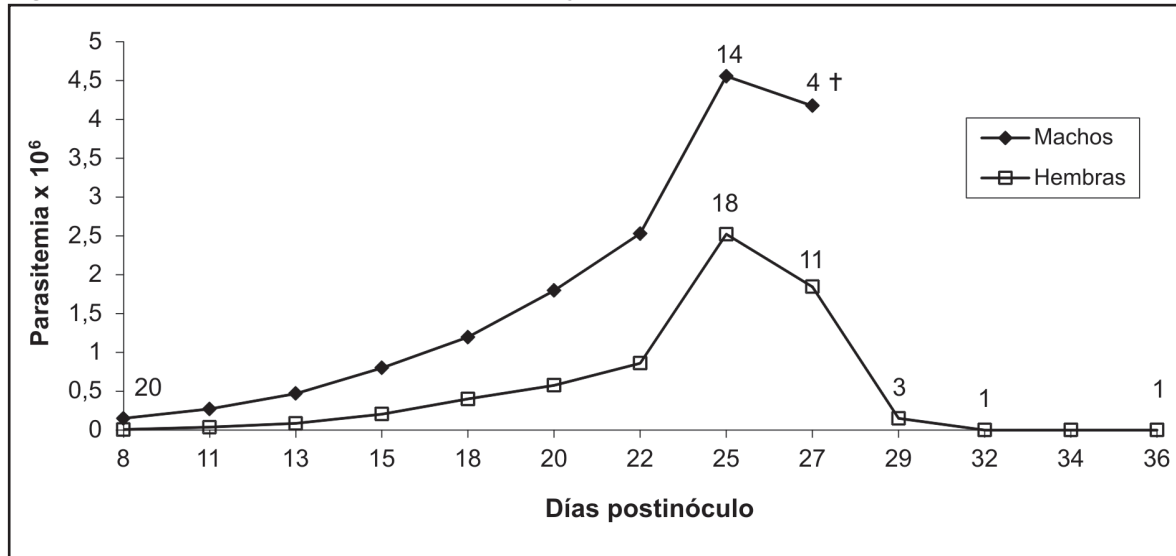


Fig. 4. Parasitemia promedio de ratones machos y hembras inoculados con la cepa Capitán.



Independientemente de la cepa utilizada, se realizó un análisis de varianza en la totalidad de los ratones inoculados, 80 machos y 80 hembras, para determinar el efecto del sexo sobre la parasitemia, evidenciándose una diferencia altamente significativa en la parasitemia entre sexos con niveles más altos en los machos ($P < 0,001$).

Al considerar los tiempos de supervivencia para la totalidad de los ratones sin tomar en cuenta

la cepa sino sólo el efecto del sexo, se obtuvo que el promedio de supervivencia de los machos fue de 25 días mientras que el de las hembras fue de 34 ($P < 0,001$).

En la cepa Oswaldo se observaron los mayores niveles de parasitemia, seguida de la GA, Capitán y Bolita. Hubo una diferencia estadística altamente significativa ($P < 0,001$) al comparar las cepas entre sí, excepto al comparar Bolita y Capitán, las cuales produjeron parasitemias similares.

Sin considerar el sexo y al comparar las cepas entre sí, se obtuvo que la cepa que produjo el mayor tiempo de supervivencia promedio, fue GA, ya que los ratones sobrevivieron en promedio 36 días. El segundo lugar fue para los ratones inoculados con la cepa Bolita, los cuales vivieron en promedio 28 días seguidos por la cepa Capitán con 27 y la cepa Oswaldo con 26. Asimismo, se obtuvieron diferencias altamente significativas en los tiempos de supervivencia al comparar la cepa GA con el resto de las cepas ($P < 0,001$), mientras que al comparar Bolita, Capitán y Oswaldo no

hubo diferencias en sus niveles de significancia correspondientes a los tiempos de supervivencia ($P > 0,05$).

Para todas las cepas, hubo diferencias significativas al comparar los promedios de supervivencia entre machos y hembras ($P < 0,05$). Las hembras inoculadas con la cepa GA fueron las que mantuvieron el mayor tiempo de supervivencia promedio (47 días), mientras que los machos inoculados con la cepa Oswaldo obtuvieron el menor (22 días).

Fig. 5. Ratones machos castrados y machos controles inoculados con la cepa GA.

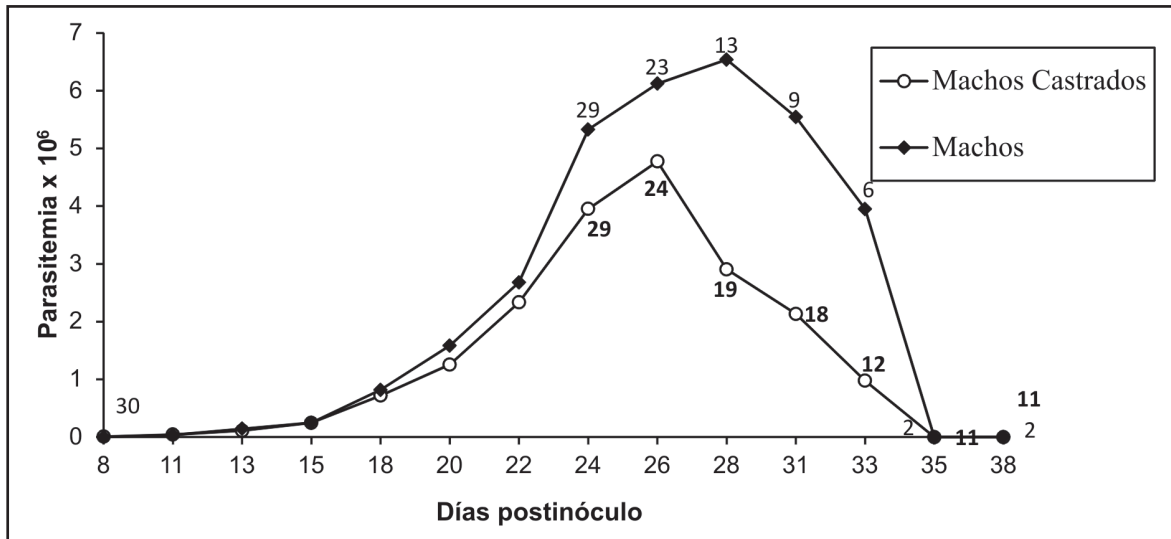
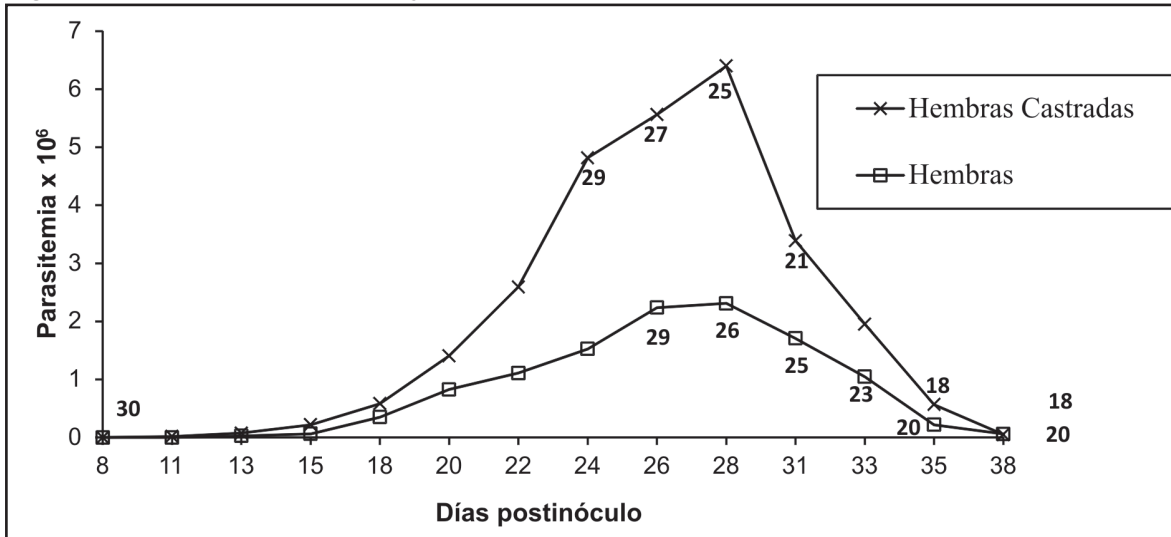


Fig. 6. Ratones hembras castradas y hembras controles inoculadas con la cepa GA.



Evaluación de parasitemia en ratones normales e intervenidos quirúrgicamente

En las Fig. 5 y 6 se puede observar el comportamiento de los ratones inoculados con la cepa GA en esta segunda fase del experimento. Las parasitemias más altas fueron de los machos normales con $6,5 \times 10^6$ parásitos tripomastigotos el día 28 postinoculación, seguidos de las hembras castradas con $6,4 \times 10^6$ parásitos ese mismo día. El día 26 los machos castrados alcanzaron su máxima parasitemia con $4,7 \times 10^6$ parásitos y las hembras normales lo hicieron el día 28 con $2,3 \times 10^6$ parásitos.

Según el análisis de varianza se obtuvo una diferencia altamente significativa en los niveles de parasitemia al comparar las hembras castradas con las normales, los machos castrados con los normales, las hembras normales con los machos castrados, los machos normales con las hembras normales y los machos castrados con las hembras castradas ($P < 0,001$).

En cuanto a la mortalidad, fue el día 33 en el que los machos no castrados alcanzaron una mortalidad del 80%, comparados con los machos castrados cuyo porcentaje de mortalidad fue de 60% seguido de las hembras castradas con un 30%. Fueron las hembras normales las que tuvieron el menor porcentaje de mortalidad este día (23%). Nótese que a pesar de que fue el día 33 en el que

se presentó la muerte del 80% del grupo de machos normales, el día 31 hubo una mortalidad de 70% para los mismos machos, 30% para hembras castradas, 40% para machos castrados y 17% para las hembras normales. En cuanto a supervivencia el último día de observación (día 38), las hembras normales obtuvieron el menor porcentaje de mortalidad (33%) y los machos normales el mayor (93%).

En lo referente a porcentajes de mortalidad y tiempo de supervivencia existió una diferencia significativa en ambos casos ($P < 0,01$) al comparar las hembras tanto castradas como normales con los machos castrados y normales y los machos castrados con los normales. No hubo diferencia significativa al comparar las hembras normales con las castradas ($P > 0,05$).

Histopatología

En cuanto al tipo de células presentes en los 80 ratones inoculados con las cuatro cepas, predominaron los macrófagos con presencia eventual de linfocitos, neutrófilos y eosinófilos (Tabla I).

La cepa Oswaldo fue la que produjo la mayor cantidad de nidos de amastigotos en las muestras de tejido examinadas, a excepción del miocardio, mientras que en las muestras de tejido de los ratones inoculados con la cepa GA fue en la que menos se encontraron parásitos. No hubo diferencias

Tabla I. Resumen de la histopatología de los 80 ratones inoculados con cuatro cepas de *T. cruzi*.

Tejido	Bolita			Capitán			Oswaldo			GA		
	Sexo	Grado de Inflamación	# Nidos	Sexo	Grado de Inflamación	# Nidos	Sexo	Grado de Inflamación	# Nidos	Sexo	Grado de Inflamación	# Nidos
Corazón	♂	+++	∞**	♂	+++	250	♂	++	68.9	♂	+	1.7
	♀	++	85.8	♀	+++	155.6	♀	+	38.2	♀	+	0.7
Lengua	♂	+++	1.1	♂	+++	1.3	♂	+	4.6	♂	+	0.4
	♀	+	0.3	♀	++	1.9	♀	+	0.8	♀	+	0.4
Músculo Esquelético	♂	+++	12.6	♂	+++	13.2	♂	++	35.5	♂	++	1.3
	♀	++	7	♀	++	4.5	♀	+	3.6	♀	++	1.7
Vejiga	♂	+	2.5	♂	+	1.9	♂	+++	130.2	♂	++	1.1
	♀	+	0.5	♀	+	0.6	♀	+	108.9	♀	++	0.9
Colon	♂	+	0.6	♂	+	0.1	♂	+	1.1	♂	-	0
	♀	+	0	♀	+	0	♀	+	0.7	♀	+	0

*Para las Tablas I y II, la cantidad de nidos indica un promedio de todos los individuos del experimento. El grado de inflamación se divide en nula (-), leve (+), moderada (++) y severa (+++).

** ∞: Incontables

significativas en la cantidad de nidos encontrados en los tejidos de ratones inoculados con las cepas Oswaldo, Bolita y Capitán ($P > 0,05$), pero sí hubo diferencia altamente significativa al comparar las tres cepas anteriores con la GA ($P < 0,001$). Los machos en general fueron los que presentaron la mayor cantidad de nidos del parásito en todos los tejidos examinados, especialmente en el miocardio y el músculo esquelético con respecto a las hembras ($P < 0,001$).

Independientemente de la cepa que se estaba analizando, en todos los casos el tejido que presentó mayor cantidad de nidos fue el cardiaco seguido del músculo esquelético. Se observó una diferencia altamente significativa entre la cantidad de nidos del parásito en el corazón con respecto a lengua, músculo esquelético, vejiga y colon; lo mismo ocurrió al comparar la lengua, con el músculo esquelético, vejiga y colon; y al comparar el músculo esquelético y la vejiga con el colon ($P < 0,001$).

A pesar de que en todas las cepas (excepto en la GA), los machos fueron portadores de la mayor cantidad de nidos del parásito en sus tejidos, solo en el caso de la cepa Bolita la diferencia entre la cantidad de nidos del parásito entre los sexos fue altamente significativa ($P < 0,001$).

Al comparar cada tejido por separado se encontraron diferencias altamente significativas en corazón en la cantidad de nidos entre machos y hembras inoculados con las cepas Bolita y Capitán, (lo mismo ocurrió en el músculo esquelético de los ratones machos y hembras inoculados con la cepa

Bolita), para ambas cepas la mayor cantidad de nidos del parásito en el corazón predominó en los machos ($P < 0,001$), en el resto de los tejidos, no hubo diferencia significativa entre machos y hembras inoculados con las diferentes cepas.

En el caso de los ratones inoculados con la cepa GA no hubo diferencia significativa en el promedio de la cantidad de nidos del parásito contabilizados en los diferentes tejidos ($P > 0,05$).

En cuanto a los ratones intervenidos quirúrgicamente los machos castrados fueron los que presentaron la mayor cantidad de nidos del parásito en los tejidos; sin embargo, no hubo diferencias significativas al compararlos con los machos normales ($P= 0,67$), las hembras castradas ($P= 0,28$), y hembras normales ($P= 0,43$), mientras que tampoco hubo diferencias al comparar las hembras castradas con los machos normales ($P= 0,08$) y las hembras normales ($P= 0,29$) ni al comparar las hembras normales con las castradas ($P= 0,53$).

A diferencia de los tejidos de ratones no castrados inoculados con las cepas Bolita, Oswaldo y Capitán sin tomar en cuenta el sexo, en el caso de los inoculados con la cepa GA, fue en el músculo esquelético donde se contabilizó la mayor cantidad de nidos de amastigotos, aunque no existió diferencia significativa con respecto al tejido cardiaco ($P > 0,05$), pero si hubo diferencia al comparar estos dos tejidos con la lengua, vejiga y colon ($P < 0,01$).

En general al comparar la cantidad de nidos para cada tejido, no hubo diferencias significativas

Tabla II. Resumen de la histopatología de los 10 ratones castrados inoculados con la cepa GA.

Tejido	Sexo	Grado de Inflamación	# Nidos*
Corazón	♂	++	2.1
	♀	++	0.9
Lengua	♂	+	0.3
	♀	+	0.2
Músculo Esquelético	♂	++	2.7
	♀	++	1.1
Vejiga	♂	++	0.1
	♀	++	0.7
Colon	♂	+	0.2
	♀	-	0

*Número de nidos promedio en la totalidad del corte

en la cantidad de nidos del parásito al observar los machos normales, machos castrados, hembras normales y hembras castradas entre sí ($P > 0.05$) (Tabla II).

DISCUSIÓN

Los tiempos de supervivencia en animales inoculados y la virulencia de una cepa son parámetros que se deben considerar para distinguir una cepa de otra (Andrade, 1985). En nuestro caso fue la cepa GA la que presentó el mayor tiempo de supervivencia, razón por la cual se escogió para ser usada en animales castrados, mientras que la cepa Oswaldo fue la más virulenta, con los mayores porcentajes de mortalidad y las mayores parasitemias.

Las diferencias en los niveles de parasitemia, y la comparación de los tiempos de supervivencia entre ratones machos y hembras normales ha sido determinante para postular que las hembras son más resistentes a diferentes infecciones parasitarias tales como protozoarios y helmintos (Alexander & Stimson, 1988; Bundy, 1988; Schuster & Schaub, 2001a; Butcher *et al.*, 2002).

Al analizar los resultados obtenidos en este trabajo se observa que las concentraciones del parásito en las hembras normales fueron significativamente menores que las de los machos, con tiempos de supervivencia mayores. Esto concuerda con lo observado por otros autores en niveles de parasitemia de ratones inoculados con diversas cepas (Hauschka, 1947; Goble, 1951; Bice & Zeledón, 1970; McHardy, 1978; Rodríguez *et al.*, 2000; Schuster & Schaub, 2001a; Urzúa *et al.*, 2004). Las hembras tienen una mayor concentración de inmunoglobulinas, además de respuestas de anticuerpos más prolongadas (Ahmed *et al.*, 1985; Gaillard & Spinedi, 1998).

El efecto del sexo, también pudo observarse en el estudio histopatológico donde la cantidad de nidos de amastigotos promedio presentes en los diferentes tejidos examinados, fue mayor en los machos con que en las hembras. Esta mayor cantidad de nidos de parásitos en los ratones machos coincide con el estudio de Bice & Zeledón (1970). En la cepa Bolita, se observó una diferencia

altamente significativa entre la cantidad de nidos del parásito en machos y hembras, por lo que es probable que la respuesta inmunológica de las hembras, estimulada por los estrógenos, aumentara la resistencia en las hembras, evidenciándose en una menor cantidad de nidos (Bouman *et al.*, 2005; Page *et al.*, 2006).

La miocarditis severa encontrada en los ratones inoculados con las cepas Bolita, Capitán y Oswaldo, se puede ligar a los porcentajes de mortalidad y los tiempos de supervivencia.

El uso de condiciones estándar en el experimento es de gran importancia para poder obtener resultados precisos comparativos (Hauschka, 1947; Kagan & Norman, 1960). Dado que en este caso todas las condiciones del estudio fueron controladas, las diferencias observadas sólo pueden explicarse por factores fisiológicos e inmunológicos diferentes entre machos y hembras (Roberts *et al.*, 2001; Butcher, 2002).

Existen varios procedimientos mediante los cuales se pueden manipular las concentraciones hormonales. La castración y la inoculación de hormonas sexuales son los más usados (Tay *et al.*, 1978; Alexander & Stimson, 1988; Do Prado *et al.*, 1998; Schuster & Schaub, 2001b; Tartalini *et al.*, 2011). La castración, en nuestro estudio, influyó los niveles de parasitemia de los ratones sometidos a este procedimiento con respecto a los normales, produciendo diferencias altamente significativas. En el caso de los machos castrados, estos se volvieron más resistentes a la infección al compararlos con los machos normales, efecto que se evidenció en las parasitemias obtenidas, lo cual hace pensar que la disminución en la concentración de testosterona podría favorecer la respuesta inmune (Alexander & Stimson, 1988; Ahmed *et al.*, 1985). La testosterona provoca un efecto inhibitorio sobre el sistema inmunológico, facilitando el avance y la severidad de la infección provocada por *T. cruzi* (Rodríguez *et al.*, 2000; Schuster & Schaub, 2001b; Urzúa *et al.*, 2004; Tartalini *et al.*, 2011).

Por otro lado los estrógenos aumentan la fagocitosis de los macrófagos y promueven la maduración de células B (Ahmed *et al.*, 1985; Gaillard & Spinedi, 1998; Roberts *et al.*, 2001; Bouman *et al.*, 2005; Page *et al.*, 2006). Además,

favorecen los niveles de inmunoglobulinas y la respuesta de anticuerpos es más prolongada por lo que disminuye la severidad de la infección en el caso de hembras infectadas con *T. cruzi* (Alexander & Stimson, 1988; Rodríguez *et al.*, 2000; Schuster & Schaub, 2001b). De ahí que las hembras normales fueran las que presentaron las menores parasitemias, mayores tiempos de supervivencia y menor cantidad de nidos en tejidos. Asimismo, la ovariectomía influyó significativamente en los niveles de parasitemia en las hembras.

La extracción de gónadas provocó alteraciones en el tiempo de supervivencia, ya que los machos castrados presentaron mayores promedios de vida al compararlos con los normales. Sin embargo, en las hembras, a pesar de que hubo diferencias en los niveles de parasitemia, no hubo diferencia significativa al comparar los tiempos de supervivencia entre las hembras castradas y las normales. Autores como Alexander & Stimson (1988), Gaillard & Spinedi (1998) y Schuster & Schaub (2001b), sugieren que el procedimiento de castración puede influenciar el tiempo de supervivencia de ratones infectados con *T. cruzi*, disminuyéndolo en hembras y aumentándolo en machos. Tartalini *et al.*, (2011) comprobaron que la inoculación de testosterona aumenta los niveles de parasitemia en ratas machos inoculados con *T. cruzi* y que la inoculación de antiandrógenos contrarresta este efecto.

En lo que respecta al estudio histopatológico realizado a los ratones normales, al igual que en el caso de la parasitemia, la cepa Oswaldo fue la que mostró la mayor cantidad de nidos del parásito. Para las cepas Bolita, Capitán y Oswaldo se puede afirmar que la totalidad de los tejidos examinados presentaban cierto grado de inflamación, aunque el tejido cardíaco fue el más afectado, pues tanto en las hembras como en los machos se notó una gran cantidad de nidos del parásito e incluso en los animales inoculados con la cepa Bolita, la cantidad de nidos fue incontable. Esta frecuencia parasitaria en el miocardio coincide con lo reportado por Bice & Zeledón (1970), Melo & Brener (1978), Salazar *et al.*, (1978) y Moreno *et al.*, (2002). El segundo tejido en importancia para todas las cepas correspondió al músculo esquelético. Varios autores (Pizzi & Prager, 1953; Bice & Zeledón, 1970; Melo & Brener, 1978 y Moreno *et al.*, 2002) también han observado la presencia de nidos en este tejido.

En la cepa GA la histopatología correspondiente a la comparación entre ratones normales y castrados no evidenció ningún efecto estadísticamente significativo, lo mismo ocurrió entre machos y hembras tanto normales como castrados. Esto indica que al menos para esta cepa, la influencia del sexo no se logró comprobar a través de la histopatología. Si bien las pequeñas diferencias observadas fueron siempre consistentes, no se descarta que con un mayor tiempo de observación, este fin pueda alcanzarse. Para esta cepa, y tanto para los animales normales como para los castrados el tejido donde se observó mayor inflamación fue el músculo esquelético, con presencia de muy pocos nidos; asimismo, los macrófagos fueron las principales células inflamatorias presentes en los tejidos de los ratones inoculados con la cepa GA.

En algunos casos es posible establecer una relación entre los resultados de las parasitemias y la histopatología. Nótese por ejemplo que la cepa Oswaldo fue la que presentó los mayores niveles de parasitemia, la mayor cantidad promedio de nidos de amastigotos en sus tejidos y el menor tiempo de supervivencia. Asimismo, la cepa GA fue la que permitió un mayor tiempo de observación de la infección y porcentajes de mortalidad menores con respecto a las otras cepas, con un daño más leve en los tejidos.

A pesar de diversas opiniones en contra, en este trabajo se demuestra, midiendo diversos parámetros en ratones inoculados con *T. cruzi*, que la influencia del sexo en la infección resulta evidente.

CONFLICTOS DE INTERESES

Los Autores manifestamos que no ha habido conflictos de intereses en la realización de este trabajo.

AGRADECIMIENTOS

Al personal del laboratorio de Patología de la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional, especialmente a la Sra. Laura Alvarado y al Sr. Bernal Valerio; al Hospital de Especies Menores de la Universidad Nacional particularmente al Dr. Mauricio Jiménez, al MSc. Esteban Rodríguez por su colaboración en el área estadística y por proporcionar literatura y al Dr. Bernardo Vargas por su asesoría estadística.

REFERENCIAS

- Ahmed S. A., Penhale W. J & Talal N. (1985). Sex hormones, immune responses and autoimmune diseases. *Am. J. Pathol.* **121**: 531-551.
- Alexander J. & Stimson W. H. (1988). Sex hormones and the course of parasitic infection. *Parasitol. Today.* **4**: 189-193.
- Andrade S. G. (1985). Morphological and behavioural characterization of *Trypanosoma cruzi* strains. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **18**: 39-46.
- Bice D. & Zeledón R. (1970). Comparison of infectivity of strains of *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909). *J. Parasitol.* **56**: 663-670.
- Bouman A., Heineman M. J. & Fass M. (2005). Sex hormones and the immune response in humans. *Hum. Reprod. Update.* **11**: 411-423.
- Bundy D. (1988). Sexual effects on parasite infection. *Parasitol. Today.* **4**: 186 -189.
- Butcher A., Palethorpe H. & Grove D. (2002). Effects of sex and age on the susceptibility of C57BL6J mice to infection with *Brachylaima cribbi* and course of infection in NOD y SCID mice. *Parasitol. Res.* **88**: 668-674.
- Do Prado J. C., Leal M., Anselmo-Franci J., De Andrade H. & Kloetzel J. (1998). Influence of female gonadal hormones on the parasitemia of female *Calomys callosus* infected with the "Y" strain of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol. Res.* **84**: 100 -105.
- Gaillard R. C. & Spinedi E. (1998). Sex and stress-steroids interactions and the immune system. Evidence for a neuroendocrine-immunological sexual dimorphism. *Domest. Anim. Endocrinol.* **15**: 345-352.
- Goble F. (1951). Studies on experimental Chagas disease in mice in relation to chemotherapeutic testing. *J. Parasitol.* **37**: 408-414.
- Hauschka T. (1947). Sex of host as a factor in Chagas disease. *J. Parasitol.* **33**: 399-404.
- Kagan, I & Norman, L. (1960). Immunologic studies on *Trypanosoma cruzi*: Susceptibility of CFW stock mice for the "Tulahuén" strain of *T. cruzi*. *J. Infect. Dis.* **107**: 165-167.
- Maguire J., Mott K., Lehman J., Hoff R., Muniz T., Guimarães A., Sherlock I & Morrow R. (1983). Relationship of electrocardiographic abnormalities and seropositivity to *Trypanosoma cruzi* within a rural community in Northeast Brazil. *Am. Heart J.* **105**: 2857-2940.
- McHardy N. (1978). Effect of sex of mice in relation to their response to immunization with vaccines prepared from *Trypanosoma cruzi*. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* **72**: 201-202.
- Melo R. & Brener Z. (1978). Tissue tropism of different *Trypanosoma cruzi* strains. *J. Parasitol.* **64**: 475-482.
- Moreno E., González N., Rivera I., Guillén B., Lugo A & Añez N. (2002). Caracterización biológica e isoenzimática de aislados de *Trypanosoma cruzi*. *Bol. Dir. Malariol. San. Amb.* **42**: 17-27.
- Mota E., Todd C., Maguire J., Portugal D., Santana O., Ribeiro F & Sherlock I. (1984). Megaesophagus and seroreactivity to *Trypanosoma cruzi* in a rural community in Northeast Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **33**: 820-826.
- Page S. T., Plymate S. R., Bremner W. J., Matsumoto A. M., Hess D. L., Lin D. W., Amory J. K., Nelson P. S. & Wu J. D. (2006). Effect of medical castration on CD4+, CD25+ T cells IFN- γ expression and NK cells: a physiological role of testosterone and/or its metabolites. *Am. J. Physiol-Endocr. Metabol.* **290**: 856-863.
- Pizzi T. & Prager R. (1953). Estabilización de la virulencia de una cepa de *Trypanosoma cruzi* por pasaje seriado en ratones de constitución genética uniforme: Análisis cuantitativo del curso de la infección. *Biológica.* **16**: 3-11.
- Pizzi T., Wallace A., Villagra R., Muñoz S., Ortiz S. & Solari A. (2005). Concordancia de lesiones histológicas en ratones infectados por dos poblaciones de *Trypanosoma cruzi* de Chile. *Rev. Med. Chile.* **133**: 432-438.

- Roberts C. W., Walker W. & Alexander J. (2001). Sex associated hormones and immunity to protozoan parasites. *Clinical. Microbiol. Rev.* **14**: 476-488.
- Rodríguez A. M., Aragort R., De Jesús R., Calcagno M., Maizo Z., Segnini S. & Díaz S. (2000). Tripomastigotes de sangre y de cultivo celular de *Trypanosoma cruzi* Y: Diferencia en la infectividad para ratones Balb/c. *Parasitol. Día.* **24**: 12-21.
- Salazar P., Jiménez M., Tay J. & Cárdenas R. (1978). Estudio comparativo de la patogenicidad de 4 cepas de *Trypanosoma cruzi* en el ratón blanco. *Rev. Latinoam. Microbiol.* **20**: 51-57.
- Schuster J. & Schaub G. (2001)a. Experimental Chagas disease: the influence of sex and phychoimmunological factors. *Parasitol. Res.* **87**: 994 -100.
- Schuster J. & Schaub G. (2001)b. *Trypanosoma cruzi*: The development of estrus cycle and parasitemia in female mice maintained with or without pheromones. *Parasitol. Res.* **87**: 985 – 993.
- Souto R. P., Fernandes O., Macedo A. M., Campbell D. A. & Zingales B. (1996). DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Molec. Bioch. Parasitol.* **83**: 141-152.
- Souza E., Rivera M. T., Araújo-Jorge T. & De Castro S. (2001). Modulation induced by estradiol in the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Parasitol. Res.* **84**: 513-520.
- Tartalini V., Fontanella G., Nocito A. & Revelli S. (2011). Estudio preliminar de la miocarditis chagásica aguda experimental y su relación con la administración de esteroides sexuales. *Insuf. card.* **6**: 156-164.
- Tay J., Guerrero A & Salazar-Schettino P. (1978). Efecto de las hormonas (progesterona y testosterona) sobre la patogenicidad de *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Latinoam. Microbiol.* **20**: 45-50.
- Urzúa C., Morales M, Vergara U., Palau M. T. & Zúñiga C. (2004). Sexo del hospedero y dosis infectante de parásitos como factores de desarrollo de la infección con *Trypanosoma cruzi* en un modelo murino. *Parasitol. Latinoam.* **59**: 104-109.
- Widmer C. & Azevêdo E. (1972). Sexo do hospedeiro humano e o desenvolvimento de formas parasitarias do *Trypanosoma cruzi* no miocárdio. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo.* **2**: 109 -113.
- Zúñiga C., Vargas R., Courcelles M. & Vergara V. (1997). Infección experimental con *Trypanosoma cruzi* en machos y hembras de tres cepas de ratones. *Parasitol. Día.* **21**: 85-91.

Recibido el 29/06/2012
Aprobado el 07/10/2012