

Estudio preliminar de la miocarditis chagásica aguda experimental y su relación con la administración de esteroides sexuales

Vanina M. Tartalini^{1*}, Germán H. Fontanella^{1*}, Ana L. Nocito², Silvia S. Revelli¹

Resumen

Introducción. En nuestro modelo experimental, la infección aguda por *Trypanosoma cruzi* (T. cruzi) en ratas adultas cursa con una parasitemia poco evidente, mientras que en los animales prepúberes (PP) se registran parasitemias más elevadas. Estas discrepancias podrían asociarse a la inmadurez inmunológica que exhiben los animales más jóvenes, pero asimismo, a la diferente madurez sexual del huésped al momento de la infección. Siendo la testosterona (T) una hormona capaz de influir sobre las células del sistema inmune y en consecuencia modificar el curso de las infecciones parasitarias, nos propusimos evaluar el efecto de dosis fisiológicas de T sobre la miocarditis aguda en fase temprana en ratas PP.

Material y métodos. Se inocularon 1 millón de T. cruzi al destete y dos dosis de T de 1 mg/kg de peso, previo al T. cruzi. Se realizaron los controles respectivos, incluido un grupo experimental que recibió bicalutamida, antagonista de la T (5 mg/kg/día) +T+T. cruzi. Se evaluó parasitemia a los 7, 10 y 14 días post infección (pi) y se realizó el estudio anatómo-patológico de corazón, timo y bazo a los 4, 7 y 14 días pi.

Resultados. A los 14 días pi, los animales que recibieron dosis fisiológicas de T presentaron un incremento significativo en la parasitemia y desarrollaron una mayor esplenomegalia que el resto de los grupos infectados. El estudio histológico de esos grupos reveló una miocarditis de intensidad similar -moderada a intensa- y nidos de amastigotes, mientras que en los animales sacrificados al día 4 y 7, se observó nidos de amastigotes sin reacción inflamatoria. Los controles no presentaron alteraciones histológicas.

Conclusiones. La administración de T en los animales PP, previo a la infección con T. cruzi, propició la replicación temprana del parásito, evidenciada por el aumento en la parasitemia; sin embargo, no fue capaz de modificar la lesión cardíaca aguda en fase temprana ni tardía.

Insuf Card 2011;(Vol 6) 4:156-164

Palabras clave: Miocarditis chagásica aguda - Testosterona - Modelo experimental en ratas

Summary

Preliminary study of experimental acute Chagasic cardiomyopathy and its relation to sex steroid administration

Background. According to our experimental model, along the acute phase of Chagas illness, adult rats infected with *Trypanosoma cruzi* (T. cruzi) presents very low and almost undetectable parasitemias, whereas in prepubertal animals (PP) parasitemias reported were higher than in the adult ones. These differences could be associated with the immunological immaturity exhibited by younger animals, but also owing to the different sexual maturity of the host at the time of

¹ Instituto de Inmunología. Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Rosario. Rosario. Santa Fe. República Argentina.

² Cátedra de Anatomía y Fisiología Patológicas. Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Rosario. Rosario. Santa Fe. Rep. Argentina.

* Los autores contribuyeron equitativamente en este trabajo.

Correspondencia: Vanina M. Tartalini.
Moreno 1171 Piso 4 Dpto "B".
C.P:2000. Rosario. Santa Fe. República Argentina.
E-mail: vanitarta@hotmail.com

Recibido: 14/06/2011

Aceptado: 27/09/2011

infection. As testosterone (T) is a hormone that can influence immune system cells and thus modify the course of parasitic infections, we have evaluated the effect of physiological doses of T on early acute stage of myocarditis in rats PP.

Methods and material. *Two doses of T (1 mg/kg) were inoculated to weaning rats (prior infection) followed by the inoculation of 1 million of T. cruzi trypomastigotes. The proper controls were performed, including an experimental group which received a concomitant therapy of bicalutamide, an antagonist of T (5 mg/kg/day), plus T and T. cruzi inoculation. Parasitemia was assessed at 7, 10 and 14 days post infection (pi) and the anatomopathological studies of heart, thymus and spleen were also performed at 4, 7 and 14 days pi.*

Results. *At 14 day pi, those animals receiving physiological doses of T showed a significant increase in parasitemia and developed a higher splenomegaly compare to the rest of the infected groups. The histological examination of these groups presented a myocarditis of similar intensity -moderate to intense-, and amastigotes nests, while at days 4 and 7, amastigotes nests were observed without inflammatory reaction. Controls did not present histological alterations.*

Conclusions. *Administration of T in the PP animals prior to T. cruzi infection led to an early parasite replication, as evidenced by the increase in parasitemia, however, it was not able to modify the acute cardiac injury during the early or late stage.*

Keywords: Acute chagasic myocarditis - Testosterone - Experimental model in rats

Resumo

Estudo preliminar de miocardite chagásica aguda experimental e sua relação com a administração de esteróides sexuais

Introdução. *Em nosso modelo experimental, a infecção aguda pelo Trypanosoma cruzi (T. cruzi) em ratos adultos cursos com parasitemia evidente pouco, enquanto que em animais pré-púberes (PP) são registrados parasitemias mais elevadas. Estas discrepâncias podem estar associadas à imaturidade imunológica exibidos por animais mais jovens, mas também para a diferente maturidade sexual do parasitado no momento da infecção. Como o hormônio testosterona (T) que pode influenciar as células do sistema imunológico e, assim, modificar o curso das infecções parasitárias, nós avaliamos o efeito de doses fisiológicas de T em estágio inicial miocardite aguda em ratos PP.*

Material e métodos. *Um milhão de T. cruzi foram inoculados a desmame e duas doses de T de 1 mg / kg, antes a T. cruzi. Respetivos controles foram realizados, incluindo um grupo experimental que receberam bicalutamida, um antagonista da T (5 mg/kg/dia) + T + T. cruzi. Parasitemia foi avaliada aos 7, 10 e 14 dias após a infecção (ai) e realizado o estudo patológico do coração, timo e baço a 4, 7 e 14 dias ai.*

Resultados. *Aos 14 dias ai, os animais que receberam doses fisiológicas de T mostraram um aumento significativo na parasitemia e desenvolveram uma maior esplenomegalia que outros grupos infectados. Exame histológico desses grupos revelou uma intensidade similar de miocardite -moderada a intensa-, e ninhos de amastigotas, enquanto em animais sacrificados nos dias 4 e 7, ninhos de amastigotas foram observados sem reação inflamatória. Os controles não apresentaram alterações histológicas.*

Conclusões. *A administração de T nos animais PP antes da infecção com T. cruzi, levou à replicação inicial do parasita, como evidenciado pelo aumento da parasitemia, entretanto, não foi capaz de modificar a lesão cardíaca aguda na fase precoce ou tardia.*

Palavras - chave: Miocardite chagásica aguda - Testosterona - Modelo experimental em ratos

Introducción

En Brasil y hacia el año 1909, Carlos Justiniano Ribeiro das Chagas describe el ciclo completo del *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) agente etiológico de la enfermedad que hoy lleva su nombre^{1,5}. En la República Argentina, fueron los estudios encabezados por el Dr. Salvador Mazza los que condujeron al reconocimiento de la importancia de esta enfermedad². Se trata de una zoonosis protozoaria ampliamente distribuida en América Latina. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) afecta alrededor de 20 millones de personas, con 500.000 casos nuevos y 40.000 muertes anuales, existiendo en nuestro país alrededor de 2,3 millones de infectados^{1,3}.

La infección por este hemoflagelado se caracteriza por un período inicial, llamado fase aguda, asintomático o

con manifestaciones locales y/o sistémicas que van desde un síndrome febril hasta miocarditis o encefalitis, potencialmente mortales⁴. En esta etapa, se detectan parásitos en sangre y, también a nivel tisular, bajo la forma de "nidios" de amastigotes intracelulares¹. Transcurrido el período agudo y habiéndose desarrollado una respuesta inmune específica, se produce la depuración de los parásitos en circulación y la sintomatología desaparece. En la fase siguiente, conocida como etapa crónica, la única evidencia de la infección es la serología positiva. En un alto número de infectados, esta etapa perdura durante toda la vida del individuo. Sin embargo, un 30% de los infectados, décadas después de la primoinfección, desarrollan las formas clínicas viscerales de la enfermedad crónica: la miocardiopatía chagásica crónica (MCC) y/o las megavisceras (megacolon y megaesófago)⁵.

En la epidemiología de la enfermedad de Chagas existen datos controvertidos en cuanto a la influencia de variables como sexo, edad o raza. Algunos autores han señalado que la MCC y la esofagopatía chagásica son más frecuentes, severas y de desarrollo más precoz en hombres que en mujeres^{6,7}. En cuanto a la edad, se sabe que fases agudas sintomáticas ocurren principalmente en recién nacidos (infección congénita) o en niños⁸. La mortalidad durante esta etapa también es mayor si la infección tiene lugar durante el primer año de vida⁹. La esofagopatía chagásica se observa más frecuentemente durante la segunda década de vida; en tanto que la MCC generalmente se detecta más tarde, durante la tercera, cuarta o quinta década de la vida^{3,10}.

Esta diferente susceptibilidad en relación a la edad y sexo también ha sido observada en animales de experimentación^{11,12}. En el Instituto de Inmunología de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Rosario (Rep. Argentina), observamos que la infección aguda en ratas macho prepúberes (PP) de la línea "1", da lugar a altas parasitemias; mientras que en animales adultos (A) se produce una etapa aguda de escasa jerarquía, con parasitemias apenas perceptibles, incluso cuando estos últimos son inoculados con una dosis de parásitos 7 veces mayor que los PP debido a las diferencias en el peso corporal¹². También se ha descrito, tanto en humanos como en modelos de laboratorio, la influencia que la edad y el sexo tienen sobre el curso de la infección de otras protozoosis como paludismo¹³ y leishmaniasis¹⁴. Probablemente, la mayor o menor susceptibilidad a las infecciones asociada a una edad temprana o al sexo sea un fenómeno multifactorial, en donde interactúen, entre otros, el grado de madurez del sistema inmune y factores endócrinos. Entre estos últimos, se sabe que los niveles de las hormonas sexuales difieren con la edad en todas las especies y sus variaciones producen cambios evidentes en la respuesta inmune entre machos y hembras^{15,16}. Así, los animales machos infectados con *T. cruzi* son más susceptibles que las hembras¹⁷. Este incremento en la susceptibilidad es atribuido a los efectos inmunosupresores de la testosterona (T)¹⁸. Por esta razón, las diferencias observadas en nuestro laboratorio en el curso de la infección chagásica en relación a la edad, podrían atribuirse no sólo a un diferente *status* inmunológico, sino también a diferencias en la madurez sexual de las ratas en el momento de la infección. En este sentido, en nuestro modelo los niveles basales de T en los animales PP son considerablemente menores que en las A^{19,20}, siendo admisible pensar que la administración de dosis fisiológicas de la hormona en estos animales podría optimizar su resistencia al parásito.

En base a nuestra experiencia en el modelo animal de infección chagásica y para profundizar sobre la posible influencia de la T en la diferente susceptibilidad observada entre PP y A, nos proponemos examinar el efecto producido por la administración de T en el grupo PP sobre el control parasitario y la miocarditis aguda en su fase más temprana.

Material y métodos

Animales

Se utilizaron ratas de la línea endocriada "1", provenientes del Bioterio Central, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Rosario (Rep. Argentina). Los animales se mantuvieron bajo un régimen de 12 horas de luz, temperatura regulada del criadero y tuvieron agua y alimento *ad libitum*. Todos los procedimientos se realizaron siguiendo las normas internacionales para el cuidado y uso de animales de laboratorio.

Diseño experimental

Se comenzó trabajando con un grupo de madres con sus crías, machos y hembras. Luego se seleccionaron al azar 11 madres adoptivas con 6 crías machos cada una, como puede verse esquematizado en la Figura 1a. Al día 14 de vida, se formaron, al azar, 4 grupos y a las crías se les administró la primera dosis de T. Al día 21, se realizó el destete y se conformaron los grupos experimentales (Figura 1b). Ese mismo día los animales recibieron la segunda dosis de T y seis horas después la primera dosis de bicalutamida, y de ahí en más se les aplicó una dosis diaria hasta el final del experimento según correspondiese. Luego se realizó la inoculación con *T. cruzi*. En la Figura 1c, se observa un esquema de lo realizado.

Administración de testosterona

Los animales recibieron 1 mg/kg peso de propionato de T (Testoviron Depot® Schering) en aceite de sésamo (vehículo: V), vía intramuscular.

Dosaje sérico de la hormona

Los dosajes se realizaron al destete y a los 1, 2, 4 y 7 días post-infección (pi) por quimioluminiscencia (Elecsys Testosterona® Roche).

Administración de bicalutamida (B)

Los animales recibieron 5 mg/kg peso de B (Bitakebir® Aspen) diluida en solución fisiológica (SF) más gelatina 1%, vía subcutánea.

Parásitos e infección

Los animales se infectaron a los 21 días de edad con 1.10^6 tripomastigotes suspendidos en SF, cepa Tulahuén, vía subcutánea.

Monitoreo de la infección

Las repercusiones sistémicas de la fase aguda de la enfermedad se monitorearon mediante la evaluación de sobrevivencia, peso y parasitemia. La parasitemia se evaluó por método directo contando los parásitos en 50 campos microscópicos, siguiendo condiciones previamente estandarizadas²¹.

Evaluación del desarrollo y comportamiento sexual

Se evaluó semanalmente el comportamiento de los animales y las posibles modificaciones en los caracteres sexuales

siguiendo a Larralde y colaboradores^{22,23}.

Resultados

Estudio anátomo-patológico

Previa anestesia con ketamina/xilacina, los animales fueron sacrificados a los 4, 7 y 14 días pi. Los órganos (corazón, timo, bazo y testículo), recolectados en cada uno de los intervalos mencionados, se pesaron, se lavaron en PBS y se fijaron en *buffer* formol 10% durante 24 hs. Secciones continuas de 5 μ se colorearon con H&E, PAS y Giemsa. Para la evaluación del daño miocárdico, la miocarditis fue clasificada en diferentes grados de intensidad: leve (L), moderada (M) e intensa (I), siguiendo los parámetros propuestos en publicaciones previas²⁴.

Análisis estadístico

Los datos se analizaron estadísticamente por Kruskal-Wallis y la U de Mann Whitney.

Niveles séricos de testosterona

En el Gráfico 1, se observan las concentraciones de T pre y post infección con *T. cruzi* (días 0, 1, 2, 4 y 7 pi, respectivamente). Como se esperaba, a lo largo del experimento los valores séricos de T aumentan progresivamente sin alcanzar las concentraciones de animales adultos (en promedio 2 μ g/ml)²⁰. Sin embargo, en ninguna de las determinaciones se observan diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes grupos experimentales.

Evaluación de la infección

Durante la primera etapa de la fase aguda, la infección fue monitoreada evaluando sobrevida, peso de los animales y parasitemia.

En todos los grupos experimentales la sobrevida fue del

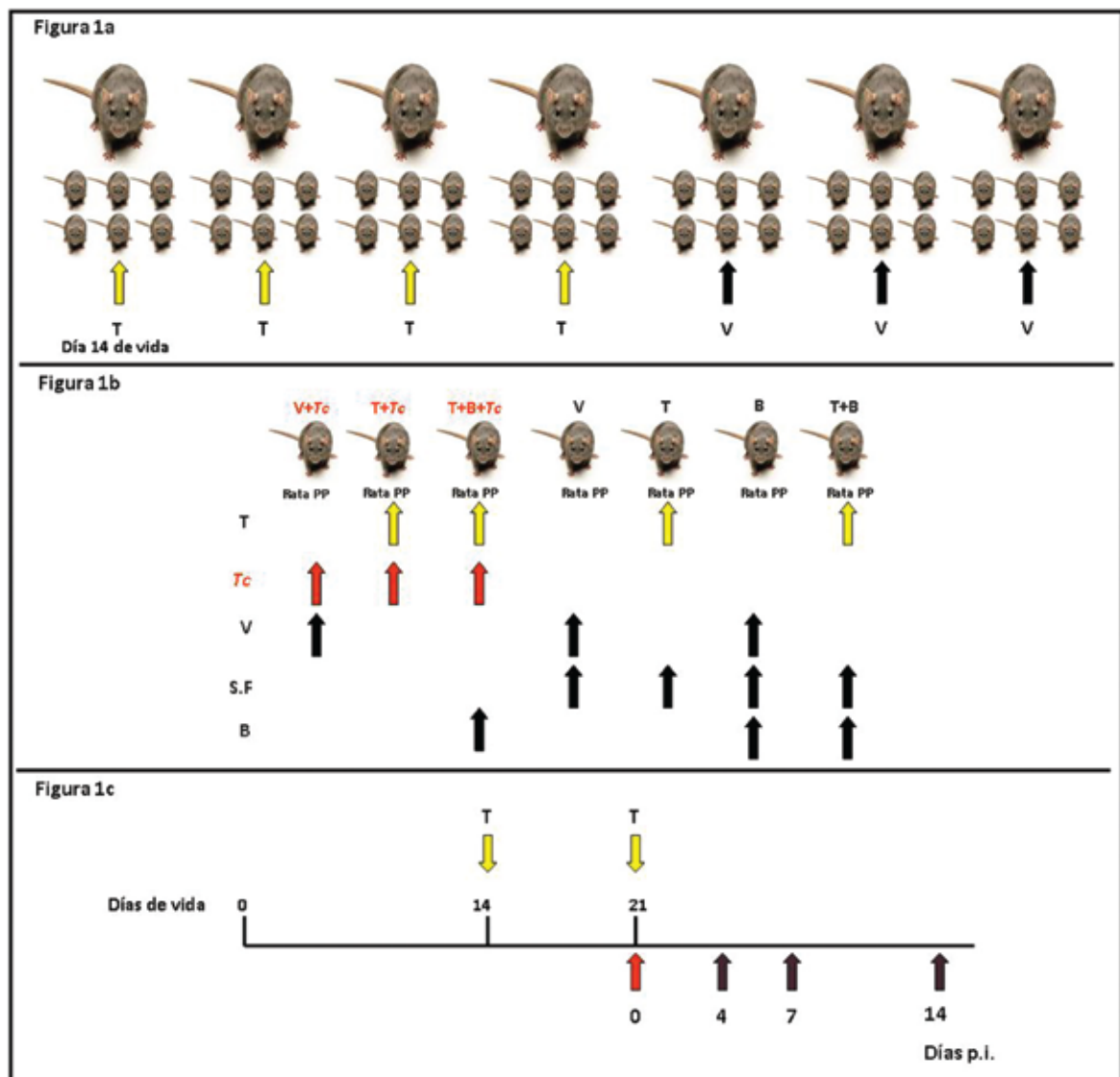


Figura 1. Esquema experimental. a. Cuando los animales tenían 14 días de vida, recibieron la primera dosis de testosterona (T). b. Grupos experimentales, diseñados con los animales prepúberes (PP). c. A los animales se les administró T a los 14 y 21 días de edad y bicalutamida (B) desde este último día hasta el día 14 post-infección (pi). Además, a los 21 días de edad se les inoculó con *T. cruzi* (Tc) y a partir de ese momento a los 4, 7 y 14 días pi fueron sacrificados para obtener las muestras para el estudio histopatológico del corazón.

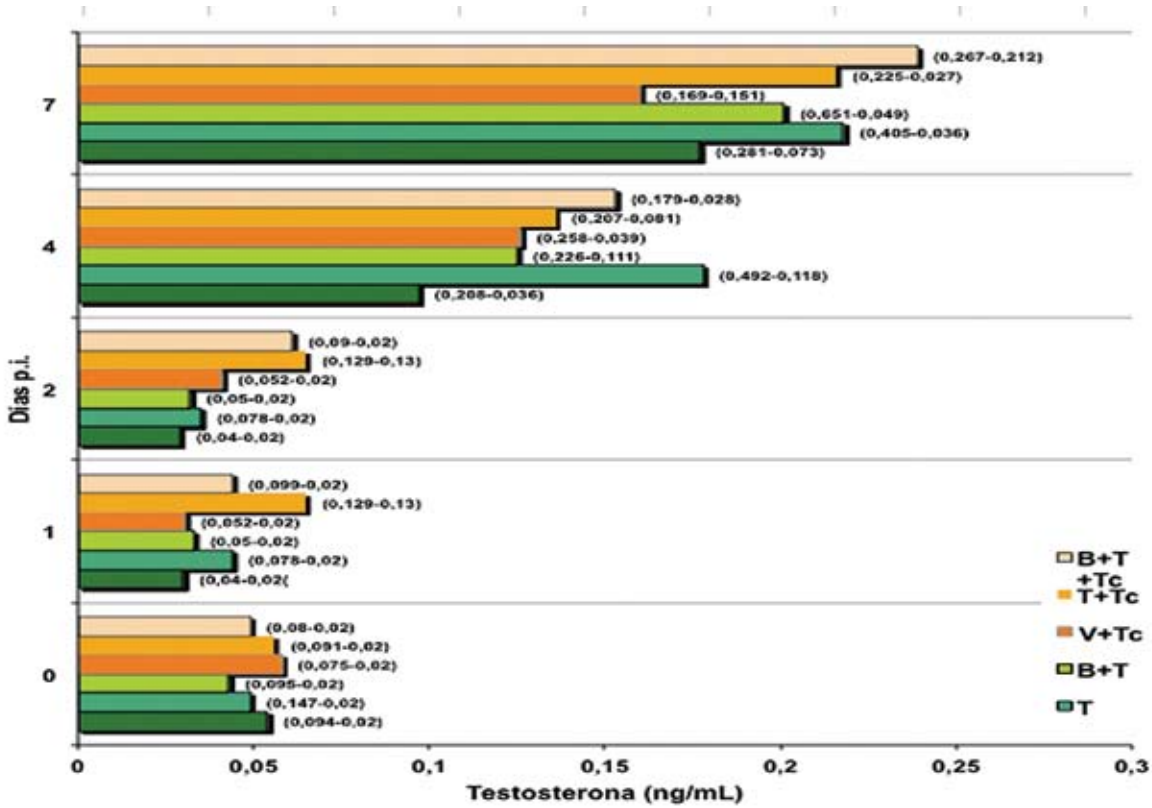


Gráfico 1. Testosterona sérica. Las barras representan los valores de mediana (rango) en ng/mL de la hormona, determinados en los distintos grupos experimentales. Las determinaciones al día 0, se hicieron previamente a la inoculación del parásito. Se muestran los resultados de 1, de 2 vueltas experimentales similares.

100% y el peso corporal no sufrió modificaciones. En el Gráfico 2, se puede observar la evolución de la parasitemia. Los animales una vez infectados, comienzan a elevar el número de parásitos en sangre, hasta alcanzar un nivel máximo, luego éstos comienzan a descender y la parasitemia se hace negativa, aproximadamente a los 28 días pi. Debido a que en este experimento el sacrificio de los animales se realizó los días 4, 7 y 14 pi, no fue

posible obtener estos últimos datos^{19,20}. Los animales que recibieron T (grupo T+Tc), muestran una evolución diferente, esto se evidencia al día 14 pi, donde los valores son significativamente mayores que en el grupo infectado solamente (V+ Tc). Las parasitemias en aquellos animales que recibieron T y B (Grupo B+T+ Tc) resultaron similares a los animales infectados no tratados.

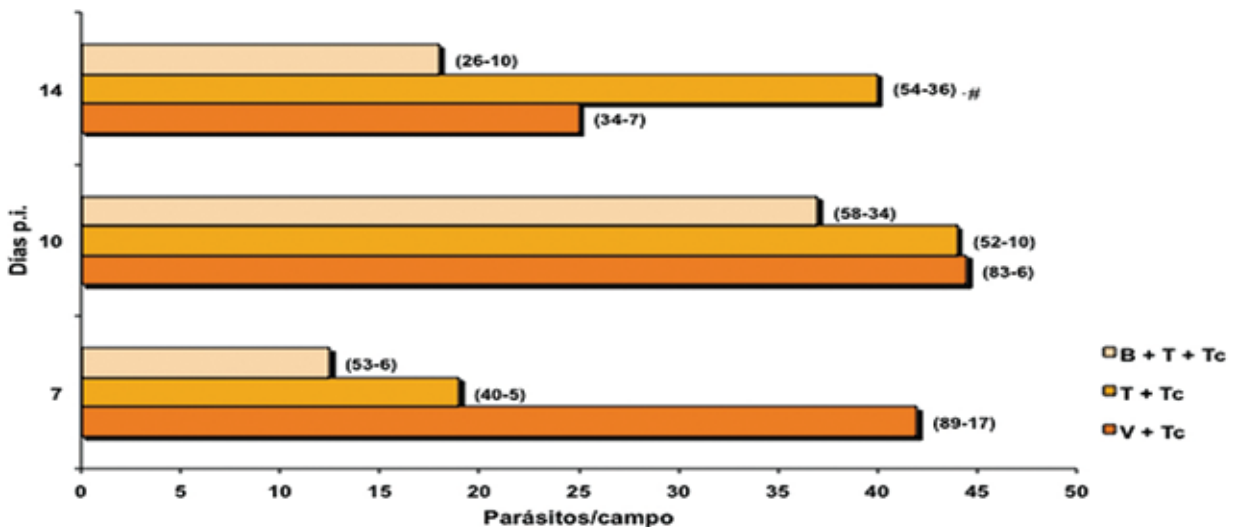


Gráfico 2. Parasitemia. Los valores de parasitemia se expresan como mediana (rango). Al día 14, la parasitemia es significativamente mayor en los animales infectados y que solamente recibieron testosterona (T), # p<0,01. Se muestran los resultados de 1, de 2 vueltas experimentales similares.

Estudio anátomo-patológico

Clásicamente, se ha descrito un efecto negativo de la T sobre el peso tímico y sobre el volumen y el peso testicular, de ahí la evaluación de estos últimos parámetros^{25,26}. En relación a esto, no observamos diferencias en el peso del timo ni alteraciones histopatológicas significativas en los diferentes grupos experimentales (datos no mostrados). En el Gráfico 3, pueden observarse los pesos absolutos de los testículos de los animales obtenidos a cada uno de los intervalos de tiempo estudiados (4, 7 y 14 días pi). Sólo a los 4 días pi se observaron diferencias estadísticamente significativas en los animales tratados con T (grupos T y T+ Tc). Esta diferencia se mantuvo también en el grupo T+ Tc a los 14 días pi.

En la Tabla 1a, se observan los resultados del estudio histopatológico del corazón de los animales al día 4 pi, donde aparecen los nidos de amastigotes en 4 de 9 animales infectados. En lo referente a los animales sacrificados al día 7 pi, los nidos de amastigotes se encontraban presentes en 8 de 9 animales infectados. En ambos grupos no fue posible detectar la presencia de infiltrado inflamatorio. Mientras que al día 14 pi, se observaron nidos de amastigotes en todos los animales y aparece la lesión cardíaca. La Tabla 1b, muestra que la frecuencia y el grado de lesión cardíaca son similares en todos los animales infectados, independientemente de que hayan sido o no tratados con T o T+B. Un ejemplo de esto se puede observar en las imágenes de la Figura 2: A y B al día 7 pi, en la cual vemos nidos de amastigotes, y en lo que respecta a las imágenes C y D, las mismas muestran infiltrado inflamatorio destruyendo fibras miocárdicas; en C se observa una miocarditis moderada y en D una miocarditis intensa.

El bazo es un órgano comprometido comúnmente en varios modelos animales de enfermedad de Chagas²⁷. En este sentido, la esplenomegalia y las linfadenopatías relacionadas con una activación policlonal de células B y T son rasgos típicos de la infección por *T. cruzi*. Por esta razón, se analizó

Tabla 1. Estudio anátomo-patológico del corazón			
a- NIDOS DE AMASTIGOTES (ratas con nidos de amastigotes en miocardio/Total)	V+Tc	T+Tc	T+B+Tc
4 pi	2/3	0/3	2/3
7 pi	3/3	2/3	3/3
14 pi	6/6	5/5	4/4
b- MIOCARDITIS	V+Tc	T+Tc	T+B+Tc
LEVE	-	-	-
MODERADA	3	2	2
INTENSA	3	3	2
Animales con lesión /Total	6/6	5/5	4/4

a. Número de animales que presentaron nidos de amastigotes en el corazón, estudiados al día 4, 7 y 14 post-infección (pi).
b. Los grupos infectados al día 14 pi muestran una miocarditis de grado moderado e intenso en porcentajes similares en todos los casos: V+Tc, Leve: 0/6, 0%, Moderada: 3/6, 50%, Intensa: 3/6, 50%. T+Tc, Leve: 0/6, 0%; Moderada: 2/5, 40%; Intensa: 3/5, 60%. T+B+Tc, Leve: 0/6, 0%; Moderada: 2/4, 50%; Intensa: 2/4, 50%. No se encontraron lesiones en los animales no tratados. Se muestran los resultados de 1, de 2 vueltas experimentales similares.

el peso del bazo (Gráfico 4). Hacia el día 7 pi, todos los grupos experimentales infectados con *T. cruzi* evidenciaron una importante esplenomegalia (p=0,05 con respecto a los controles no infectados). A su vez al comparar los distintos grupos infectados entre sí, el grupo T+ Tc presentó un aumento en el peso del bazo de mayor cuantía con respecto a los grupos V+ Tc y B+T+ Tc.

Discusión

Los sistemas inmunes y endócrino se hallan íntimamente relacionados tanto en forma anatómica como funcional²⁸. Esta interconexión se hace evidente cuando se observa el fenómeno del dimorfismo sexual inmunológico. Dicho fenómeno se manifiesta por la desigual susceptibilidad a enfermedades entre ambos sexos, así por ejemplo, algunas patologías son más prevalentes o más severas en machos

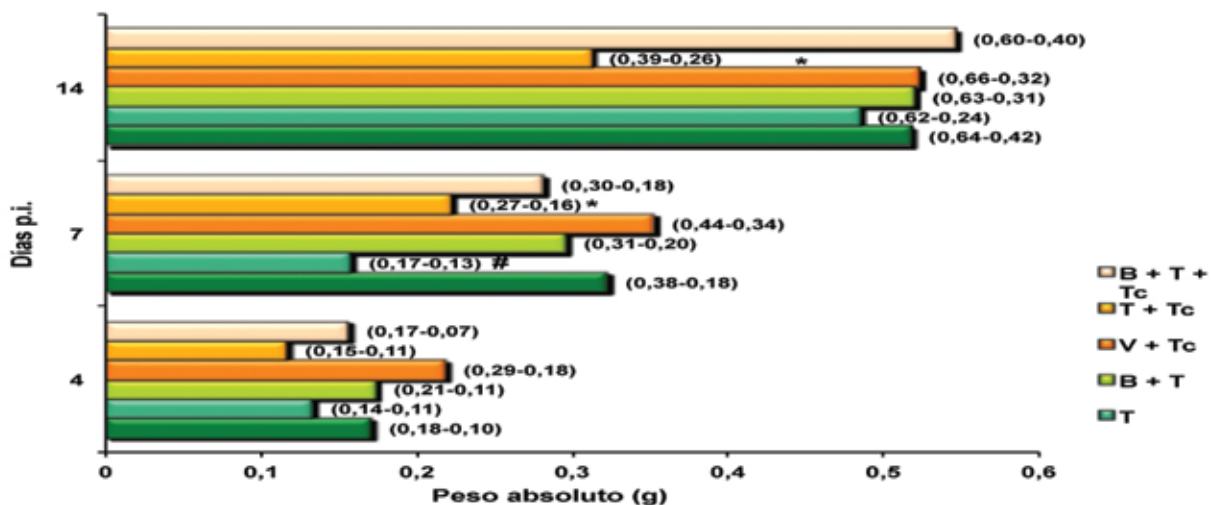


Gráfico 3. Cambios en el peso de los testículos de las ratas tratadas con dosis fisiológicas de testosterona (T)
Se pesaron ambos testículos de cada animal por separado y se estableció la mediana y el rango de cada grupo experimental en gramos. Hacia los días 7 y 14 post-infección (pi) los grupos tratados con T evidencian una disminución en el peso testicular al compararlos con los grupos no tratados, # y *p<0,05. Se muestran los resultados de 1, de 2 vueltas experimentales similares.

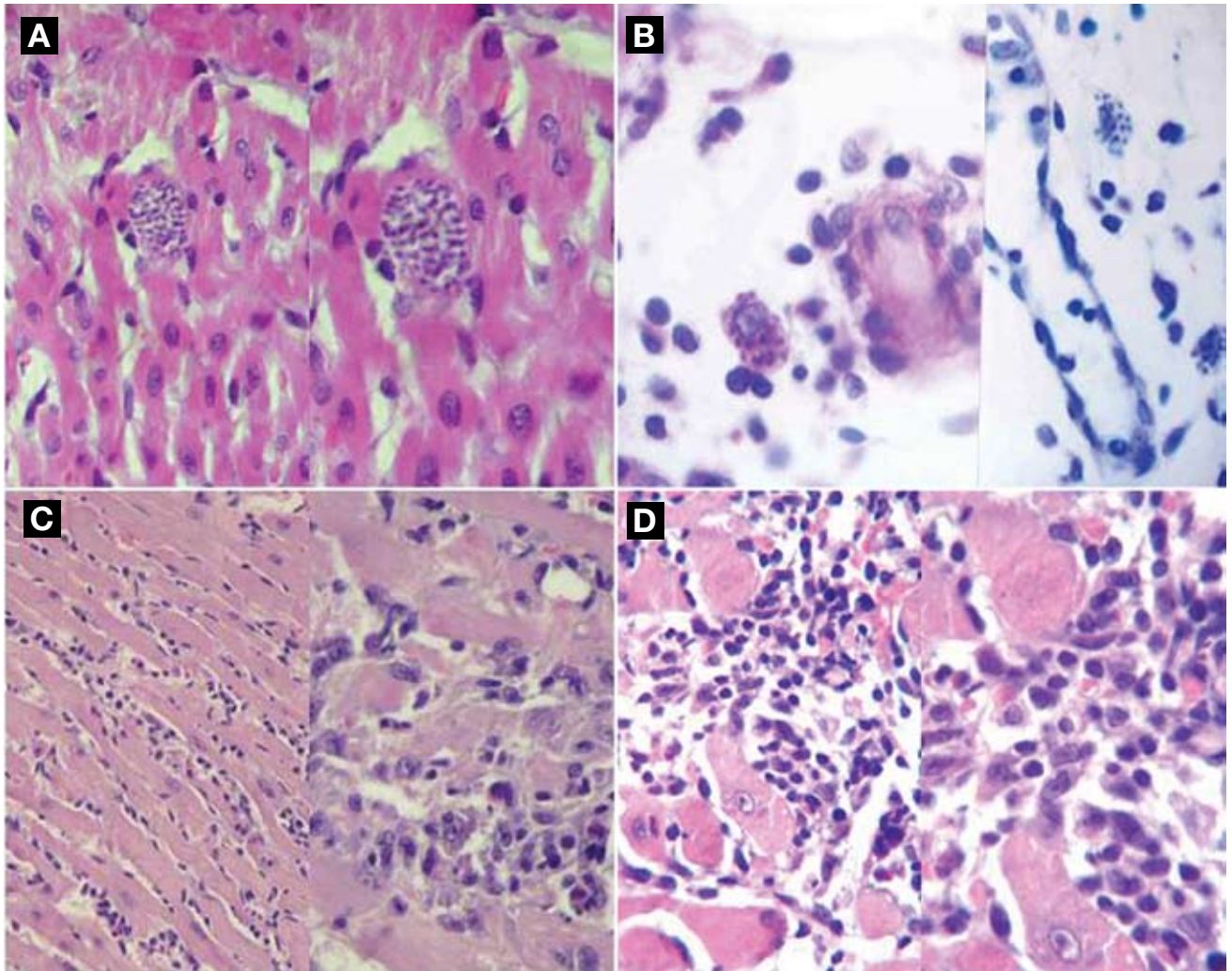


Figura 2. Imágenes histológicas de miocardio. A y B: día 7 post-infección, nidos de amastigotes en ausencia de infiltrado inflamatorio (A: 400X y 600X-H&E y B: 1000X-PAS y Giemsa). C y D: día 14 post-infección 200X y 400X-H&E. C: fibras miocárdicas distorsionadas por la presencia de infiltrado inflamatorio constituido por linfocitos y macrófagos, miocarditis moderada y D: miocarditis intensa.

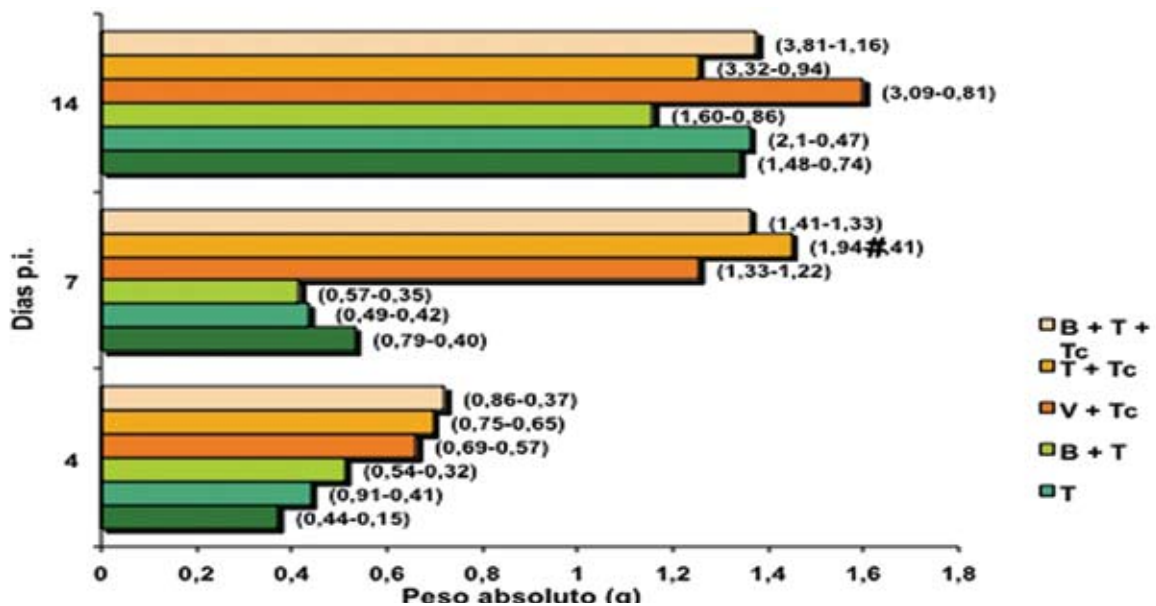


Gráfico 4. Esplenomegalia en los distintos grupos de animales infectados o no con *T. cruzi*. El peso del órgano registrado a los 4, 7 y 14 días post-infección (pi) se presenta como mediana (rango) en gramos. El análisis estadístico demostró diferencias significativas en esta variable en los animales infectados vs no infectados al día 7 pi, $p < 0,05$ (no señalado). Al mismo día, el grupo T+Tc difirió significativamente de los otros dos grupos infectados, # $p < 0,05$. Se muestran los resultados de 1, de 2 vueltas experimentales similares.

que en hembras, o viceversa²⁹⁻³². Probablemente esto esté relacionado con el hecho de que las hormonas sexuales influyen un gran número de mecanismos de la respuesta inmune, incluyendo la maduración y selección de timocitos, la proliferación de linfocitos, la apoptosis, el tránsito celular, la expresión de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad clase II, la fagocitosis y la producción de citocinas. En general se acepta que los estrógenos potencian la inmunidad mediada por los linfocitos B, a la vez que suprimen algunos aspectos de las células T; mientras que la T, principal hormona sexual masculina, suprimiría tanto la respuesta B como la T²⁸⁻³³.

En los mamíferos, los niveles de algunas hormonas esteroideas no sólo varían entre machos y hembras, sino también con la edad o la madurez sexual²⁸. Por ejemplo, durante la pubertad masculina, ocurren marcadas fluctuaciones en los niveles de T y su precursor dehidroepiandrosterona^{34,35}. Estas fluctuaciones en los niveles hormonales durante las distintas etapas del desarrollo, podrían producir profundos efectos sobre el sistema inmune.

En lo que respecta a las infecciones parasitarias, los esteroides sexuales pueden influir sobre el grado de control y resistencia anti-parasitaria, ya sea estimulando o inhibiendo la respuesta inmune³⁶. Específicamente en la infección por *T. cruzi*, es evidente que las hormonas sexuales influyen el curso de la infección y por lo tanto la susceptibilidad/resistencia a la misma. Así, los animales machos infectados con *T. cruzi* son más susceptibles que las hembras³¹. Este incremento en la susceptibilidad es atribuido a los efectos inmunosupresores de la T³⁷.

En nuestro modelo experimental, la infección aguda por *T. cruzi* en ratas A cursa con una parasitemia poco evidente, mientras que en los animales PP se registran parasitemias más elevadas¹². Sin duda, la inmadurez del sistema inmune en el grupo PP está directamente relacionada con estas observaciones. Sin embargo, tras estudiar el grado de funcionalidad de los macrófagos, la actividad del sistema del complemento y la producción de anticuerpos específicos en ambos grupos etarios de animales, sólo los anticuerpos específicos parecen estar involucrados en el mejor manejo de la infección por parte de los animales A³⁸. En este sentido, la producción de anticuerpos puede estar influenciada no sólo por factores inherentes a la respuesta inmune (como el balance de citocinas, el tipo de patógeno, *T. cruzi*); sino también puede ser afectada por otras variables. Entre ellas se encuentra el medio ambiente hormonal³², en particular el producido por los esteroides sexuales. Así, los esperables distintos niveles de T entre ratas PP y A podrían claramente influir en el desarrollo de la respuesta inmune efectora anti-parasitaria³⁷.

En resumen, todas estas discrepancias en susceptibilidad/resistencia a la infección con *T. cruzi* están asociadas a la edad del animal y, por tanto, a la inmadurez inmunológica que exhiben los animales más jóvenes; pero asimismo, también parecen estar vinculadas con la diferente madurez sexual del huésped al momento de la infección. Hemos observado que los niveles basales de T en los animales PP son considerablemente menores que en los A y que recién hacia los 50-56 días de edad las ratas macho alcanzan la madurez sexual, en

términos de niveles de T²⁰.

Todas estas observaciones nos condujeron a especular que la T o sus metabolitos podrían jugar un rol importante en la génesis de la respuesta anti-parasitaria. De ahí que encaramos el estudio actual, donde nos propusimos evaluar los cambios desarrollados en animales PP luego de la administración de T en dosis fisiológicas. Para ello, administramos un análogo de depósito de la T sin modificar los niveles séricos basales de la misma en las ratas PP. Con el fin de evaluar aún más la probable influencia de esta hormona o sus subproductos se administró a un grupo de ratas un anti-receptor de la T. Se trata de la B, un antiandrógeno no esteroide, desprovisto de otras actividades endócrinas, que se une a los receptores de T sin activar la expresión génica, inhibiendo de esta manera el estímulo androgénico⁴⁰. Como resultado de esta inhibición, se produce un bloqueo de la acción directa de la T; sin embargo, dicha hormona puede metabolizarse normalmente siguiendo las vías habituales. Este grupo de ratas actuaría a modo de grupo control en nuestro ensayo.

Como esperábamos, todos los grupos experimentales presentaron una madurez sexual similar a juzgar por los niveles séricos de T, el estado de los genitales internos y externos y el comportamiento de los animales. Esto nos indicó que la dosis de T administrada no generaba niveles farmacológicos en circulación. Tampoco se observaron cambios a nivel tímico, tanto macroscópicos como histopatológicos. Sin embargo, los grupos tratados con T experimentaron una regresión en el peso testicular, que fue significativa hacia los 7 y 14 días pi, y que se revirtió al recibir concomitantemente B. Al tratarse de dosis fisiológicas era de esperar que no ocurran modificaciones en la producción de los factores de crecimiento hipofisarios responsables directa o indirectamente del crecimiento testicular y de la producción de T por estas gónadas. Sin embargo, para éstas y otras hormonas se han descrito cambios en funciones endócrinas e inmunológicas sobre distintos órganos blanco, aún tras la administración de dosis bajas^{28,33}. También podrían existir diferentes concentraciones tisulares de T o de su metabolito más activo (dehidrotestosterona) que explicaran estos hallazgos³⁵.

En el mismo sentido y contrariamente a lo esperado, el grupo PP tratado con T y posteriormente infectado con *T. cruzi* evidenció parasitemias más significativas que sus controles no tratados o tratados pero con bloqueo de los receptores por parte de la B. Coincidentemente, el desarrollo de esplenomegalia reactiva fue más significativo en este grupo. Estos resultados indican que, a pesar de que los animales reciben dosis fisiológicas de T, parece prevalecer en este grupo la conocida acción inmunosupresora de esta hormona. Además, el comportamiento del grupo infectado y tratado al mismo tiempo con T y B, nos indica que, sobre todo, es la acción directa de la T sobre los tejidos y no la de sus metabolitos la responsable del déficit de actividad anti-parasitaria. Se sabe que la T restringe la producción de anticuerpos, mientras que los estrógenos la promueven^{28,34,41,42}; de ahí que se frenaría la respuesta humoral en el grupo tratado con T y esto generaría un inadecuado control parasitario.

Por otra parte, al realizar el estudio anatómo-patológico, la administración de T en los animales PP, previo a la infección

con *T. cruzi*, no modificó la lesión cardíaca aguda en sus fases más tempranas. En este contexto, consideramos posible que el origen de la mayor o menor susceptibilidad a la infección con *T. cruzi* asociada a una edad temprana y/o a la madurez sexual sea un fenómeno multifactorial, en el que además de las variables mencionadas intervengan otros elementos del huésped y también del parásito. Sería necesario ahondar en la respuesta anti-*T. cruzi* en nuestro modelo y determinar los perfiles de citocinas pro y anti-inflamatorias, los subtipos de anticuerpos y la posible influencia de otras hormonas, como por ejemplo los glucocorticoides⁴³. Además, este estudio debería extenderse a todo el período agudo y sería necesario medir el comportamiento de otras variables endocrinológicas, como el grado de actividad de las enzimas aromatasas y reductasas de la ruta metabólica androgénica⁴⁴, para así poder determinar más adecuadamente la posible influencia de la T o sus metabolitos.

Resaltamos que éste es un estudio experimental en ratas, modelo que representa sólo algunos aspectos de la evolución de la cardiopatía chagásica en el hombre, y por lo tanto, debe tenerse sumo cuidado en la extrapolación de los resultados obtenidos a lo observado en los seres humanos.

Conclusión

Los animales PP tratados con T mostraron un inadecuado control parasitario en el transcurso de las etapas iniciales del período agudo, no observándose modificaciones en la severidad del daño cardíaco. La asociación positiva observada entre T y parasitemia será un motivo para proyectar futuros estudios.

Recursos financieros

No hubo apoyo financiero para este trabajo.

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no existen conflictos de interés.

Referencias bibliográficas

- Rodrigues Coura J., Albajar Viñas P. Chagas disease: a new worldwide challenge. *Nature* 2010; 465 (Suplement): S6-7.
- Storino R, Miles J. Antecedentes históricos. En: *Enfermedad de Chagas 1ª Edición Doyma Argentina*, 1994; 9-30.
- Moncayo A. Chagas disease. En: Murray JL, Lopez AD, Mathers CD, editors. *The global epidemiology of infectious diseases*. Geneva: WHO-World Health Organization; 2004. p. 325-48.
- Rodrigues Coura JE, de Castro SL. A critical Review on Chagas' disease chemotherapy. *Mem Inst Osw Cruz* 2002; 97:3-24.
- Clayton J. Chagas disease 101. *Nature* 2010; 465 (Suplement): S4-5.
- Rassi A Jr., Rassi A, Little W, et al. Development and Validation of a Risk Score for Predicting Death in Chagas' Heart Disease. *N Engl J Med* 2006; 355:799-808.
- Bestetti R. Predictors of unfavourable prognosis in chronic Chagas' disease. *Tropical Medicine and International Health* 2001; 6 (6): 476-483.
- Tanowitz HB, Kirchhoff L, Simon D, et al. Chagas' Disease. *Clin Microbiol Rev* 1992; 5: 400-419.
- Storino R, Miles J. Chagas agudo. En: *Enfermedad de Chagas 1ª Edición Doyma Argentina*, 1994; 209-234.
- Rodriguez-Salas LA, Klein E, Acquatella H, et al. Echocardiographic and clinical predictors of mortality in chronic Chagas' disease. *Echocardiography* 1998; 15: 271-278.
- Nagib P, Dutra WO, Chiari E, et al. *Trypanosoma cruzi*: populations bearing opposite virulence induce differential expansion of circulating CD3+CD4-CD8- T cells and cytokine serum levels in young and adult rats. *Exp Parasitol* 2007; 116: 366-374.
- Revelli S, Moreno H, Berra H, et al. Influencia de la edad de la rata en la evolución de la infección con *Trypanosoma Cruzi*. *Medicina* 1987; 47: 360-366.
- Kurtis JD, Mtalib R, Onyango FK, et al. Human resistance to *Plasmodium falciparum* increases during puberty and is predicted by dehydroepiandrosterone sulfate levels. *Infect. Immun* 2001; 69: 123-128.
- Davies CR, Mazloumi Gavani AS. Age, acquired immunity and the risk of visceral leishmaniasis: a prospective study in Iran. *Parasitology* 1999; 119: 247-257.
- Lamason R, Zhao P, Rawat R, et al. Sexual dimorphism in immune response genes as a function of puberty. *BMC Immunol* 2006; 7: 2-16.
- Marriott I, Huet-Hudson YM. Sexual dimorphism in innate immune responses to infectious organisms. *Immunol Res* 2006; 34:177-192.
- Schuster JP, Schaub GA. Experimental Chagas disease: the influence of sex and psychoneuroimmunological factors. *Parasitol Res* 2001; 87: 994-1000.
- Olsen NJ, Kovacs WJ. Gonadal steroids and immunity. *Endocr Rev* 1996; 17: 369-384.
- Pérez AR, Pascutti MF, Fontanella GH, et al. Influencia de la testosterona sobre la infección causada por *Trypanosoma cruzi*. *Rev Méd Rosario* 2009; 75: 84-92.
- Pérez AR, Bertoya AA, Revelli S, et al. A high corticosterone/DHEA-s ratio in young rats infected with *Trypanosoma cruzi* is associated with increased susceptibility. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2011; 106(4): 416-23.
- Fontanella G, Pascutti M, Daurelio L, et al. Improved ouT. cruzi infection in rats following treatment in early life with suspensions of heat-killed environmental Actinomycetales. *Vaccine* 2007; 25(17): 3492-500.
- Larralde C, Morales J, Terrazas I, et al. Sex hormone changes induced by the parasite lead to feminization of the male host in murine *Taenia crassiceps* cysticercosis. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 1995; 52(6): 575-80.
- Morales J, Larralde C, Arteaga M, et al. Inhibition of sexual behavior in male mice infected with *Taenia crassiceps* cysticerci. *J Parasitol*. 1996; 82 (5): 689-93.
- Revelli S, Dávila H, Ferro M, et al. Acute and chronic experimental *Trypanosoma cruzi* infection in the rat. Response to systemic treatment with recombinant rat interferon-gamma. *Microbiol Immunol* 1995; 39: 275-281.
- Filipin Mdel V, Caetano LC, Brazão V, et al. DHEA and testosterone therapies in *Trypanosoma cruzi*-infected rats are associated with thymic changes. *Res Vet Sci* 2010; 89(1): 98-103.
- Mclachlan RI, Wreford G, Meachem S, et al. Effects of testosterone on spermatogenic cell populations in the adult rat. *Biology of Reproduction* 1994; 51: 945-55.
- Lima ES, Andrade ZA, Andrade SG. TNF-alpha is expressed at sites of parasite and tissue destruction in the spleen of mice acutely infected with *Trypanosoma cruzi*. *Int J Exp Pathol* 2001; 82 (6):327-36.
- Bouman A, Heineman MJ, Faas MM. Sex hormones and the immune response in humans. *Hum Reprod Update* 2005; 11: 411-423.
- De León-Nava MA, Morales-Montor J. Dimorfismo sexual inmunitario: ¿Pueden los esteroides sexuales polarizar el perfil de citoquinas Th1/Th2? *Rev Invest Clin* 2006; 58: 161-169.
- Lamason R, Zhao P, Rawat, R, et al. Sexual dimorphism in immune response genes as a function of puberty. *BMC Immunol* 2006; 7: 2-16.
- Schuster JP, Schaub GA. Experimental Chagas disease: the influence of sex and psychoneuroimmunological factors. *Parasitol Res* 2001; 87: 994-1000.
- Marriott I, Huet-Hudson YM. Sexual dimorphism in innate immune responses to infectious organisms. *Immunol Res* 2006; 34:177-192.
- Olsen NJ, Kovacs WJ. Gonadal steroids and immunity. *Endocr Rev* 1996; 17: 369-384.
- Roberts CW; Walter W, Alexander J. Sex-associated hormones and immunity to protozoan parasites. *Clin Microbiol Rev* 2001; 14: 475-488.
- Labrie F, Bélanger A, Cusan L, et al. Physiological changes in Dehydroepiandrosterone are not reflected by serum levels of active androgens and estrogens but of their metabolites: Intracrinology. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 2403-2409.
- Morales-Montor J, Newhouse E, Mohamed F, et al. Altered levels of hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis hormones in baboons and mice during the course of infection with *Schistosoma mansoni*. *J Infect Dis* 2001; 183: 313-320.
- do Prado J Jr, Levy AM, Leal MP, et al. Influence of male gonadal hormones on the parasitemia and humoral response of male Calomys callosus infected with the Y strain of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol Res* 1999; 85: 826-829.
- Pascutti MF, Bottasso O, Hourquescos MC, et al. Age-related increase in resistance to acute *Trypanosoma cruzi* infection in rats is associated with an appropriate antibody response. *Scand J Immunol* 2003; 58:173-179.
- Verthelyi D. Sex hormones as immunomodulators in health and disease. *Int Immunopharm* 2001; 1: 983-993.
- Cockshott ID. Bicalutamide: clinical pharmacokinetics and metabolism. *Clin Pharmacokinet* 2004; 43(13):855-878.
- Klein SL. The effects of hormones on sex differences in infection: from genes to behavior. *Neurosci Biobehav Rev* 2000; 24: 627-638.
- Klein SL. Hormonal and immunological mechanisms mediating sex differences in parasite infection. *Parasite Immunol* 2004. 26: 247-264.
- Sorells SF, Sapolsky RM. An inflammatory review of glucocorticoid actions in the CNS. *Brain Behav Immun* 2007; 21: 259-272.
- Vacchina P, Valdéz RA, Gómez Y, Revelli S, Romano MC. Steroidogenic capacity of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2008; 111(3-5): 282-286.