

Evolución de la infección con *Trypanosoma cruzi* en cepas susceptibles y resistentes de ratones*

Evolution of *Trypanosoma cruzi* infection in resistant and susceptible mice

C. ZUÑIGA, M.V.; R. VARGAS, T.M.; U. VERGARA, M.V.

Departamento de Medicina Preventiva, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile.
Av. Santa Rosa 11735, La Pintana, Santiago. Casilla 2, Correo 15, La Granja, Santiago.

SUMMARY

Mice from ACA and A.Sn strains were equally susceptible (100% mortality) to intraperitoneal infection with 2000 blood trypomastigotes from Tulahuen strain of *Trypanosoma cruzi*, while A.Sw and HTI strains were resistant (100% survival). However mice from A.Sw and HTI strains showed significantly higher level of parasitemia than the susceptible strains. The histopathology of myocardial and skeletal muscle was evaluated in the susceptible and resistant strains of mice. In the first ten days post-infection no significant differences in tissue damage were observed. However in the third week of infection, while A.Sw and HTI mice showed recovery of tissue lesions, the susceptible A.Sn and ACA showed increased tissue damage although no blood forms and intracellular parasites were detected.

Serum samples from infected mice were tested by dot-immunoradiometric assay, for reactivity against recombinant antigens 1,2,13,26,30,36 and SAPA of *T. cruzi*. All mice sera only reacted with clones 13 and SAPA, suggesting that this reactivity seems not to be involved in susceptibility or resistance to infection with Tulahuen strain of *T. cruzi*.

Palabras claves: Enfermedad de Chagas, cepas congénicas de ratones.

Key words: Chagas' disease, inbred mouse strains.

INTRODUCCION

La Enfermedad de Chagas o tripanosomosis americana, causada por el protozoo *Trypanosoma cruzi*, debido a su amplia distribución y alta prevalencia en el hombre y animales, es uno de los mayores problemas de salud pública, fundamentalmente, en Centro y Sudamérica, (Miles, 1983). La enfermedad es básicamente crónica y afecta a casi 24 millones de personas, existiendo cerca de 90 millones expuestos al riesgo de infección (Moncayo, 1992). La forma

de infección habitual es a través del insecto vector hematófago, pero también puede ocurrir por transfusiones sanguíneas, vía transplacentaria, transplante de órganos y accidentes de laboratorio (Nickerson y col., 1989). En condiciones naturales, *T. cruzi* puede infectar alrededor de 100 especies de mamíferos de diferentes órdenes, incluyendo animales silvestres y domésticos (Texeira y col., 2001). El ratón es un excelente modelo experimental para el estudio de la inmunidad celular y humoral inducida frente a la infección con *T. cruzi*. Las diferentes cepas endogámicas de ratones difieren en la respuesta inmune, existiendo desde cepas altamente resistentes hasta cepas altamente susceptibles, lo que sugiere un control genético involucrado en el fenómeno de la resistencia (Hoft y col., 1993), pero hasta el momento, considerando al

Aceptado: 12.06.2002

* Financiado por Proyecto FONDECYT 1960949, Swedish Agency for Research Cooperation (SAREC) y Agencia de Cooperación Internacional AGCI/Chile.

humano y numerosos modelos experimentales, no se conocen con certeza los factores involucrados en la resistencia o susceptibilidad a la infección con este parásito.

En el presente trabajo se muestran los resultados de la infección de cuatro cepas de ratones con 2000 tripomastigotes sanguíneos (forma infectante del parásito) de la cepa Tulahuen de *T. cruzi*, incluyendo un estudio histopatológico de tejidos de los animales infectados. La respuesta humoral fué analizada usando los sueros murinos inmunes para determinar la reactividad de tipo IgG contra un panel de antígenos recombinantes de *T. cruzi*.

MATERIAL Y METODOS

Ratones: Se utilizaron machos, de 10 semanas de edad (20 gr.), de las cepas ACA (H-2^f), A.Sn (H-2^a), A.Sw (H-2^s) y HTI (H-2ⁱ), provenientes de nuestro bioterio.

Modelo de infección: Grupos de 16 ratones de cada cepa fueron infectados por vía intraperitoneal con 2000 tripomastigotes sanguíneos / ratón de la cepa Tulahuen de *T. cruzi*.

Estudio de parasitemia: Cada dos días, los niveles de parasitemia fueron analizados hasta que los animales se hicieron negativos. Para la determinación de la presencia y cantidad de parásitos, se tomaron muestras de sangre de cada ratón en un tubo de microhematocrito, según el método descrito por Arias y Ferro (1988).

Estudio histopatológico: Dos animales de cada grupo de ratones infectados fueron sacrificados a los días 10, 14, 18 y 25 postinfección (p.i). En cada día se hizo un estudio de corazón y músculo esquelético. Los tejidos fueron fijados en Bouin, formalina e incluidos en parafina, finalmente cortes de 8µm fueron teñidos con hematoxilina-eosina. La severidad de la infiltración inflamatoria y la presencia de pseudoquistes (nidios de parásitos intracelulares) fué graduada arbitrariamente según una escala de tres puntos: + indica < 25% de área afectada; ++ 25-50% y +++ > 50% del área afectada.

Antígenos recombinantes: Se utilizó un panel de 7 antígenos recombinantes aislados de una genoteca de *T. cruzi* construida en fago lambda gt11 y expresados en *E. coli* Y1090. Estas proteínas recombinantes han sido denominados clon 1,2,13,26,30,36 y SAPA (Shed Acute Phase Antigen) (Ibáñez y col., 1987; Affranchino y col., 1989). La reactividad de las muestras de suero de los ratones infectados se realizó mediante un ensayo de InmunoDot en filtros de nitrocelulosa.

Ensayo inmunoradiométrico Dot IRMA: La reactividad IgG contra las proteínas recombinantes fue evaluado por un ensayo descrito en trabajos previos (Frasch and Reyes 1990; Lorca y col., 1992). Los filtros de nitrocelulosa, conteniendo los antígenos recombinantes luego de ser saturados con leche descremada al 3% y glicina al 2%, fueron incubados con los sueros de los ratones infectados, diluidos al 1: 100 por 90 minutos en agitación. Luego de tres lavados con TBS (150 mM NaCl, 50 mM Tris HCL, pH 7.6) se agregó el segundo anticuerpo, cabra anti- IgG de ratón radiomarcado con I¹²⁵ (Sigma, St. Louis, MO) y se incubó por 90 minutos en agitación. Después de tres lavados con TBS, una vez con NP-40 al 0.1% y dos lavados con TBS, los filtros se secaron a temperatura ambiente y se expusieron a una placa autoradiográfica (película Kodak X-OMAT) por 48 horas a -20 ° C. La reactividad con cada antígeno recombinante se expresó arbitrariamente con cruces (+ a +++), de acuerdo a la mayor intensidad de reacción comparada con el fago control que no tiene ningún inserto.

RESULTADOS

Los ratones de las cepas ACA y A.Sn se comportan como susceptibles, muriendo el 100% de los animales a los 19 y 21 días p.i., respectivamente. Las cepas A.Sw y HTI se comportan como resistentes y presentaron niveles máximos de parasitemia más altos que los animales susceptibles (gráfico 1). En el cuadro 1 se muestra la reactividad IgG contra

antígenos recombinantes de *T. cruzi* de los sueros de los ratones infectados. Los sueros de las cuatro cepas de ratones sólo muestran reconocimiento

de los antígenos SAPA y 13, manteniéndose esta reactividad, en las cepas resistentes, hasta 8 meses p.i.

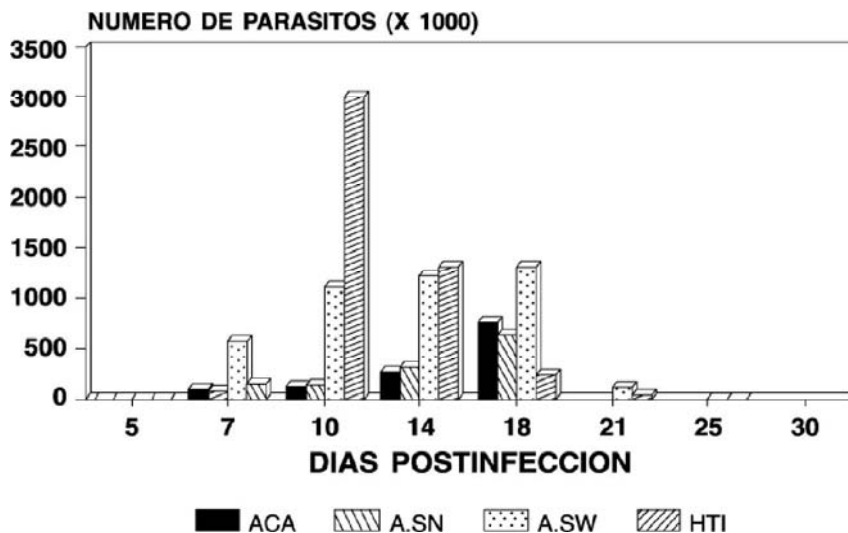


GRAFICO 1. Parasitemia en ratones infectados con 2000 trypomastigotes.
Parasitemia in mice infected with 2000 trypomastigotes.

CUADRO 1. Reactividad IgG contra antígenos recombinantes de sueros de ratones inoculados con 2000 trypomastigotes.

IgG Reactivity against recombinant antigens from sera of mice infected with 2000 trypomastigotes.

CEPA RATON	SUERO DIA	ANTIGENOS RECOMBINANTES						
		1	2	SAPA	13	26	30	36
ACA	10	-	-	-	-	-	-	-
	18	-	-	+	+	-	-	-
A.Sn	10	-	-	-	-	-	-	-
	18	-	-	++	+	-	-	-
A.Sw	10	-	-	-	-	-	-	-
	18	-	-	++	+	-	-	-
	27	-	-	++	+	+	-	-
	51	-	-	++	+	+	-	-
	66	-	-	+++	+	-	-	-
	231	-	-	++	+	-	-	-
HTI	10	-	-	-	-	-	-	-
	18	-	-	+	+	-	+	+
	27	-	-	++	+	-	-	+
	51	-	-	++	+	-	-	-
	66	-	-	++	+	-	-	-
	231	-	-	++	+	-	-	-

En el cuadro 2 se muestran los resultados del estudio histopatológico de corazón y músculo esquelético de los ratones infectados. Al día 10 p.i. los tejidos de los animales A.Sn y HTI presentan signos de miocarditis, pericarditis, zonas de infiltración linfocitaria con áreas de necrosis, donde predominan polimorfonucleares y abundante cantidad de parásitos intracelulares, especialmente en células musculares. Las cepas ACA y A.Sw presentan miocarditis leve, focos aislados de inflamación, miositis con infiltrado intersticial linfocitario y eventual presencia de parásitos intracelulares. Al día 18 p.i. se puede observar que la cepa A.Sw presenta lesiones mínimas y la cepa HTI una miocarditis leve y signos de reparación con proliferación de fibroblastos. En este mismo período las cepas susceptibles ACA y A.Sn presentan endocarditis y miositis importante con focos de necrosis e infiltrado inflamatorio mixto. En los días posteriores, se produce la muerte de los animales susceptibles ACA y A.Sn, mientras que las cepas resistentes sólo muestran signos mínimos de inflamación y recuperación del estado general.

DISCUSION

Nuestros resultados apoyan la situación en que, al parecer, no existe una relación clara entre el nivel de parasitemia alcanzado y la susceptibilidad o resistencia a la infección con

T. cruzi (Minoprio y col., 1989), puesto que en el presente estudio los animales resistentes A.Sw y HTI fueron los que alcanzaron los niveles más altos de parasitemia.

Uno de los factores genéticos asociado a la susceptibilidad o resistencia es el Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) del hospedero (Trischman and Bloom, 1982). Las cepas ACA, A.Sn y A.Sw se consideran congénicas (sólo difieren en el cromosoma 17, donde se encuentra el MHC) (Klein y col., 1983) y sólo la cepa A.Sw es resistente y las otras dos se comportan como susceptibles, indicando que el fenómeno estaría asociado al MHC o a genes ligados. La cepa HTI es un recombinante de la cepa B10 (H-2^b), la cual es considerada resistente a la mayoría de cepas de *T. cruzi*, por lo tanto sería interesante analizar qué regiones génicas MHC compartidas por las cepas B10 y HTI influyen en el fenómeno de resistencia (manuscrito en preparación). Al analizar la reactividad contra proteínas recombinantes de *T. cruzi*, de los sueros de ratones infectados, se observó solo reconocimiento de los clones SAPA y 13, mientras que con el resto de los antígenos hubo nulo o escaso reconocimiento. Esta situación en el modelo murino parece diferente a la descrita con sueros de pacientes chagasicos que habitualmente reconocen a la mayoría de estas proteínas recombinantes (Lorca y col 1992). Además, la reactividad con SAPA y 13

CUADRO 2. Estudio histopatológico de ratones infectados con 2000 tripomastigotes de la cepa Tulahuen de *T. cruzi*.

Histopathological study of mice infected with 2000 trypomastigotes from Tulahuen strain of *T. cruzi*.

		Días postinfección															
		ACA			ASn			A.Sw				HTI					
		10	14	18	10	14	18	10	14	18	25	10	14	18	25		
Corazón	I*	+	++	+++	++	++	+++	++	++	+	+	++	++	+	+		
	P	-	+	-	+++	++	-	+	-	-	-	++	+	-	-		
Músculo	I	+	++	++	++	++	++	++	+	+	-	+++	++	+	-		
	P	++	-	-	+++	++	-	-	-	-	-	+	-	-	-		

* I: Inflamación; P: Pseudoquistes

se mantiene, en las cepas resistentes, después de 9 meses postinfección, considerando a SAPA en el humano como un antígeno de la fase aguda. Aparentemente, la reactividad con SAPA no estaría asociada con la susceptibilidad o resistencia a la infección con la cepa Tulahuen de *T. cruzi*, puesto que se presenta tanto en animales susceptibles como resistentes. Sin embargo, no se puede descartar que los sueros de los dos grupos de animales reconozcan epitopos diferentes en la proteína SAPA y que la resistencia o susceptibilidad esté asociada a la capacidad de desarrollar una respuesta inmune diferencial. Algunos estudios han demostrado que la infección con *T. cruzi* es capaz de inducir una respuesta humoral contra la región enzimática amino terminal de SAPA (Pereira-Chiocola y col., 1994; Leguizamón y col., 1994), pero esta situación sólo ocurriría en los animales capaces de sobrevivir a la fase aguda de la infección, como podría ser el caso de nuestros animales A.Sw y HTI.

Los resultados del estudio histopatológico mostraron que las lesiones inflamatorias ocurren inicialmente tanto en los animales susceptibles como resistentes. En éstos últimos, las lesiones tisulares parecen producidas por la infiltración parasitaria, pero al pasar el tiempo se inducen fenómenos de reparación a medida que la carga parasitaria es controlada por diversos mecanismos inmunológicos. Por el contrario, en los animales susceptibles el daño pareciera aumentar progresivamente a pesar de ir desapareciendo o disminuir notoriamente la carga parasitaria tisular y en circulación. Lo anterior parece demostrar que, en el caso de los animales susceptibles, el parásito induce mecanismos indirectos que serían responsables del daño progresivo y finalmente la muerte. La inducción de fenómenos autoinmunes, ya sea por homología antigénica, entre el parásito y tejidos del hospedador o por la presencia de clones autoreactivos, que aparecen durante la activación policlonal en la fase aguda, podría explicar esta situación (Cuhna-Neto y col., 1995).

RESUMEN

Ratones de las cepas ACA y A.Sn fueron altamente susceptibles, con un 100% de mortalidad alrededor de las 3 semanas postinfección (p.i), con un inóculo por vía intraperitoneal de 2000 tripomastigotes sanguíneos de la cepa Tulahuen de *Trypanosoma cruzi*, mientras que las cepas A.Sw y HTI se comportaron como resistentes con un 100% de sobrevivencia, pasados los 6 meses p.i. Sin embargo, los animales de las cepas resistentes mostraron niveles máximos de parasitemia significativamente más altos que las cepas susceptibles. Se realizó un estudio histopatológico de músculo cardíaco y esquelético de los ratones infectados. En los primeros 10 días p.i. no se observaron diferencias claras entre cepas resistentes y susceptibles, en cuanto al daño tisular y presencia de parásitos intracelulares (pseudocistos). Pero alrededor de la tercera semana p.i. ya se vieron diferencias evidentes, mientras los animales de las cepas A.Sw y HTI mostraron bajos niveles de inflamación y signos de recuperación de las lesiones, los ratones ACA y A.Sn evidenciaron un progresivo aumento del daño tisular, aunque no se observaron, en este momento, formas sanguíneas ni intracelulares del parásito.

Muestras de suero de los ratones infectados fueron probados por un ensayo inmunoradiométrico (IRMA), para analizar la reactividad contra los antígenos recombinantes 1,2,13,26,30,36 y SAPA de *T. cruzi*. Todos los sueros sólo mostraron reconocimiento de las proteínas 13 y SAPA, sugiriendo que esta reactividad no pareciera estar relacionada directamente con el fenómeno de resistencia o susceptibilidad a la infección con la cepa Tulahuen de *T. cruzi*, en el modelo murino.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Carlos Frasch, Instituto de Investigaciones Bioquímicas "Fundación Campomar", Buenos Aires, Argentina.

BIBLIOGRAFIA

- AFFRANCHINO, J., C. IBAÑEZ, A. LUQUETTI, A. RASSI, M. REYES, R. MACINA, L. ASLUND, U. PETTERSON, A. C. C. FRASCH. 1989. Identification of a *Trypanosoma cruzi* antigen that shed during the acute phase of Chagas' disease. *Mol. Biochem. Parasitol.* 34: 221-228.
- ARIAS A., E. A. FERRO. 1988. Quantification of *Trypanosoma cruzi* parasitemia by direct micromethod. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 82: 248
- BRABIN, L. 1993. *Trypanosoma cruzi* infection in women. *Parasitol. Today*, 9: 198-199.
- CUHNA-NETO, E., M. DURANTI, A. GRUBER, B. ZINGALES, I. MESSIAS, N. STOLF, G. BELLOTI, M. PATARROYO, F. PILLEGI, J. KALIL. 1995. Autoimmunity in Chagas' disease cardiopathy: biological relevance of a cardiac myosin-specific epitope crossreactive to an immunodominant *Trypanosoma cruzi* antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92: 3541-3545.
- FRASCH, A. C. C., M. REYES. 1990. Diagnosis of Chagas' disease using recombinant DNA technology. *Parasitol. Today.* 6: 137-139.
- HOFT, D. F., R. YNCH, L. KIRCHOFF. 1993. Kinetics analysis of antigen-specific immune response in resistant and susceptible mice during infection with *Trypanosoma cruzi*. *J. Immunol.* 151: 7038-7047.
- IBAÑEZ, C. F., J. L. AFFRANCHINO, A. C. C. FRASCH. 1987. Antigenic determinants of *Trypanosoma cruzi* defined by cloning of parasite DNA. *Mol. Biochem. Parasitol.* 25: 175-184.
- KLEIN, J., F. FIGUEROA, C. S. DAVID. 1983. H-2 haplotypes. Genes and Antigens: Second listing. *Immunogenetics* 17: 553-596.
- LEGUIZAMON, M., O. CAMPETELLA, C. GONZALEZ, S. CAPPA, A. C. C. FRASCH. 1994. Mice infected with *Trypanosoma cruzi* produce antibodies against the enzymatic domain of trans-sialidase that inhibit its activity. *Infect. Immun.* 62: 3441-3446.
- LORCA, M., A. GONZALEZ, C. VELOSO, V. REYES, U. VERGARA. 1992. Immunodetection of antibodies in sera from symptomatic and asymptomatic chilean Chagas' disease patients with *Trypanosoma cruzi* recombinant antigens. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 46: 44-49.
- MILES, M. A. 1983. The epidemiology of South American Trypanosomiasis: biochemical and immunological approaches and their relevance to control. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 77: 5-23.
- MINOPRIO, P., S. ITOHARA, C. HEUSSER, S. TONEGAWA, A. COUTINHO. 1989. Immunobiology of murine *T. cruzi* infection: The predominance of parasite-nonspecific responses and the activation of TCRI cells. *Immunol. Rev.* 112: 183-207.
- MONCAYO, A. 1992. Chagas Disease: epidemiology and prospects for interruption of transmission in the Americas. *Wld. Hlth. Statist. Quant.* 45: 276-279.
- NICKERSON, P., P. ORN, M. SCHROEDER, L. SEKLA, J. JOHNSTON. 1989. Transfusion associated *Trypanosoma cruzi* infection. *Ann. Inter. Med.* 111: 851-853.
- PEREIRA-CHIOCCOLA, V., S. SCHENKMAN, J. KLOETZEL. 1994. Sera from chronic chagasic patients and rodents infected with *Trypanosoma cruzi* inhibit trans-sialidase by recognizing its amino-terminal and catalytic domain. *Infect. Immun.* 62: 2973-2978.
- TEXEIRA, A., P. SADI, J. REBELO, E. ALGAÑARAZ, D. VIEIRA, L. LAURIA-PIRES, R. NASCIMENTO, C. VEXENANT, A. SILVA, S. AULT, J. COSTA. 2001. Emerging Chagas Disease: Trophic network and cycle of transmission of *Trypanosoma cruzi* from palm trees in the Amazon. *Emerg. Infect. Dis.* 1: 100-112.
- TRISCHMAN, T., B. BLOOM. 1982. Genetics of murine resistance to *Trypanosoma cruzi*. *Infect. Immun.* 35: 546-551.
- WRIGHTSMAN, R., S. KRASSNER, J. WATSON. 1982. Genetic control of response to *Trypanosoma cruzi* in mice: multiple genes influencing parasitemia and survival. *Infect. Immun.* 36: 637-644.