

## PATOLOGÍA POR *TRYPANOSOMA CRUZI* ¿CEPA DEPENDIENTE?

STELLA M. GONZALEZ CAPP, GERARDO A. MIRKIN, MARIA E. SOLANA, VALERIA S. TEKIEL

*Departamento de Microbiología, Parasitología e Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires*

**Resumen** En la actualidad existe consenso en el papel que las características de la población de *Trypanosoma cruzi* tienen en la patogénesis de las distintas formas clínicas de la enfermedad de Chagas. En nuestro laboratorio, estudiamos en el modelo murino las consecuencias de la infección con dos poblaciones de características biológicas polares: RA y CA-I. Demostramos que el daño neuromuscular es, en parte, mediado por diferentes subpoblaciones de linfocitos T. Además, observamos que el fenotipo celular responsable de la patología y los distintos blancos tisulares dependen de la población parasitaria. A pesar de no haber observado diferencias en la reactividad de los sueros de ratones infectados con RA y CA-I frente a estructuras nativas del nervio, la respuesta humoral jugaría un papel adicional en el desarrollo de la patología neuromuscular: sueros de ratones infectados con RA, pero no con CA-I, desencadenaron alteraciones en el potencial de acción nerviosa. También hemos detectado, en el modelo murino, una disminución en la fertilidad de las hembras infectadas con CA-I/K-98, mientras que las hembras infectadas con RA se comportaron igual a los controles. Sin embargo, sólo pudo comprobarse pasaje transplacentario de *T. cruzi* en la cepa RA. Las diferencias encontradas en la fertilidad, en la sobrevivencia de las crías nacidas de madres infectadas, así como en el número de resorciones fetales detectadas con la cepa miotrópica, podrían atribuirse a la respuesta inflamatoria hallada en el útero de estas hembras, ya que no se observaron alteraciones en el estro de ambos grupos infectados con respecto a los controles.

**Abstract** *Is Trypanosoma cruzi pathology strain dependent?* There is agreement today about the role that the characteristics of the population of *Trypanosoma cruzi* play in the pathogenesis of the different clinical forms of Chagas disease. In our laboratory, we have studied the outcome of the infection of mice with two populations with polar biological behaviour: RA and CA-I. We have demonstrated that the neuromuscular damage is, in part, mediated by different T cell subsets. We have also observed that the T cell phenotype responsible for the pathology and the targeted tissues depend on the parasite population. Although we found no differences regarding the reactivity of IgG to native nerve structures in sera from mice infected with either strain, it is presumed that the humoral response would play an additional role in the development of strain-dependent neuromuscular pathology since passive transfer of sera from mice infected with RA triggered alterations of the nerve action potential whereas sera from CA-I-infected mice did not. We have also detected a reduction in the fertility of female mice infected with CA-I/K98, whereas females infected with RA showed no difference in comparison with uninfected controls. However, congenital transmission was only observed in mice infected with RA. The differences observed in fertility, in newborn survival, and in the number of fetal resorptions in mice infected with the myotropic strain could be attributed to the uterine inflammatory response, since no estrous alterations were observed between infected and control groups.

**Key words:** *Trypanosoma cruzi*, parasite subpopulations, pathology, immunopathology, autoimmunity, T lymphocytes, antibodies, congenital transmission.

La enfermedad de Chagas presenta diferentes formas clínicas<sup>1-3</sup>. También se sabe desde hace tiempo que el *Trypanosoma cruzi* presenta variación intraespecífica<sup>4</sup>. En nuestro laboratorio estamos interesados en establecer cuál es la responsabilidad de las cepas en desencadenar patología y para ello procedimos a aislar y caracterizar cepas de *T. cruzi* de pacientes tanto con enfermedad de Chagas aguda como con infección crónica.

En este momento contamos con dos poblaciones parasitarias que difieren polarmente en diversas de sus características biológicas: la cepa RA y la CA-I. Además, un clon de esta última, K-98, presenta un comportamiento biológico prácticamente indistinguible del de su cepa madre por lo que nos referiremos a éstos como CA-I/K-98.

Las características generales de estas dos poblaciones se muestran en la Tabla 1. La cepa RA es altamente letal para el ratón, en circulación predominan las formas delgadas, estimula la producción de anticuerpos (Ac) con capacidad para interferir con la viabilidad del estadio circulante (con función lítica, opsonizante y neutra-lizante)

TABLA 1.- Características de las cepas en el modelo murino

Características	RA	CA-I / K98
● <b>Letalidad</b>	alta	nula o escasa
● <b>Estadío circulante</b>		
× Forma predominante	delgada	gruesa
● <b>Anticuerpos</b>		
× Líticos, opsonisantes, neutralizantes	si	no
● <b>Tropismo <i>in vivo</i></b>	reticulotrópico/ pantrópico	miotrópico
● <b>Estudios <i>in vitro</i> en células Vero y MØ</b>		
× Interiorización	4-5 veces	1 vez
× Multiplicación	alta	baja
● <b>Patrón de patología</b>		
× Electrofisiológico	compromiso neuro- pático primario	compromiso mio- pático primario
× Infiltr. histopatológicos		
En nervio	++/+++	+
En músculo	+	+++
Caract. diferenciales	NK	LBs IgM Depósitos IgG
× Fenotipo celular predom.		
En nervio	CD8	CD4=CD8
En músculo	CD8	CD4/CD8 *

\* Cambia fenotipo predominante con el aumento del infiltrado en el tiempo.

y presenta alta capacidad para interiorizarse y multiplicarse tanto en células fagocíticas como no fagocíticas. Por el contrario, CA-I/K-98 no es letal para el hospedero murino, en circulación predominan las formas gruesas, es ineficiente para gatillar Ac efectivos contra la forma circulante del parásito y su capacidad para interiorizarse y multiplicarse intracelularmente es baja comparada con la cepa RA<sup>5-8</sup>. En relación al tropismo tisular *in vivo*, CA-I/K-98 es altamente miotrópica mientras que RA, que se define habitualmente como reticulotrópica, es en realidad pantrópica<sup>7, 8</sup>.

En un modelo que hemos desarrollado en el laboratorio para estudiar el arco médula espinal dorso lumbar-nervio ciático-músculo esquelético y que denominamos "modelo de sistema nervioso periférico" (SNP)<sup>9</sup>, estas 2 poblaciones presentan un patrón de patología diferente. Los estudios electrofisiológicos e histopatológicos reflejan compromiso neuropático primario en los animales infectados con la cepa RA y, opuestamente, los animales infectados con CA-I/K-98 presentan compromiso miopático primario (Tablas 1 y 2)<sup>10</sup>.

En este modelo también se registran diferencias cuantitativas y cualitativas en los infiltrados tisulares. En la infección con RA los infiltrados en nervio y médula espinal son de

mayor tamaño que los que se detectan con CA-I/K-98, pero al considerar músculo esquelético esto se invierte. En relación a su composición, si bien en ambos casos se observan linfocitos T (LT) CD4<sup>+</sup>, LT CD8<sup>+</sup> y macró-fagos, en la infección con la cepa pantrópica RA predominan los LT CD8<sup>+</sup> mientras que con la miotrópica el predominio de este fenotipo sólo se ve en músculo esquelético en el período crónico tardío, cuando los infiltrados alcanzan su mayor tamaño. Además, en las lesiones musculares de los ratones infectados con RA hay células NK y en las de sistema nervioso hay células con doble marcación negativa<sup>#</sup>, mientras que en ratones infectados con la cepa miotrópica hallamos linfocitos BslgM<sup>+</sup> y depósitos de IgG. (Tabla 1)<sup>10</sup>.

Con estos antecedentes nuestro interés y primer objetivo fue estudiar el papel de los LT y de los Ac en la inducción de patología en este modelo de SNP.

Paralelamente nos interesó indagar qué sucede en un sitio particular para la respuesta inmune como es la placenta, donde debe existir un perfil de citoquinas Th2 para que no se produzca el rechazo del feto<sup>11</sup>. Para ello

# El marcador utilizado para NK (asialo-GM1) se expresa constitutivamente en sistema nervioso por lo que no se pudo confirmar ni descartar su presencia en este tejido.

TABLA 2.- Cambios electrofisiológicos e histológicos en músculo y en nervio inducidos por la infección con *Trypanosoma cruzi*

Característica	CA-I/K-98	RA
I-Electromiografía		
Potencial de unidad motora		
Amplitud	disminuída	aumentada
Duración	disminuída	aumentada
II-Histopatología		
A- Cambios en músculo		
<i>Miopáticos</i>		
⊗ centralización nuclear	+++	+ / ++
⊗ reemplazo por fibrosis y degeneración grasa	+++	+ / ++
⊗ splitting de miofibras	++	+
⊗ fibras de tamaño variable	++	+
<i>Neuropáticos</i>		
⊗ atrofia aislada de miocélulas	+	++
⊗ atrofia agrupada de fibras musculares	+	++
B- Cambios en nervio		
⊗ Degeneración axonal	+	++
⊗ Cámaras de digestión de mielina	±	++

estandarizamos un segundo modelo que denominaremos de “transmisión congénita” inoculando hembras adultas con dosis óptimas de cada cepa de *T. cruzi* para lograr cronicidad en la infección y máxima respuesta inmune<sup>5</sup>. En estos experimentos preliminares comprobamos que los ratones hembras inoculados con la cepa miotrópica CA-I/K-98, pero no los infectados con la cepa pantrópica RA, presentaban alteraciones de la fertilidad que resultaban en una disminución significativa tanto en el número de hembras preñadas como en el número de crías por hembra; en las pocas crías que nacían no se registraba transmisión del parásito. En las hembras inoculadas con RA, en cambio, si bien no se alteraba la preñez, se registraba una tasa de transmisión de *T. cruzi* cercana al 4%.

Por lo tanto, nuestro segundo objetivo fue iniciar estudios tendientes a establecer las causas de la disminución de la fertilidad en las hembras infectadas con parásitos CA-I/K-98.

En cumplimiento del primer objetivo y para verificar la responsabilidad que los LT tenían en la producción de daño, primero analizamos si eran capaces de reconocer tejido muscular y nervioso del huésped. Para ello se realizaron estudios de proliferación de LT CD4<sup>+</sup> y LT CD8<sup>+</sup> de ratones infectados con CA-I/K-98 ó RA, frente a homogenatos de músculo esquelético, nervio ciático y médula espinal obtenidos de ratones normales. En el

caso de la cepa miotrópica se observó que ambos fenotipos linfocitarios proliferaban frente a los tres complejos antigénicos aunque su grado de reactividad era bajo. Por otra parte, cuando se ensayaron LT obtenidos de ratones infectados con RA, sólo se registró proliferación frente a Ag de sistema nervioso, alcanzando niveles de respuesta elevados. Estos resultados se muestran en la Figura 1<sup>12</sup>. Pensamos que esto podía deberse a una activación policlonal en el primer caso y a un reconocimiento específico en el segundo, por lo que decidimos realizar transferencia pasiva de ambos fenotipos de LT, a ratones singeneicos no infectados, a fin de verificar si eran capaces de producir patología.

Para ello utilizamos como dadores, ratones con infección crónica por ambas cepas de *T. cruzi*. Se purificaron los LT CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> y se transfirieron a receptores singeneicos normales. En éstos verificamos que, cuando transferíamos LT CD4<sup>+</sup> de ratones infectados con la cepa miotrópica CA-I/K-98, el blanco tisular era músculo. La transferencia de LT CD8<sup>+</sup> no indujo patología. En cambio, cuando se transfirieron linfocitos de ratones infectados con RA, ambos fenotipos fueron capaces de producir daño, siendo nervio ciático el blanco de la lesión (Tabla 3). En todos los casos en los infiltrados se registraba la presencia de macrófagos, LT CD4<sup>+</sup> y LT CD8<sup>+</sup>. En aquellos ratones que habían recibido LT de animales infectados con la cepa pantrópica RA, se ob-

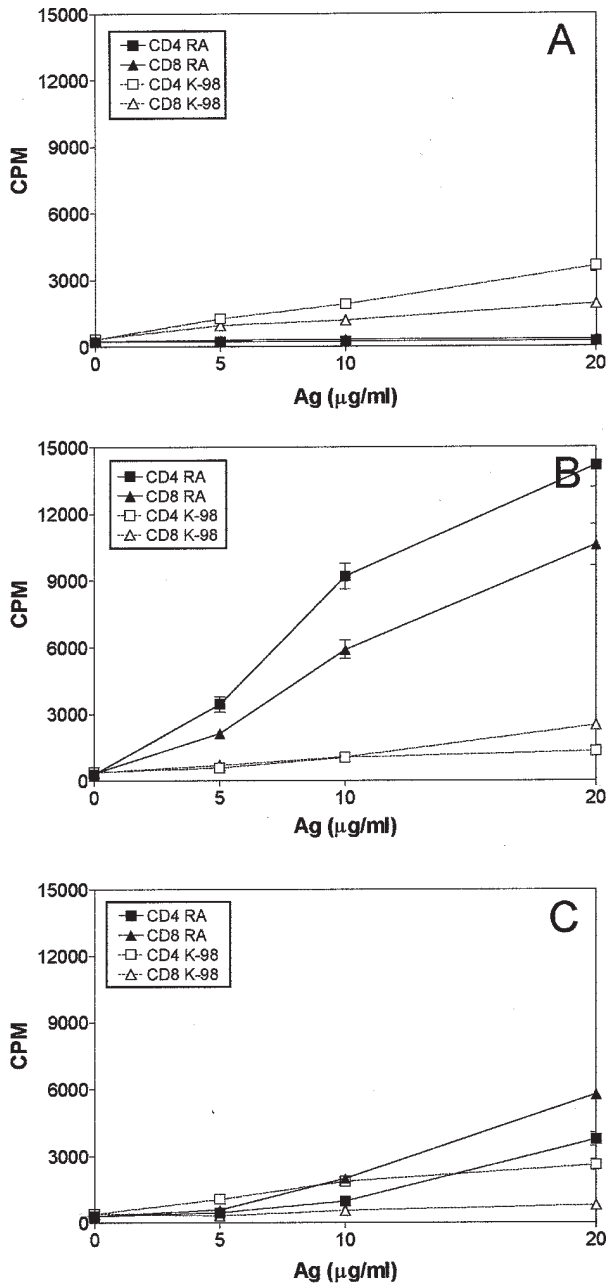


Fig. 1— Autorreactividad en la neuromiopatía chagásica experimental. Respuesta proliferativa (incorporación de  $^3\text{H}$ -timidina) mediada por linfocitos T CD4 y CD8 de ratones infectados con las cepas RA y CA-I/K98 de *Trypanosoma cruzi* (4 meses pi), frente a homogenatos totales de músculo esquelético (A), nervio ciático (B) y médula espinal (C).

servaban además células doble negativas<sup>12</sup>. Recordemos que los ratones infectados con esta misma cepa presentaban en los infiltrados de músculo esquelético células NK y que en sistema nervioso (donde técnicamente no podíamos buscar células NK) se encontraban células no marcadas<sup>10</sup>. En ninguno de los tejidos que presentaba

TABLA 3.— Lesiones en receptores de subpoblaciones de linfocitos T

Dadores		Receptores	
Cepa	Fenotipo LT	Músculo	Nervio
K98	CD4	+	-
	CD8	-	-
RA	CD4	-	+
	CD8	-	+

lesión pudo detectarse la presencia de parásitos mediante PCR<sup>12</sup>.

En resumen, los LT de ratones infectados son capaces de transferir patología. El fenotipo y el blanco tisular de la agresión dependen de la cepa de *T. cruzi* utilizada para infectar al dador.

A fin de analizar si los Ac tienen algún papel en la patogenia de la lesión, iniciamos el estudio de los sueros evaluando si eran capaces de reconocer Ag de sistema nervioso y músculo esquelético murinos por Western-blot. Con este propósito evaluamos la reactividad de sueros anti-RA y anti-CA-I/K-98 contra Ag de músculo esquelético, médula espinal, nervio ciático y cerebro obtenidos de ratones singéneos normales. Independientemente de la población parasitaria usada en la infección, todos los sueros que reconocieron Ag murinos (93,7%) reaccionaron con algún tejido de sistema nervioso. En todos los casos el patrón de bandas revelado fue altamente heterogéneo no encontrándose perfil alguno que correlacionara polipéptidos detectados con cepa infectante y/o tiempo post-infección (pi). Por el contrario, la reactividad frente a Ag de músculo esquelético fue sólo relevante en los sueros crónicos de ratones infectados con CA-I/K-98. Cuando se analizaron estos sueros mediante IFI en cortes de tejidos de ratones normales, se observó reactividad de IgG frente a matriz intersticial de nervio ciático, tanto en sueros anti-RA como anti-CA-I/K-98. También se observó reactividad de IgG frente a músculo esquelético, independientemente de la población de *T. cruzi* infectante<sup>13</sup>.

Con el propósito de confirmar si estos sueros autorreactivos participaban en la producción de daño en SNP, se decidió realizar ensayos de transferencia pasiva por vía perineural. Sueros de ratones infectados con las cepas RA y CA-I/K98, con reactividad positiva contra nervio ciático por Western-blot y/o IFI, se inocularon en ratones singéneos normales y a los 4 días post-transferencia se registró *in vivo* la latencia y amplitud del potencial de acción nervioso (PAN) del nervio ciático. Como controles negativos se utilizaron animales inoculados con suero normal y como controles positivos, ratones inoculados con

parásitos viables, utilizando la misma vía. Se verificó que los sueros anti-RA inducían alteraciones significativas del PAN, con aumento de la latencia y disminución de la amplitud, cuando se utilizaban sueros que habían reconocido el tejido nervioso por IFI, independientemente de la reactividad evidenciada por Western blot. Por otra parte, los sueros anti-CA-I/K-98 no indujeron modificación alguna sobre el patrón de conducción nerviosa, aún cuando fueran reactivos por IFI (manuscrito en preparación) (Tabla 4). Estas alteraciones indican que, dependiendo de la población parasitaria utilizada en la infección, existen factores humorales reactivos contra antígenos de mielina en su estructura nativa, con capacidad de afectar el número de axones funcionantes y la velocidad de conducción. Además, estos resultados reafirman que ambas poblaciones parasitarias inducen Ac con diferente funcionalidad<sup>5, 8</sup>.

Con el objeto de cumplir con el segundo objetivo planteado, nos propusimos averiguar las posibles causas que determinan la disminución de la fertilidad en hembras infectadas con CA-I/K-98. Al estudiar el ciclo estral de animales infectados y controles, encontramos que todos los grupos desarrollaban el estro sin diferencias significativas y en forma asincrónica. El próximo paso fue analizar si existían interferencias en la fecundación para lo cual se determinó el número de hembras que se preñaban y el tiempo que esto requería desde el momento en que se establecían las parejas. Comprobamos que todas las hembras infectadas requerían mayor tiempo de "convivencia" con los machos para preñarse, pero mientras que aquellas infectadas con RA alcanzaban este estado en el 100% de los casos, las infectadas con la cepa miotrópica no se preñaban en su totalidad aún después de 2 meses y medio. Así, en un ensayo con 10 hembras por grupo, todos los controles se preñaron al cabo de 35 días, las infectadas con RA a los 70 días, mientras que sólo el 70% de las infectadas con CA-I/K-98 estaban preñadas a los 75 días (Tabla 5). Esta dificultad, que se expresa por requerir un mayor período de contacto con el macho, podría estar relacionada con alteraciones funcionales de la musculatura y del SNP, que dificulten

Tabla 4.- Efecto producido por la transferencia pasiva via perineural, de sueros de ratones infectados

Característica	RA	CA-I/K-98
Potencial de acción de nervio	latencia aumentada amplitud disminuída	no se modifica no se modifica
Alteraciones del PAN se relacionan con:	reconocimiento de estructuras nativas del antígeno	—————

Tabla 5.- Fertilidad en la infección por T. cruzi

Características	RA	CA-I/K-98
<b>Ciclo estral</b>	+	+
<b>Preñez</b>	demorada Alcanza 100%	demorada No alcanza 100%
<b>Resorciones</b>	Sin diferencias	Mayores <sup>#</sup>
<b>Infiltrados inflamatorios uterinos</b>	Ausentes	Presentes

# tendencia en el límite de la significación estadística con relación al grupo control no infectado.

mecánicamente el acto de la cópula, ya que no puede atribuirse a diferencias en el ciclo estral.

El tercer punto fue determinar si existían diferencias en el número resorciones fetales desarrolladas por hembras infectadas y controles. En este caso observamos que el comportamiento de los ratones infectados con RA no difería del de los controles, mientras que en el grupo infectado con CA-I/K-98 su frecuencia era mayor marcando un tendencia en el límite con la significación estadística. Los valores, expresados como índice de frecuencias de resorciones fueron 0,10 para el grupo control vs 0,12 y 0,32 para los grupos infectados con RA y con CA-I/K-98.

El último punto fue analizar el cuadro histopatológico presente en el aparato reproductor en hembras infectadas con una u otra población parasitaria. A los 30 días pi, y diferenciándose de los controles y del grupo infectado con RA, en las hembras infectadas con la cepa CA-I/K-98 miotrópica se registró endo y miometritis (Tabla 5); en ambos grupos se detectó periooforitis pero de intensidad moderada para la cepa miotrópica y leve para RA. Actualmente estamos estudiando la composición de estos infiltrados. Avalando la hipótesis de que la infección pudiese resultar en una dificultad mecánica para el éxito de la cópula, se registró miositis en músculo esquelético más intensa (moderada a grave) en los ratones con infección por CA-I/K-98, que en los infectados con RA (leve a moderada).

Nuestras conclusiones hasta el momento son:

- Los LT transfieren daño. El fenotipo responsable al igual que el blanco tisular serían dependientes de la cepa de *T. cruzi*.
- Los sueros reactivos que reconocen antígenos de tejido nervioso en su forma nativa, modifican la velocidad de conducción. Esta acción estaría diferencialmente inducida según la cepa del parásito infectante.
- El grado de fertilidad de las hembras infectadas con *T. cruzi* es dependiente de la cepa infectante. Su disminución es independiente del desarrollo del ciclo estral. Se relacionaría con retardo en la preñez, tendencia a mayor frecuencia de resorciones fetales y a la presencia de infiltrados uterinos.

## Bibliografía

1. Köberle F. Chagas' disease and Chagas syndromes: the pathology of American trypanosomiasis. *Adv Parasitol* 1968; 6: 63-116.
2. Oliveira JS. A natural human model of intrinsic heart nervous system denervation: Chagas' cardiopathy. *Am Heart J* 1985; 110: 1092-8.
3. Sica REP, Sanz OP, Aristimuño GG, Basso S, Pagano MA, Taratuto A, Fumo T, Ratusnu AF, Colombi A. Muscle denervation in chronic Chagas' disease. *Medicina (Buenos Aires)* 1979; 39: 579-88.
4. Lambrecht FL. Biological variations in trypanosomes and their relation to epidemiology of Chagas' disease. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 1965; 7: 346-52.
5. Müller LA, González Cappa SM. Immunogenicity of *Trypanosoma cruzi* strains determined by neutralization test. *Rev Arg Microbiol* 1987; 19: 101-8.
6. Müller LA, Añasco N, González Cappa SM. *Trypanosoma cruzi*: isolate dependence in the induction of lytic antibodies in the mouse and the rabbit. *Exp Parasitol* 1986; 61: 284-93.
7. Celentano AM. *Trypanosoma cruzi*: Papel de los macrófagos en la infección experimental del ratón producida por poblaciones parasitarias con diferente capacidad para inducir respuesta inmune. *Tesis de Doctorado*, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires. 1996.
8. Celentano AM, González Cappa SM. Induction of macrophage activation and opsonizing antibodies by *Trypanosoma cruzi* subpopulations. *Parasite Immunol* 1992; 14: 155-67.
9. Losavio A, Jones M, Sanz OP, Mirkin G, González Cappa SM, Muchnik S, Sica REP. A sequential study of the peri-pheral nervous system involvement in experimental Chagas' disease. *Am J Trop Med Hyg* 1989; 41: 539-47.
10. Mirkin GA, Jones M, Sanz O, Rey R, Sica REP, González Cappa SM. Experimental Chagas' disease: Electrophysiology and cell composition of the neuromyopathic inflammatory lesions in mice infected with a myotropic and a pantropic strain of *Trypanosoma cruzi*. *Clin Immunol Immunopathol* 1994; 73: 69-79.
11. Roberts CW, Satoskar A, Alexander J. Sex steroids, pregnancy-associated hormones and immunity to parasitic infections. *Parasitol Today* 1996; 12: 382-8.
12. Mirkin GA, Celentano AM, Malchiodi EL, Jones M, González Cappa SM. Different *Trypanosoma cruzi* strains promote neuromyopathic damage mediated by distinct T lymphocyte subsets. *Clin Exp Immunol* 1997; 107: 328-34.
13. Tekiel VS, Mirkin GA, González Cappa SM. Chagas' disease: reactivity against homologous tissues induced by different strains of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology*, 1997; 115: 495-502.

-----

*Y en este vasto continente (América) humano, la infinita variedad de las razas no destruye la unidad misteriosa del conjunto, del mismo modo que la diversidad de las olas no rompe la majestuosa monotonía del mar.*

Marguerite Yourcenar (1903-1987)

*Identidad, Integración y Creación cultural en América latina. El desafío del Mercosur.*

Gregorio Recondo. Buenos Aires: Editorial de Belgrano/Unesco, 1997, p 165