

INMUNOPATOLOGÍA EN ENFERMEDAD DE CHAGAS EXPERIMENTAL**Dra. STELLA GONZÁLEZ CAPPA¹***Departamento de Microbiología, Parasitología e Inmunología. Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires*

Es para mí un honor haber sido convocada para esta conferencia. Soy admiradora de la persona de Alfredo Lanari. Su convicción de que lo que podía hacerse en otros lados también podía hacerse aquí, aún en materia de publicaciones, determinó que el Instituto Lanari se transformase en un centro de excelencia y alta complejidad y que surgiera y persistiera la revista Medicina.

A pesar de mi admiración, nunca tuve un trato directo y frecuente con él, por lo que suponía que difícilmente podía reconocerme. Yo era en ese entonces una joven docente de la Cátedra de Microbiología y Parasitología y los docentes jóvenes éramos muchos. Sin embargo, recuerdo que en una oportunidad lo llamé por teléfono y cuando le pregunté si me ubicaba, me respondió: por supuesto, Ud. viene a caballo de un tripanosoma. Era la primera vez que hablaba con él.

Aún hoy continúo trabajando con "ese tripanosoma", aunque ya no soy una docente joven y he ampliado mi interés a otros temas de investigación, como esquistosomosis.

En el año 1964 comencé mis estudios sobre enfermedad de Chagas. No puedo decir que me inicié por vocación. En realidad me inicié en este tema porque el entonces Profesor Titular de la Cátedra de Microbiología y Parasitología, Armando Parodi, colega de Lanari y tan visionario como él, convocó a un grupo de jóvenes para que trabajásemos en la enfermedad de Chagas. Eramos tres médicos recién recibidos, Gabriel Schmuñis, Jorge Yanovsky y yo, que llegamos al piso 13 de la Facultad de Medicina de la UBA, el mismo en el que todavía trabajo, pero donde sólo había algunos muebles. Sin equipo y en un tema nuevo para los tres (hasta ese momento yo había trabajado en Fiebre Hemorrágica Argentina), comenzamos a estudiar y a hacer cosas elementales, como poner en marcha el ciclo del *Trypanosoma cruzi* en el laboratorio.

Al año siguiente y a propuesta de Parodi se creaba, en el ámbito de nuestra Facultad, la Comisión para el Estudio Integral de la enfermedad de Chagas, la que contaba con un presupuesto destinado a este fin. Entonces llegaron los primeros equipos y la tarea fue más fácil; hasta ese momento cuando queríamos, por ejemplo, autoclavar un medio de cultivo –y lo hacíamos con frecuencia y en cantidad– debíamos trasladarnos a otros pisos con recipientes que apenas podíamos mover y además debíamos esperar a que los investigadores locales terminaran con su tarea del día para usar el bendito autoclave.

Fue una época de trabajo duro pero de recuerdos muy bellos. Estábamos creando algo, poníamos los cimientos de un área que creció y sigue creciendo. Cuando uno se consustancia de este modo con un lugar, lo siente suyo. Para mí es mi casa, no sé si la primera o la segunda. Si cuento el número de horas de vigilia que he pasado y aun paso en ella, seguramente es la primera.

Ya en ese entonces estaba interesada en conocer la responsabilidad que le cabe a las diferentes poblaciones del *T. cruzi* en la inducción de las distintas formas clínicas de la enfermedad de Chagas. Parte de mi trabajo de tesis versó precisamente sobre el agrupamiento de cepas aisladas en la Argentina según su patrón de inmunoprecipitación frente a sueros homólogos y heterólogos. Por ese entonces un trabajo de Víctor Nussenzweig (Exp. Parasitol. 1963, 14: 221-232) sugería que esta metodología podía permitir agrupar a las cepas en función del área geográfica y como en distintas áreas geográficas predominan diferentes formas clínicas, era tentador pensar que quizá estos grupos se pudiesen relacionar con ellas. Sin embargo, a pesar de encontrar diferencias intraespecíficas entre los diversos aislados argentinos del parásito y de corroborar los grupos descriptos por Nussenzweig, los resultados obtenidos distaron de determinar un patrón epidemiológico como el sugerido por él (González Cappa, Kagan, Exp. Parasitol. 1969, 25: 50-57). Aquellos estudios fueron realizados utilizando el estadio obtenido de cultivos axénicos. Con el tiempo aprendí que, para satisfacer mi interés, tenía

¹Los datos que he presentado corresponden mayoritariamente al trabajo de Gerardo Mirkin y Valeria Tekiel. Para los estudios de electrofisiología contamos con la participación de Roberto Sica y Olga Sanz del Htal. Ramos Mejía y de Salomón Muchnik y Adriana Losavio del Instituto Lanari y en los estudios histológicos colaboró Marta Jones del Htal. Sor María Ludovica de La Plata.

que trabajar con el estadio circulante del parásito obtenido del hospedero mamífero, ya que la enfermedad de Chagas es un fenómeno de dos y hay cosas que sólo se ven cuando se establece la asociación entre ese huésped y el parásito.

Es así que me interesé en analizar en qué se diferenciaban estas asociaciones cuando se utilizaban diferentes cepas de *T. cruzi*.

Como ya mencioné, la enfermedad de Chagas puede producir diferentes formas clínicas. Un porcentaje bajo de las mismas, alrededor de un 3%, afecta al sistema nervioso periférico (SNP). El proceso se relaciona con la remodelación de la unidad motora producida por sucesivas ondas de denervación-reinervación. Es por el proceso de reinervación que las manifestaciones clínicas -que pueden ser dramáticas cuando están afectados el corazón o los órganos del aparato digestivo- aquí están compensadas.

En 1993 Kirchoff decía que la patogénesis de las formas clínicas provocadas por el *T. cruzi* son sólo comprendidas parcialmente, pero que es claro que el proceso de denervación juega un papel fundamental y que está en debate el papel de la autoinmunidad. Este debate surge de trabajos relativamente recientes que re-evalúan la responsabilidad directa del parásito, el cual -al disponerse de técnicas de mayor sensibilidad- ha sido sistemáticamente detectado en el sitio de la lesión (Tarleton, Zhang; Parasitol. Today, 1999, 15: 94-98).

En lo que resta de esta exposición trataré de analizar el proceso de denervación y si la autoinmunidad tiene alguna responsabilidad en su producción.

Los parásitos que están en circulación pueden tener diferente morfología la que, en general, está asociada al tropismo. Las cepas más delgadas suelen ser reticulotrópicas y las más gruesas miotrópicas. Las primeras invaden fácilmente cualquier célula por lo que nosotros las denominamos reticulotrópicas/pantrópicas.

En nuestro laboratorio durante años aislamos cepas de *T. cruzi* y vimos que algunas, que no mataban al ratón durante la infección aguda, producían en parte de ellos una parálisis significativa del tren posterior. Teniendo en cuenta las descripciones que habían hecho Roberto Sica y su grupo (Medicina Bs. Aires 1979, 39: 579-588) sobre alteraciones en la conducción de SNP en humanos, pensamos que éste podía ser un buen modelo para estudiar los mecanismos por los que se producen dichas alteraciones. Para ello decidimos utilizar dos poblaciones parasitarias: una miotrópica (precisamente la que producía la parálisis de tren posterior) y otra reticulotrópica/pantrópica con alta capacidad letal para el ratón y que de aquí en más denominaremos pantrópica. Ambas estimulan la respuesta inmune del huésped pero difieren en la capacidad de generar opsoninas y anticuerpos (acs) líticos, que son los acs protectores (Krettli et al., Clin. Exp. Immunol., 1979, 37: 416-423; Muller et al. Exp.

Parasitol. 1986, 61: 284-290). También difieren en los niveles séricos de trans-sialidasa (TS) alcanzados durante la infección aguda. Sólo en los ratones infectados con la cepa pantrópica se hallan niveles dosables de actividad TS y posteriormente, en los sobrevivientes, acs líticos y opsoninas (Leguizamón et al. Inf. Immun. 1994, 62: 3441-3446; Celentano et al. Parasite Immunol. 1992, 62: 155-167).

La actividad TS es un factor de virulencia al que se han atribuido propiedades facilitadoras de la invasión celular y del escape del parásito desde el fagolisosoma al citoplasma; esto facilitaría el ciclo del *T. cruzi* en el huésped mamífero. Quizá son éstos los factores que determinan que la cepa pantrópica presente un alto nivel de penetración celular y una mayor velocidad de duplicación comparado con la cepa miotrópica (Celentano et al., manuscrito en preparación), lo que da como resultado su elevada capacidad letal cuando es inoculada en un huésped de alta susceptibilidad como es el ratón. Por otro lado, en los animales sobrevivientes, la presencia de acs capaces de actuar sobre la forma circulante del parásito hacen que en el periodo crónico las parasitemias sean difícilmente detectables en estos animales. Por el contrario, con la cepa miotrópica el ciclo del parásito es más lento por lo que los animales sobrepasan fácilmente la infección aguda pero, al carecer de acs capaces de controlar al estadio circulante, las parasitemias son relativamente elevadas durante la infección crónica.

Con estas cepas, que biológicamente pueden ser consideradas "polares", estudiamos la progresión de daño en el SNP por electrofisiología e histología. Analizamos el arco músculo isquiotibial, nervio ciático y médula espinal.

Comprobamos que, si bien la infección siempre desencadena daño tanto en músculo como en nervio, las características predominantes de este daño difieren con la cepa de parásito. Así, los ratones infectados con la cepa pantrópica presentan aumento de la amplitud y de la duración de los potenciales de unidad motora (PUMs) cuando el eletromiograma se obtiene durante una contracción voluntaria; esto señala un patrón neuropático. Por el contrario, si los animales están infectados con la cepa miotrópica, el patrón predominante es miopático con menor duración y amplitud de los PUMs (Losavio et al. Am. J. Trop. Med. Hyg. 1989, 41: 547-555; Mirkin et al. Clin. Immunol. Immunopathol. 1994, 73: 69-79).

En cuanto al registro histológico, la lesión primaria consiste en la presencia de infiltrados inflamatorios a predominio de células mononucleares que en el caso de la cepa pantrópica están presentes tanto en músculo como en nervio y médula lumbar y en el de la miotrópica son escasos en nervio y médula pero muy importantes en músculo. En las preparaciones de músculo los signos neuropáticos (atrofia aislada y agrupada) predominan en los ratones inoculados con la cepa pantrópica mientras

que en aquellos infectados con la miotrópica predominan los signos miopáticos (splitting, centralización nuclear, diferencias en diámetro entre las fibras musculares, reemplazo adiposo de las fibras) (Mirkin et al. Clin. Immunol. Immunopathol. 1994, 73: 69-79).

La infección experimental también determina alteraciones del potencial de acción de nervio (PAN) que se manifiestan con mayor latencia y menor velocidad de la conducción del impulso nervioso, sugiriendo alteraciones de la mielina y menor número de axones funcionales (Losavio et al., Medicina Bs.Aires, 1993, 53: 129-132). La observación histológica lo corrobora: se detectan signos de remielinización axonal y cámaras de digestión de mielina, índice de degeneración axonal, mucho más frecuentes en ratones infectados con la cepa pantrópica que con la miotrópica (Mirkin et al., Clin. Immunol. Immunopathol. 1994, 73: 69-79).

El análisis por inmunohistoquímica de los fenotipos celulares de los infiltrados también evidencia diferencias: si bien en los ratones infectados con cualquiera de ambas cepas de *T. cruzi* se observa la existencia de LT CD4, LT CD8 y macrófagos, en los inoculados con la cepa pantrópica hay predominio de LT CD8 (sobre LT CD4) y hay células NK; en los ratones infectados con la cepa miotrópica predominan las células CD4 y se encuentran LB e IgG en los intersticios. Así mismo, se detecta antígeno parasitario en nervio y músculo con la cepa pantrópica y sólo en músculo con la miotrópica (Mirkin et al. Clin. Immunol. Immunopathol. 1994, 73: 69-79).

Resumiendo, podemos decir que contamos con dos cepas que presentan diferencias tanto en el comportamiento electrofisiológico como histopatológico, así como en la composición de los infiltrados y en la distribución del antígeno parasitario.

Quisimos entonces analizar la funcionalidad de los sueros y de los LT en el desencadenamiento del daño. Con este propósito determinamos inicialmente su autorreactividad frente a antígenos murinos obtenidos de músculo esquelético y de sistema nervioso.

En ensayos de proliferación verificamos que los LT de ratones infectados con la cepa pantrópica reconocen significativamente antígenos de sistema nervioso pero no de músculo; en cambio, los LT de animales infectados con la cepa miotrópica reconocen escasamente antígenos de músculo pero también, aunque muy pobremente, antígenos de sistema nervioso (Mirkin et al., Clin. Exp. Immunol. 1997, 107: 328-334).

En el caso de los sueros, evaluamos autorreactividad por western blot y por inmunofluorescencia. Con la primera técnica la casi totalidad de ellos, independientemente de la cepa infectante, reconocen antígenos de sistema nervioso, mientras que los antígenos de músculo son sólo reconocidos por parte de los sueros obtenidos de ratones infectados con la cepa miotrópica. En el caso de la inmunofluorescencia, más del 70% de

los sueros de ratones infectados con cualquiera de ambas cepas reconocen antígenos de nervio con un patrón de marcación de mielina y alrededor del 40% lo hacen con antígenos de músculo (Tekiel et al., Parasitol. 1997, 115: 495-502).

La funcionalidad, tanto de los LT como de los sueros, fue evaluada por transferencia pasiva.

Se purificaron LT CD4 y LT CD8 obtenidos de ratones con infección crónica y se transfirieron a ratones "naive" con los siguientes resultados:

1. Los LT CD4 obtenidos de ratones infectados con la cepa miotrópica transfieren daño a músculo, registrándose un infiltrado en este tejido visible a los 7 días post transferencia (dpt).

2. Tanto los LT CD4 como los LT CD8 obtenidos de ratones infectados con la cepa pantrópica transfieren daño y su tejido blanco es sistema nervioso. Los infiltrados se registran en este tejido a los 7 dpt de LT CD4 y a los 4 dpt de LT CD8. En este último caso en el infiltrado de los receptores predominan los LT CD8.

Estos estudios nos permitieron clarificar lo que ya sugerían los experimentos de infección: que la cepa miotrópica produce primariamente daño en músculo y la pantrópica en nervio. Fue la primera vez que se logró diseccionar tan claramente el tejido blanco de daño entre dos cepas. Cabe destacar que en estas lesiones no se detecta por PCR antígeno parasitario (Mirkin et al., Clin. Exp. Immunol. 1997, 197: 328-334). Actualmente estamos analizando la clonalidad de los receptores Vb en los LT de las lesiones.

Para analizar el papel de los sueros realizamos su inoculación por vía perineural a fin de asegurarnos su llegada a nervio y cuatro días después medimos latencia y amplitud del PAN. Hallamos que los sueros obtenidos de ratones infectados con la cepa pantrópica, aumentan el tiempo de latencia y disminuyen la amplitud, sugiriendo alteraciones en la mielina y menor número de axones funcionales. En cambio, la inoculación de suero obtenido de ratones inoculados con la cepa miotrópica no modifica estos parámetros (Tekiel et al., manuscrito en preparación).

A pesar de esta diferencia funcional de los sueros, ambos grupos reconocen antígenos de sistema nervioso. Para tratar de dilucidar la causa de la diferente actividad, analizamos separadamente los sueros positivos por inmunofluorescencia de los negativos y observamos que la capacidad de modificar el PAN que tienen los sueros de animales infectados con la cepa pantrópica se asocia a su reactividad para nervio por esta técnica. En cambio, los sueros de animales infectados con la cepa miotrópica, aún los reactivos por inmunofluorescencia frente a nervio, carecen de efecto alguno sobre la transmisión del impulso nervioso. ¿En qué difieren los inmunoseros de la cepa pantrópica y miotrópica, si ambos reconocen antígenos nativos de nervio? Sólo los ratones que reciben suero

anti-cepa pantrópica, presentan ACS adheridos al nervio al cuarto día post transferencia, momento en que se realiza el estudio electrofisiológico (Tekiel et al. Manuscrito en preparación).

En conclusión, los LT de ratones infectados con *T. cruzi* transfieren daño tisular pero el fenotipo efector y el tejido blanco son cepa de parásito dependientes. Por su parte los sueros modifican el impulso nervioso sólo cuando reconocen antígenos nativos y mientras permanecen unidos al epítipo, lo cual varía con la cepa de parásito.

Estas cepas presentan también otras diferencias ya que hemos registrado alteraciones en la gestación

únicamente en los ratones hembras infectados con la cepa miotrópica, pero la transmisión vertical del parásito sólo tiene lugar en las infecciones con la cepa pantrópica (Solana et al., enviado).

Si bien resta profundizar estos estudios, los resultados presentados señalan claramente que las diferentes poblaciones parasitarias juegan un papel no despreciable en la relación huésped-parásito. Esto, además de contribuir al conocimiento de la patogénesis de esta enfermedad, debe considerarse especialmente cuando se trate de diseñar estrategias de profilaxis mediante inmunógenos vacunates.