

COMUNICACIONES

Lesiones tisulares crónicas en ratones blancos inmunizados e infectados con *Trypanosoma cruzi*

Rodolfo Pérez Reyes y Angel Abbud Ochoa

Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Chihuahua. Apartado Postal 1091- Chihuahua 31000, México.

(Rec. 18-V-1992. Acep. 25-X-1992)

**Abstract:** Mice were immunized with whole membranes of cultured epimastigotes and then inoculated with cultured tripomastigotes. The blood parasite count was lower than in the control. No changes could be detected however, in the length of the prepatent period nor in the extent and duration of the tissue damage observed in the chronic phase of the infection. Damage was evident in the tissues of both immunized and naive animals up to 171 days post inoculum. Blood parasites could be demonstrated neither by direct observation nor by culture, as soon as 117 days after infection. The presence of mast cells a few hours after infection and throughout the study suggests a role of these cells in both the specific and nonspecific components of host response.

**Key words:** *Trypanosoma cruzi*, chronic tissue damage, white mouse.

La mayoría de los experimentos de inmunoprofilaxia en la enfermedad de Chagas coinciden en que la protección es parcial y no impide el desarrollo de la infección (Hauschka *et al.* 1964, Ouassi *et al.* 1990). Sin embargo, un escaso número de parásitos es suficiente para desarrollar lesiones importantes y aún graves. Por lo tanto parece adecuado preguntarse si una inmunización que reduzca considerablemente la infección sanguínea aguda, pero que no elimine totalmente la infección, podría determinar cambios patológicos a largo plazo. De aquí nuestro interés en aportar nuevos datos sobre esta importante cuestión.

Empleando un antígeno descrito previamente (Olivas y Pérez Reyes 1990), se inmunizaron diez ratones hembras (cepa CD-1) de 40 días de edad. Cada animal recibió tres dosis intradérmicas de 20 µg, la primera con adyuvante completo de Freund y las siguientes cada tercer día sin adyuvante. Catorce días después de la inmunización se inocularon subcutáneamente con  $15 \times 10^3$  tripomastigotes metacíclicos de la misma cepa, purificados por columna de DEAE celulosa.

Un lote semejante de ratones no inmunizados se inoculó de la misma manera para servir de testigo. Dos roedores de cada grupo se sacrificaron en fechas fijadas arbitrariamente (días 39, 55, 117, 210, 245 y 255) a partir de la fecha de inoculación para tomar muestras de sangre y tejidos.

De cada animal sacrificado se inocularon 0.2 ml de sangre por duplicado en medio difásico de gelosa sangre y se incubaron a temperatura ambiente durante 45 días. Los tejidos (corazón, intestino delgado y músculo esquelético) se fijaron con formalina neutra al 10% en PBS, se incluyeron en parafina, se cortaron a un espesor de 5 µm y se tiñeron con hematoxilina eosina para su observación microscópica. Algunos cortes se tiñeron con colorante de Giemsa para identificar los mastocitos. Aunque no era objetivo de este trabajo realizar un estudio histológico cuantitativo, consideramos conveniente tener una idea de las células inflamatorias presentes y su abundancia relativa. Para evaluar las células inflamatorias se examinaron tres secciones de cada tejido por ratón, contando las células presentes en tres campos microscópicos de 400x.

En los animales inoculados los parásitos tisulares fueron escasos, aún durante la mayor abundancia de flagelados sanguíneos. En los tejidos no inmunizados, a los 55 días se encontraron "nidos" de amastigotes en músculo esquelético, pero en corazón fueron escasos. En observaciones posteriores no se encontraron parásitos tisulares (a excepción de un pequeño nido de pared de ventrículo derecho del corazón a los 171 días). Los últimos hemocultivos positivos se obtuvieron a los 117 días.

Las lesiones más severas aparecieron en músculo esquelético de los ratones testigo, a los 55 días; el infiltrado fue abundante, aunque no se encontraron trombos en los vasos sanguíneos. En esta fecha se distinguieron tres aspectos en la inflamación: Primero, se encontraron grupos celulares densos con predominio de neutrófilos y células plasmáticas en los lugares donde hubo necrosis de fibras musculares, causadas probablemente por la presencia de parásitos, y en orden decreciente se encontraron linfocitos, macrófagos y algunos eosinófilos. En segundo lugar se encontró un infiltrado abundante alrededor de los vasos sanguíneos y troncos nerviosos (ciático y sus ramas), donde se observaron linfocitos, células plasmáticas y macrófagos y algunos eosinófilos y mastocitos. Finalmente hubo un infiltrado difuso entre los miocitos formado principalmente por linfocitos, células plasmáticas y escasos neutrófilos. Ocasionalmente se encontró algún mastocito en los animales sacrificados en fechas posteriores a la desaparición de los focos de necrosis, pero persistió la inflamación difusa y la perivascular, ambas constituidas casi exclusivamente por linfocitos, un número menor de macrófagos y ocasionalmente eosinófilos y mastocitos. Aunque el proceso inflamatorio se fue reduciendo paulatinamente era aún observable a los 250 días de la inoculación. En el corazón las lesiones fueron considerablemente menores, generalmente en forma de infiltrado difuso, más abundante en la pared de las aurículas, donde aún fueron aparentes a los 250 días. En el intestino delgado, a los 55 días, las lesiones se manifestaron principalmente por la destrucción de las células de los plexos nerviosos, donde aparecieron algunos núcleos picnóticos y citoplasma basófilo. El infiltrado alrededor de los plexos estaban formado principalmente por linfocitos y un menor número de macrófagos y neutrófilos y ocasionalmente eosinófilos.

Los animales inmunizados mostraron una reducción drástica de los flagelados sanguíneos, que en promedio representaron aproximadamente la décima parte de los parásitos observados en los testigos no inmunizados; pero no hubo modificación apreciable en el período prepatente ni en la intensidad y duración de las lesiones tisulares crónicas. Otros autores señalan una reducción del daño tisular en los animales inmunizados (Rowland y Lavy 1987); en nuestro caso siempre se encontró daño tisular. Andrews y *et al.* (1985) inmunizaron con tripomastigotes metacíclicos inactivados con 8-metoxypsoralen y obtuvieron protección total. Sin embargo, conviene señalar que los ratones blancos habitualmente no desarrollan las alteraciones, usualmente referidas como "megas" en abreviación a megacardías y megacolon entre otros órganos afectados y por lo tanto son modelos adecuados para el estudio de la enfermedad de Chagas aguda, pero no para la enfermedad Chagas crónica. Por otra parte es significativa la presencia de mastocitos en músculo esquelético de los animales infectados y especialmente en los inmunizados previamente, pues estas células están definitivamente en mayor número que en los tejidos de los ratones sanos no-inoculados. Los mastocitos recientemente se señalaron en tres enfermos chagásicos crónicos estudiados (Cabral 1988) y en el exudado peritoneal de ratones inoculados experimentalmente (Ubirajara *et al.* 1988) Estas células se relacionan habitualmente con procesos inmunes dependientes de inmunoglobulina E pero en la enfermedad de Chagas ésta no se ha demostrado (Powell y Wassom 1991). En nuestra opinión, los mastocitos podrían tener importancia en la respuesta inespecífica y específica contra *T. cruzi*, ya que los hemos observado desde las primeras horas de la infección.

## REFERENCIAS

- Andrews, N.W., M.J.M. Alves, R.I. Schumacher & W. Colli. 1985. *Trypanosoma cruzi*: Protection in mice immunized with 8-methoxypsoralen-inactivated trypomastigotes. *Exp. Parasitol.* 60:255-262.
- Cabral, H.R.A. 1988. Mast cell in human myocardium in Chagasic heart disease. XV Annual Meeting on Basic Research in Chagas' Disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 83: 151.
- Hauschka, T.S., M.B. Goodwin, J. Palmquist & E. Brown. 1950. Immunological relationship between seven

- strains of *Trypanosoma cruzi* and its application in the diagnosis of Chagas' disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 30: 1-16.
- Olivas, M.I. & R. Pérez Reyes. 1990. Inmunoprofilaxis con membranas de *Trypanosoma cruzi* en la enfermedad de Chagas experimental. *Rev. Latinoamer. Microbiol.* 32: 67-70.
- Quaissi, M.A., A. Taibi, J. Comette, P. Velge, B. Marty, M. Loyens, M. Esteva, F.S. Rizvi & A. Capron. 1990. Characterization of major surface and excretory secretory immunogens of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes and identification of potential protective antigen. *Parasitol.* 100: 115-124.
- Powell, M. R. & D.L. Wassom. 1991. Host genetics and resistance to *Trypanosoma cruzi*: Antibody isotype profiles. Abst. 66 Annual Meeting, Amer Soc. Parasitol. Madison, Wisconsin, p. 67.
- Ubirajara-García, 1988 I., A. Prouvost-Danon, I. J.B. Camargo, W.M.S.C. Tamashiro, W.L. Tafuri & H. A. Rangel. Mast cell degranulation in the inflamed tissue and IgG mediated exocytosis in the experimental Chagas' Disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 83 (suppl. 1.): 151.