



Universidad Nacional del Nordeste
Facultad de Ciencias Veterinarias
Corrientes-Argentina

TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN
MÓDULO DE INTENSIFICACIÓN PRÁCTICA

Título:

“Histopatología de riñón en la etapa aguda de la
infección experimental por *Trypanosoma cruzi* en
Ratones”

Beca de Pregrado SGCyT-UNNE (Res.Nº 1016/2016 C.S.)
Aprobada

OPCIÓN: SALUD PÚBLICA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS

TUTOR EXTERNO: Dr. LERTORA, Javier.

TUTOR INTERNO: Dra. MARUÑAK, Silvana Licia.

RESIDENTE: VERA, Douglas Dante

CORREO ELECTRÓNICO: verad.douglas@gmail.com

ÍNDICE

Resumen	1
Introducción	2
Objetivos	5
Materiales y métodos	5
Resultado y Discusión	7
Conclusión	10
Bibliografía	11

RESUMEN

Las cepas de *Trypanosoma cruzi* comprenden un conjunto de poblaciones que circulan entre vectores, hombre y reservorios, tanto domésticos como selváticos, en regiones del mismo país, comportándose de diferente forma al infectar experimentalmente animales de laboratorio. Estas diferencias se manifiestan en los niveles de parasitemia e invasión a ciertos órganos, causando desde leves daños hasta la muerte. Este comportamiento tan variado se ha atribuido a múltiples causas como: factores ambientales, inmunidad, virulencia, patogenicidad, y el paso por diferentes especies de transmisores y hospederos. El objetivo del presente trabajo fue caracterizar las lesiones halladas en tejido renal de ratón en la etapa aguda de la tripanosomiasis experimental. Se trabajó con una cepa de *T. cruzi* provista del Laboratorio de Ecoepidemiología de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales FCEN-UBA, IEGEBA-CONICET, con la cual se inocularon ratones provistos por el Bioterio de la Facultad de Medicina, cepa CF₁, de 18-20g de peso, por vía intraperitoneal. Un grupo de animales control fueron inoculados con solución fisiológica. En el décimo día de la infestación, previo al sacrificio, se les realizó un corte de la punta de la cola para obtener sangre periférica realizando un frotis para observar la presencia de los parásitos en sangre. Confirmado esto, se procedió a la eutanasia, previa anestesia general (ketamina 50mg/kg peso, vía intraperitoneal), y toma de muestra de riñón para su posterior procesamiento histopatológico. El estudio histológico demostró lesiones inflamatorias leves, caracterizada por escaso infiltrado multifocal de macrófagos en intersticio cortical del riñón. Los procesos inflamatorios se asociaron con la cuantía de la parasitemia presente en el momento del sacrificio y con el tiempo de evolución de la infección. El histotropismo de algunas poblaciones de *T. cruzi*, ha sido ampliamente documentado desde los primeros trabajos experimentales y confirmado por diversos investigadores. La determinación del tropismo de una cepa de *T. cruzi* es un parámetro biológico que requiere de condiciones estrictamente controladas y que puede o no tener relación con las características clínicas de la enfermedad en las zonas geográficas de donde proviene.

INTRODUCCIÓN

El *Trypanosoma cruzi* (figura 1) es un protozooario hemoflagelado, considerado el agente causal de la enfermedad de Chagas (Chagas, 1909), y es transmitido a los hospederos mamíferos por medio de insectos vectores del género *Triatoma* (figura 2), (a través de la contaminación con excretas infectadas de insectos triatomíneos hematófagos, infectando a mamíferos entre los cuales se incluyen al humano y a otros animales domésticos y silvestres). Además pueden considerarse vías de infestación reconocidas pero menos frecuentes, la vía parenteral (transfusiones sanguíneas), de forma congénita (transplacentaria) (Atias & Neghme, 2003) y con menor frecuencia por ingestión de alimentos contaminados (Alarcón de Noya *et al.*, 2010). La infección por el parásito distingue dos cursos, uno agudo caracterizado por fiebre, linfadenopatía, aumento del tamaño del hígado y bazo y, en ocasiones, miocarditis o meningoencefalitis con pronóstico grave y el curso crónico, del cual llegan entre el 30 y 40% de todos los pacientes chagásicos, suele haber cardiomiopatía difusa grave, o dilatación patológica (megasíndromes) del esófago y colon, megaesófago y megacolon respectivamente.

Las cepas de *T. cruzi* poseen potencial de invadir y lesionar los tejidos con diferente intensidad causando variada reacción inflamatoria. En este sentido, los estudios sobre el tropismo y grado de patogenicidad de cepas de *T. cruzi* en modelos experimentales, han revelado que algunas cepas tienden a diseminarse en casi todos los tejidos (Paredes *et al.*, 2009). La marcada heterogeneidad de algunas cepas de *T. cruzi* explicarían el fenómeno de paninfectividad (Andrade, 2000).

En los modelos de laboratorio se ha observado que cuando ocurre la deposición de las heces contentivas de las formas infestantes o tripomastigotes metacíclicos sobre sus hospedadores mamíferos, los parásitos se diseminan hacia tejidos tales como el miocardio, esófago, colon, hueso y cartílago y dependiendo del caso, puede invadir la placenta, los fetos y plasma seminal de ratones con infección aguda (Lugo de Yarbuh *et al.*, 2010; Sulbarán, 2011; Alarcón *et al.*, 2011; Cáceres, 2011).

En cuanto a la caracterización biológica se realizaron estudios de diferentes cepas del parásito, lo que ha permitido establecer que el *T. cruzi* que proviene de diferentes transmisores, reservorios y regiones del mismo país, se comportan diferente al infectar experimentalmente animales de laboratorio. Estas diferencias se manifiestan en los niveles de parasitemia e invasión a ciertos órganos, así como diferencias en las infecciones que el parásito ocasiona tanto en animales como en humanos, causando

desde daños leves hasta la muerte. Este comportamiento tan variado se ha atribuido a múltiples causas como: factores ambientales, inmunidad, virulencia, patogenicidad, y el paso por diferentes especies de transmisores y hospederos. El número y localización de los parásitos en los tejidos de ratón infestado experimentalmente con *T. cruzi* presenta variaciones de tropismo tisular, así como falta de correlación entre parasitemia y lesión tisular de acuerdo a la cepa empleada y al origen geográfico de la misma, existe correlación entre la presencia de antígenos de *T. cruzi* y la severidad del infiltrado inflamatorio. Los estudios reportan que los factores genéticos tanto del hospedero como del parásito influyen en la infección. El objetivo del trabajo, presentado como informe final, fue observar si se producen lesiones histopatológicas a nivel renal en ratones infectados experimentalmente con una cepa de *T. cruzi* en la etapa aguda de la enfermedad.

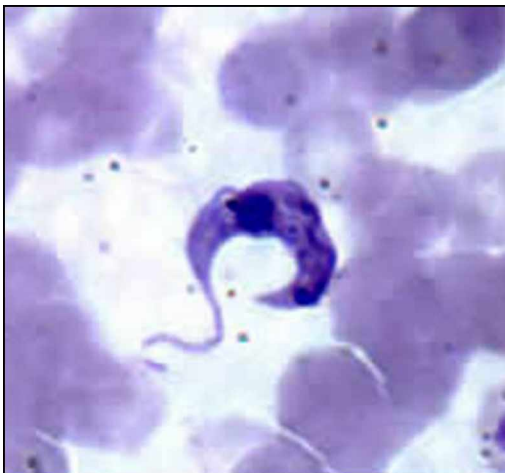


Figura N°1: Microfotografía de *Trypanosoma cruzi* Agente etiológico. Fuente: Tomada y editada de: CDC

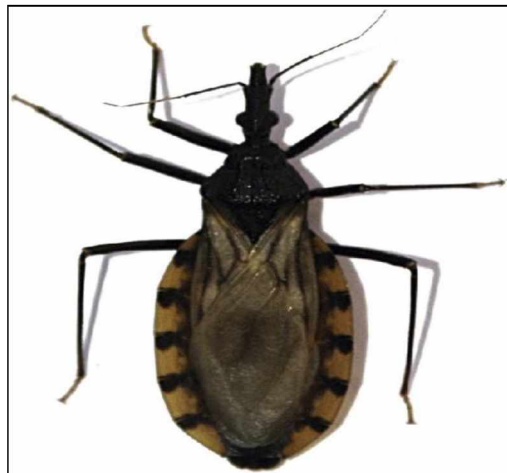


Figura N°2: Ejemplar de *Triatoma infestans*. Vector de la infección. Fuente: Sylvatic form of *Triatoma infestans*, the main vector of Chagas disease in the Southern Cone countries

➤ Antecedentes

La enfermedad de Chagas afecta a millones de personas en Latinoamérica (figura 3) causando importantes problemas sanitarios, económicos y sociales para los países afectados. Constituye en la actualidad la cuarta enfermedad tropical más importante, sólo superada por la malaria, la tuberculosis y la esquistosomiasis (Kirchhoff, 1993).

Debido a la consecuente incapacidad y mortalidad, la enfermedad de Chagas ha sido uno de los problemas de salud pública más importante en las regiones endémicas (Villanueva *et al.*, 2005). La parasitosis es transmitida por vía vectorial a partir de insectos hemípteros hematófagos de la familia de los triatomíneos, comúnmente llamados vinchucas (figura 2), siendo el más importante en la Argentina el *Triatoma infestans*, por su adaptación ecológica a la vivienda.

Durante décadas la enfermedad de Chagas fue estrictamente rural y la transmisión por el vector estaba directamente relacionada a las precarias condiciones de vida particularmente frecuentes en las zonas rurales, pues el insecto se aloja sobre todo en las rajaduras de las paredes de barro o en los techos de paja de las viviendas típicas de la

población marginal, como así también puede encontrarse en las paredes de ladrillo asentadas en barro (Storino *et al.*, 2003). Sin embargo, las migraciones hacia las ciudades han transformado la enfermedad en un fenómeno crecientemente urbano en el que intervienen no solamente el hombre y el vector sino también numerosos animales domésticos que se convierten en reservorios de la enfermedad (Silveira, 2002). Así entonces el parásito que provoca esta afección puede infestar además del ser humano a una gran cantidad de mamíferos, siendo los caninos los animales principalmente afectados y que conviven estrechamente con la población (Barr *et al.*, 1991).

En América Latina se ha considerado que el perro juega un papel muy importante en la transmisión de *T. cruzi* domiciliar, al demostrarse que es un reservorio altamente infestante para el vector (Eloy & Lucheis, 2012).

El perro puede ser también víctima del parásito ya que puede sufrir la enfermedad al igual que los seres humanos (Acha, 1986; Acha & Szifres, 2003). El insecto infectado transmite el parásito a los perros durante la ingesta de sangre sin embargo, el instinto del perro de tomar el insecto con la boca y masticarlo, representa un mecanismo de contagio mucho más efectivo (Albuquerque & Barretto, 1968).



Figura3. Mapa donde se refleja la situación de la distribución de la transmisión vectorial en Latinoamérica en 2014. Fuente: Organización Panamericana de la Salud (PAHO).

La enfermedad de Chagas no es de diagnóstico frecuente en los caninos y felinos, si bien es de reconocimiento mundial su importancia en la cadena epidemiológica, no se trata la enfermedad. Es decir que el animal enfermo es valorado como reservorio y no como paciente para el Médico Veterinario.

Si bien la problemática de esta enfermedad es compleja y para su erradicación se deben contemplar muchos aspectos, en especial lo cultural de amplias zonas en nuestro país, lo que se pretende es un aporte mínimo destacando la utilidad del modelo murino como aproximación para reconocer los daños que producirían las cepas regionales de *T. cruzi* en los caninos a fin de mejorar las posibilidades de intervención en la salud de los mismos, con el consiguiente beneficio para la salud pública.

Objetivos del Plan de Trabajo

- **Objetivo General**

- Reproducir la enfermedad de Chagas experimental en un modelo murino con presentación de tropismo en tejido renal.

- **Objetivos Particulares**

- Caracterizar histopatológicamente el tejido renal de ratones con tripanosomiasis experimental durante la fase aguda
- Comparar las observaciones histopatológicas de los tejidos tratados con los de animales controles.
- Mantener poblaciones altamente infectivas a partir de pasajes en ratones infectados con una cepa (tipo I) de *Tripanosoma cruzi*.

- **Hipótesis**

- La cepa (tipo I) de *T. cruzi* inoculada en forma experimental en ratones produce daños a nivel de riñón en la etapa aguda de la enfermedad.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales: se utilizaron ratones blancos (cepa CF1), machos, adultos jóvenes, con peso aproximado de 18 a 20 gr. y divididos en dos grupos:

Grupo infestado: constituido por 10 animales inoculados intraperitonealmente con 1x 10⁵ tripomastigotes sanguíneos de *T. cruzi* en 0,1 mL de suspensión (Brener, 1962).

Grupo control: constituido por 10 animales sanos inyectados vía intraperitoneal con solución fisiológica, que actúa como placebo.

Determinación de la parasitemia: El curso de la infección fue seguido día alternado a partir del 4° día post-inoculación, mediante el examen directo de muestras de sangre periférica extraídas de la porción distal de la cola de cada ratón, colocada sobre portaobjetos y cubierta con cubreobjetos. El recuento de tripomastigotes se realizó en 100 campos microscópicos a 400x (microscopio Nikon Eclipse E 100).

Técnica de disección: en el décimo día de la infestación, a los animales antes de la eutanasia se les realizó un corte de la punta de la cola para obtener sangre periférica realizando un frotis y observar la presencia de los parásitos en sangre. Una vez confirmada la presencia del parásito, los animales fueron anestesiados con una inyección intraperitoneal de Ketonal (Ketamina) 50 mg/ml de peso corporal y luego de la abertura del abdomen, se retiró el riñón de los animales de los dos grupos experimentales. Fragmentos de los tejidos fueron fijados en una solución de formaldehído bufferado al 10% durante 24 h.

Técnica histológica

Una vez fijadas, las muestras de riñón fueron procesadas según la técnica histológica clásica para bloques parafinados, cortadas a 5 µm y teñidas con hematoxilina y eosina (HE).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Durante el curso de la infección aguda se observó parasitemia, con presencia de tripomastigotes en sangre periférica en los ratones tratados experimentalmente. Los animales sobrevivieron en esta etapa de la enfermedad.

Al microscopio óptico se observó en intersticio se evidenció escaso infiltrado de macrófagos intersticial de distribución multifocal en corteza.

Los estudios sobre el comportamiento de *T. cruzi* en humanos y otros mamíferos han mostrado, variadas manifestaciones clínicas asociadas al potencial patógeno y al tropismo diferencial de los diversos genotipos del parásito que estén circulando (Brenière *et al.*, 2012). La patogenicidad de *T. cruzi* también se encuentra asociada a sus numerosas características metabólicas diferenciales y a la estructura antigénica que puede expresar frente a hospedadores con condiciones genéticas propias y un sistema inmunológico establecido (Pedreira de Castro & Brener, 1985).

Las evidencias sugieren que el daño tisular e inflamatorio que sufren los tejidos dependería de la agresión por antígenos de *T. cruzi* a los tejidos del hospedador, con participación del sistema inmune y reacción cruzada entre *T. cruzi*, los tejidos y los receptores moleculares en la superficie de las células fagocíticas, en especial con macrófagos peritoneales de ratón, primera línea celular invadida por el parásito (Kipnis *et al.*, 1979). Se ha referido que diferentes moléculas del parásito producirán activación policlonal asociada a elevadas parasitemias, una depresión de la respuesta inmune celular y que el parásito se diseminaría en el organismo originando una compleja respuesta inflamatoria de subpoblaciones de linfocitos por mecanismos inmunobiológicos que caracterizan una infección aguda por *T. cruzi* (Minoprio *et al.*, 1988).

Si bien son las primeras observaciones realizadas, la cepa en estudio mostró ser patógena en los ratones infestados, se logró caracterizar histopatológicamente los cambios observados en el tejido estudiado sin que fuera posible encontrar nidos parasitarios, y compararlo con los animales controles. Concluimos que la enfermedad está dada por la relación entre la presencia del parásito en sangre periférica y las lesiones tisulares que este genera. Autores hallaron daño renal con similares características, descrito en un cachorro de raza Cimarron, por transmisión congénita de la enfermedad de Chagas, como también se cita alteración renal en modelos murinos infestados experimentalmente (Painemal *et al.*, 2012)

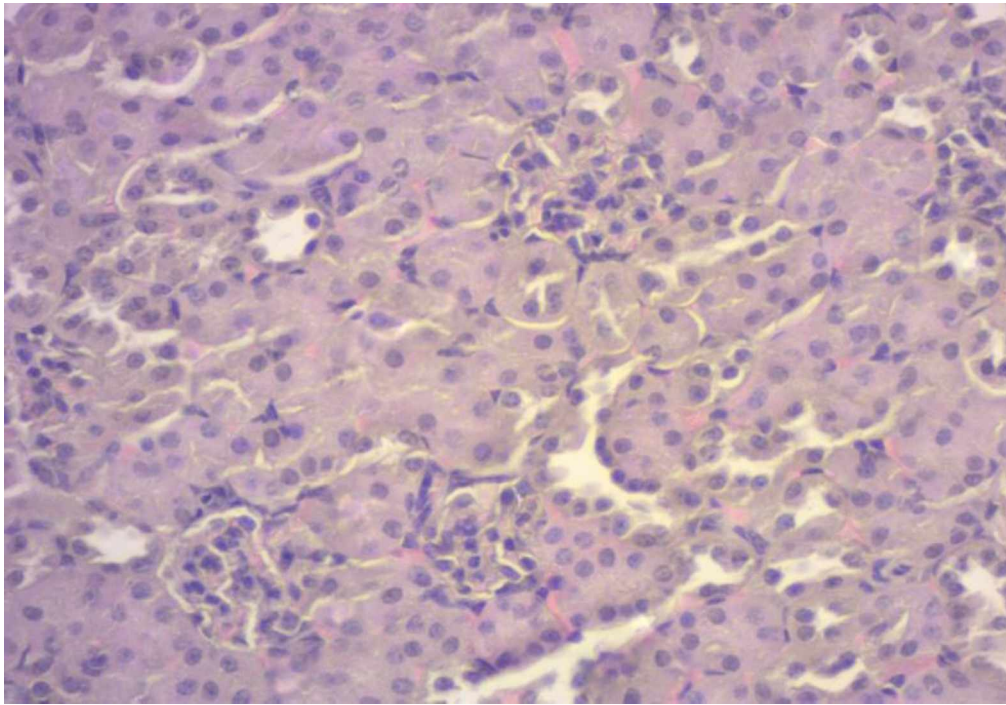


Figura 4. Corte histológico de riñón de ratón control. HyE. 40X

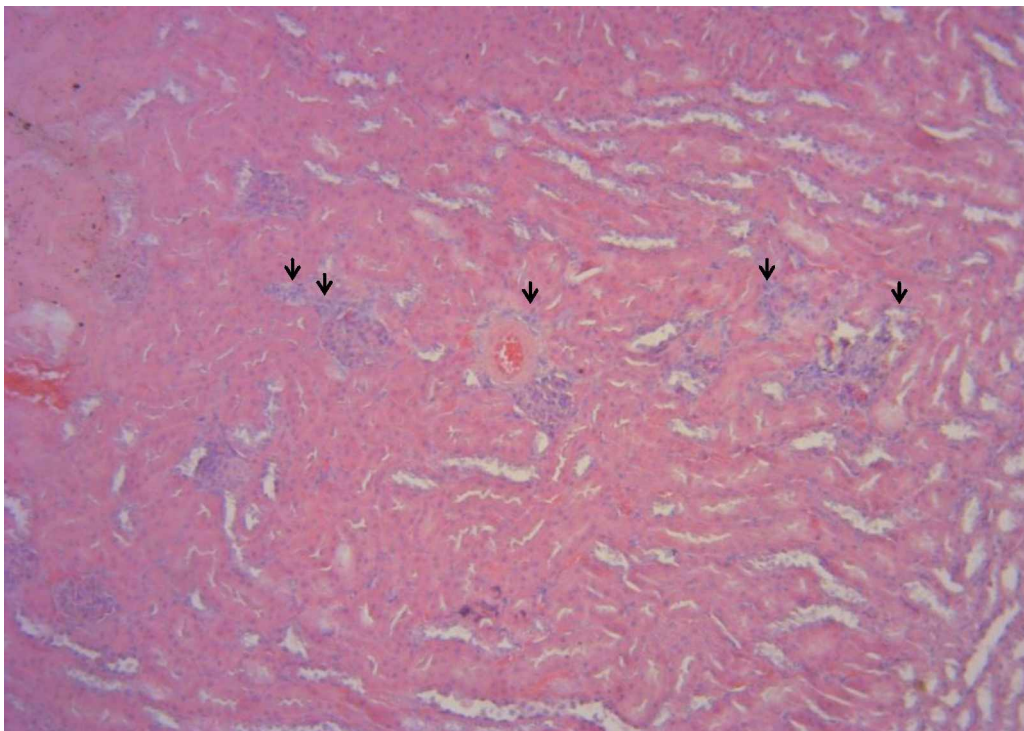


Figura 5. Corte histológico de riñón de ratón infectado con *T. cruzi*. Se observa múltiples focos pequeños de infiltrado de macrófagos intersticial (flechas). HyE. 10X

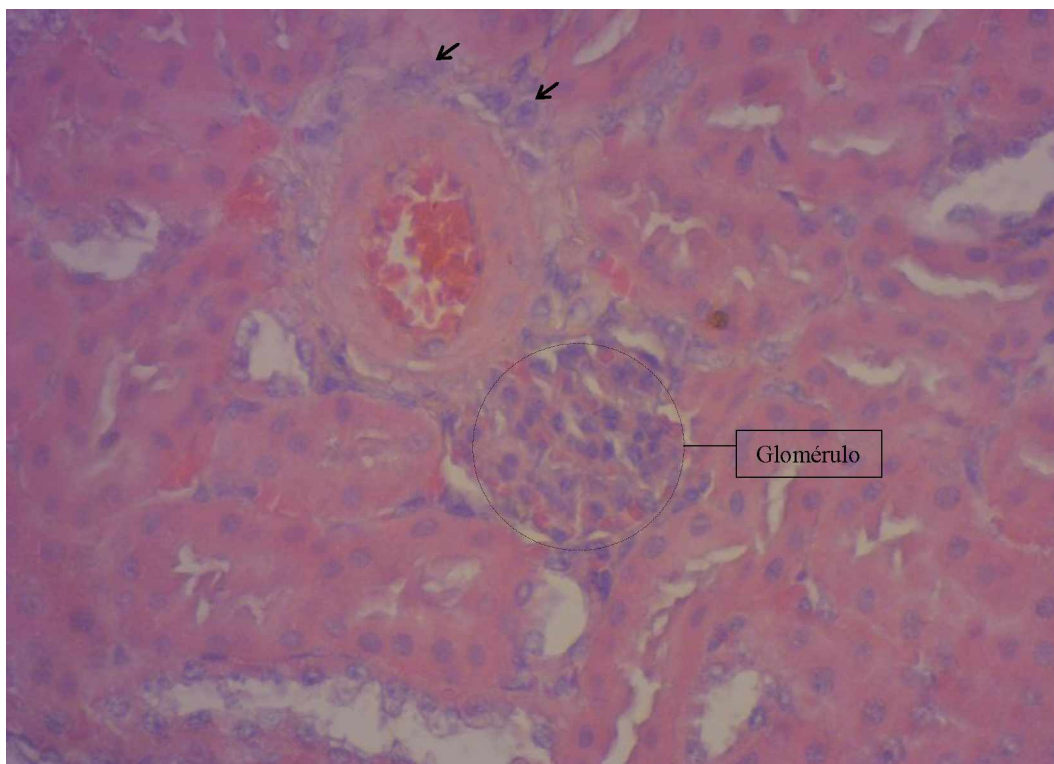


Figura 6. Corte histológico de riñón de ratón infectado con *T. cruzi*. Se observa infiltrado de escasos macrófagos en intersticio (flecha). HyE. 40X

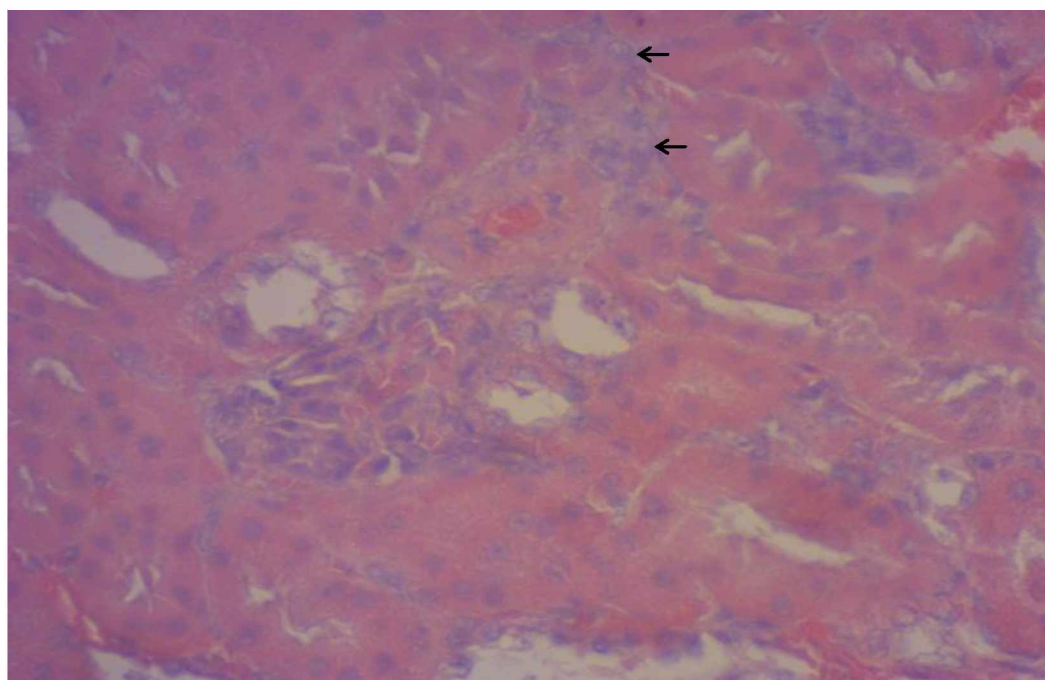


Figura 7. Corte histológico de riñón de ratón infectado con *T. cruzi*. Leve infiltrado de macrófagos en intersticio (flechas). HyE. 40X

CONCLUSIÓN

La cepa en estudio mostró ser patogénica para el ratón y presentó tropismo por el riñón. Se logró caracterizar histopatológicamente los cambios observados en el tejido estudiado y comparar con los animales controles. El histotropismo del *Trypanosoma cruzi* ha sido ampliamente documentado desde los primeros trabajos experimentales y confirmado en nuestro trabajo. La cepa que estudiamos muestra tropismo por el riñón en ratones, sin que fuera posible encontrar nidos parasitarios en los tejidos estudiados.

Concluimos que la enfermedad es dada por la relación entre la presencia del parásito a nivel intracelular y las lesiones tisulares que este genera, sumado a los mecanismos inflamatorios, autoinmunes, vasculares en los diversos tejidos.

BIBLIOGRAFÍA

- Acha, Pedro N. 1986. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y los animales. 2ª ed. Washington: Organización Panamericana de la Salud; Organización Mundial de la Salud.
- Acha PN y Szifres B. 2003. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales, 3º ed. Public. Cient. N° 580 Tomos I,II y III OPS Washington, D.F.
- Albuquerque R. & Barretto M. 1968. Studies on wild reservoirs and vectors of "*Trypanosoma cruzi*." XXX: natural infection of the bush dog, "*Cerdocyon thous azarae*" by "*T. cruzi*". *Rev. Bras. Biol.*, vol. 28, p. 457-468.
- Atias A. & Neghme A. 2003. Parasitología Médica, 2º Ed. Edit. Mediterráneo, reimp. Santiago de Chile.
- Alarcón de Noya B, Diaz-Bello Z, Colmenares C, Ruíz-Guevara R, Mauriello L. et al. 2010. Large urban outbreak of orally acquired acute Chagas disease at a School in Caracas, Venezuela. *J.Intern.Dis* 201: 1308-1315.
- Alarcón M, Moreno E., Colasante C, Lugo de Yarbuh A, Cáceres K. & Araujo S. 2011. Presencia de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* en el plasma seminal de ratones con infección aguda. *Bol.Malariol.Salud. Amb.* 51:237-239.
- Andrade SG. 2000. Patología experimental de doença de Chagas. In: Brener, Z, Andrade ZA & Barral-Netto M (eds) *Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas*. 2a ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan. 177-200 pp.
- Barr SC, Dennis VA, Klei TR 1991. Serologic and blood culture survey of *Trypanosoma cruzi* infection in four canine populations of southern Louisiana. *Am J Vet Res* 52: 570-573.
- Brener Z. 1962. Observações sobre a imunidade a superinfecções em camundongos experimentalmente inoculados com *Trypanosoma cruzi* e submetidos a tratamento. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.* 4: 119-123.
- Breniere SF, Aliaga C, Waleckx E, Buitrago r., Salas R, et al. 2012. Genetic characterization of *Trypanosoma cruzi* DTUs in wild *Triatoma infestans* from Bolivia: Predominance of T. crI. *PLoS. Negl. Trop. Dis.* 5: 1650.
- Cáceres K. 2011. Evaluación de las lesiones en los tejidos de ratones con infección aguda producida por *Trypanosoma cruzi* aislado de un caso chagásico. Universidad de los Andes. 72pp.
- Chagas C. 1909. Nova tripanozomiaze humana. Estudos sobre a morfologia o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade mórbida to homen. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 1: 529-218.
- Eloy, L.J., Luchesis S.B. 2012. Canine trypanosomiasis: etiology of infection and implication for public health. *J. Venom Anim. Toxins incl. Trop. Dis.* 15(4): 589 – 611.

- Kipnis T, Calich V. & Dias da Silva W. 1979. Active entry of bloodstream forms of *Trypanosoma cruzi* into macrophages. *Parasitology* 78: 89-98.
- Kirchhoff LV. "American trypanosomiasis (Chagas disease)—a tropical disease now in the United States." *N Engl J Med.* 1993 August 26;329(9):639-44. [PubMedOnline](#).
- Lugo de Yarbuh A, Araujo S, Colasante C, Alarcón M, Moreno E, De Ascencao A & Carrasco HJ 2010. Effects of the acute infection by different *Trypanosoma cruzi* strains in rats fetuses. *Rev.Cient. FCV-LUZ.* 20: 353-361.
- Minoprio P, Burlen O, Pereira P, Guilbert B, Andrade L. et al. 1988. Most B cell in acute *Trypanosoma cruzi* infection lack parasite specificity. *Scand. J. Immunol.* 5: 553-561.
- Painemal *et al.*, 2012. Estudio de la patogénesis producida por *Trypanosoma cruzi* en un modelo murino, utilizando la técnica de reacción en cadena de la polimerasa e histopatología en el análisis de diversos tejidos. Depto de medicina preventiva Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile, Santiago, Chile.
- Paredes JL, Moreno E, Premoli G, Alarcón M, Lugo de Larbuh A, Villareal J. et al. 2009. Efecto de la ingestión de una dieta con alto contenido en grasas en ratas Wistar crónicamente infectadas con *Trypanosoma cruzi*. *Kasmera.* 31: 74-98.
- Pedreira de Castro MA. & Brener Z. 1985. Estudo parasitológico, e anatomo-patológico da fase aguda da doença de chagas em caes inoculados com duas diferentes cepas do *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 4: 223-29.
- Silveira, AC. 2002. O controle da doença de Chagas nos países do cone sul da América. Historia de uma iniciativa internacional, 1991-2001. Publ. Pan American Health Organization, Washington, p. 15-44
- Sulbarán D. 2011. Efecto de la ingestión aguda por tripanosoma cruzi sobre la virulencia y patogenecidad en ratones. Trabajo de grado. Facultad de Ciencias. Universidad de los Andes. 40 pp.
- Storino R., Jörg M., Auger S. 2003. Atención médica del paciente chagásico. Manual Práctico, un enfoque biológico, antropológico y social. Editorial Ediprof, Buenos Aires, cap. 1, p. 11-15.
- Villa Villanueva L, Escribáa J. María, Parreño Rodríguez F. 2005. Resultados del tratamiento de la enfermedad de Chagas en menores de 15 años. *Rev Pediatr Aten Primaria* Vol. VII, 7 Supl 1: S 61-76.