

CARACTERIZACIÓN PARASITOLÓGICA, PATOGENICA E INMUNOGENICA DE CEPAS SALVAJES DE *T. cruzi* AISLADAS EN LOS ESTADOS LARA Y YARACUY – VENEZUELA

* Jennifer C. Manzanilla; * Mary C. Díaz; * Johanna K. Plaza; * Heidi C. Quiñonez; * Ivelise C. Tolosa; * Nancy B. Torres; * Rómulo Rodríguez; ** Josefa Alvarez; ** Rafael Bonfante – Cabarcas; *** Carmen Alvarez; *** Claudina Rodríguez.

PALABRAS CLAVE: Caracterización. *Trypanosoma cruzi*. Venezuela.

RESUMEN

Se determinaron las características parasitológicas, patológicas e inmunológicas de cepas salvajes de *T. cruzi*, aislados en los estados Lara y Yaracuy en Venezuela, comparadas con la cepa patrón YBM. La muestra consistió de cuarenta ratas (40) Sprague Dawley de 03 semanas de edad, divididas en 04 grupos de 10 ratas c/u. Cada rata fue inoculada con 100 tripomastigotes metacíclicos/gr. peso del animal, vía intradérmica. Cada grupo fue tratado con una cepa diferente, cuya identificación y procedencia era desconocida para los investigadores (método doble ciego). La parasitemia fue evaluada cada semana por 8 semanas mediante un Hemocitómetro. La integridad del Sistema Nervioso Autónomo (SNA) y de la funcionalidad cardíaca fue evaluada mediante estudios electrocardiográficos realizados antes y después de administrar Fenilefrina 1mg/Kg. Se realizaron tres estudios electrocardiográficos: animal sano (pre – inoculación), etapa aguda (4 semanas post – inoculación) y etapa subaguda (9 semanas post – inoculación). La inmunogenicidad fue medida a los dos meses post inoculación, mediante la titulación de anticuerpos tipo IgG anti-*T. cruzi* y mediante Hipersensibilidad retardada. Nuestros estudios revelaron que la cepa Cauderales mostró la mayor ($p < 0.05$) parasitemia comparadas con las cepas Nirgua y YBM, las cuales mostraron niveles menores de parasitemia; Guariquito no indujo parasitemia. La cepa de Nirgua fue la que evidenció una mayor inmunogenicidad de tipo humoral ($p < 0.05$) y una mayor alteración del SNA reflejado por un aumento significativo de la respuesta bradicardizante en el periodo agudo y una respuesta taquicardizante significativa en el periodo subagudo ante la administración de FE. Cauderales mostró una inmunogenicidad humoral similar a YBM y no presentaron alteraciones en el SNA. Guariquito no mostró respuesta inmune humoral, sin embargo; presentaron alteraciones en el SNA. La hipersensibilidad retardada fue similar para todas las cepas y no se observaron diferencias significativas en los parámetros electrocardiográficos. En conclusión el presente trabajo demuestra que las cepas circulantes en Lara y Yaracuy son diferentes a YBM.

KEY WORDS: Characterization. *Trypanosoma cruzi*. Venezuela.

ABSTRACT

Parasitologic, pathogenic and immunogenic's *T. cruzi* characteristics were determined from wild strains isolated from vectors and reservoirs in the states of Lara and Yaracuy at Venezuela, as compared with the already characterized YBM stock. Sample consisted of forty 03 weeks of age- Sprague Dawley rats, divided in 04 groups of 10 rats each. Rats were inoculated with 100 metacyclic trypomastigotes per gr. of the animal, via intradermic. Each group was inoculated with a different strain, whose identification and origin of both were not known by researchers (double blind trial). Blood parasite levels were evaluated every week for 8 weeks using an hemocitometer. Autonomic nervous system (ANS) and cardiac functionality were evaluated by means of electrocardiographic studies made before and after fenilefrine administration at doses of 1mg/Kg. Three electrocardiographic studies were made: when animals were healthy (pre-inoculation), in the acute stage (4 weeks post-inoculation) and in subacute stage (9 weeks postinoculation). The immunogenicity was measured 2 months after inoculation, by measuring the levels of IgG serum anti-*T. cruzi* antibodies and retarded hypersensitivity. Our results revealed that Cauderales' strain displayed greater blood parasite levels ($p < 0,05$) as compared with Nirgua's and YBM's strains, which shown the smallest blood parasite levels; Guariquito's did not induce any parasitemia. Nirgua's strain displayed greater humoral type immunogenicity and a greater alteration of the ANS as compared with YBM's strain, reflected by a significant increase of the fenilefrine induced-bradycardia in the acute period of the disease and a significant tachycardia in the subacute period of the disease. Cauderales' showed an humoral immunogenicity similar to YBM and they did not display alterations in the ANS. Guariquito's did not show any humoral immune response, nevertheless; they presented alterations in the ANS. Retarded hypersensitivity was similar for all the stains and significant differences in the electrocardiographic parameters were not observed. In conclusion the present study demonstrates that circulating *T. cruzi* strains in Lara and Yaracuy are different from YBM.

* Departamento de Medicina Preventiva – Medicina Integral del Medio Urbano. Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado – Barquisimeto, Venezuela.

** Unidad de Bioquímica. Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado – Barquisimeto, Venezuela.

*** Unidad de Parasitología Médica. Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado – Barquisimeto, Venezuela.

Autor Responsable: Jennifer C. Manzanilla. Correo electrónico: jenifermanzanilla@intercable.net.ve

INTRODUCCIÓN

La Tripanosomiasis Americana es una zoonosis ocasionada por el protozooario denominado *Tripanosoma cruzi*. Este se encuentra por todo lo largo y ancho de América. En Latinoamérica ocupa el primer lugar entre las enfermedades tropicales y el cuarto lugar entre las enfermedades transmisibles según la OPS. En Venezuela la población expuesta a riesgo, es de 7.000.000 millones de personas (1).

La Enfermedad de Chagas es un problema de salud pública debido a su alta incidencia y prevalencia, estrechamente ligada a malas condiciones de vida de la población y es responsable de una pérdida económica importante para los países endémicos, por esto es necesario profundizar en investigaciones basadas en esta enfermedad.

Las poblaciones de *T. cruzi* muestran considerable heterogeneidad genética demostrada por la variabilidad entre la morfología de las cepas, resistencia a drogas, patogenicidad o entre sus clones estables y salvajes que han sido demostrados en diversos estudios (2,3). Métodos de caracterización morfológica, bioquímica y/o molecular han sido empleados para agrupar y caracterizar las diversas poblaciones de parásitos y los resultados de estas investigaciones han sido utilizados en estudios clínicos y epidemiológicos para determinar la posible relación entre cepas del parásito y las características de la enfermedad del Chagas (4).

El análisis de isoenzimas fue el primer abordaje de caracterización bioquímica de las cepas de *T. cruzi* llevado a cabo por Miles y colaboradores (1980), el cual permitió identificar la existencia de tres zimodemos (Z1, Z2 y Z3). Los denominados zimodemos expresan una parte del constituyente genético del *T. cruzi* (2). Posteriormente se clasificó estas formas biológicas en biodemos de los tipos I, II y III; estando los biodemos II y III correlacionados con los zimodemos Z2 y Z3, mientras que el biodemo tipo I mostró un perfil electroforético no descrito anteriormente e identificado subsecuentemente como Z2b (5). Otros trabajos clasifican al *T. cruzi* en grupos 1, 2 y ½ (6).

Debido a esta gran diversidad se hace necesario profundizar en estudios que vinculen la patogenia y la clínica, de manera tal que se pueda establecer el comportamiento biológico de las cepas de *T. cruzi*. Por ende se planteó como objetivo general de este proyecto: determinar las características parasitológicas, patogénicas e inmunogénicas de las cepas salvajes de *T. cruzi* aisladas en los estados Lara

y Yaracuy comparadas con cepas patrón YBM en ratas Sprague Dawley. Esto sirve como estudio base para la pronta identificación de la variabilidad genética y análisis isoenzimático de las poblaciones naturales del parásito y a su vez correlacionarlo con los ciclos epidemiológicos, sintomatología clínica, patogenicidad, susceptibilidad o resistencia al tratamiento, lo que permitirá la creación y aplicación de quimioprofilaxis efectivas, incluso la elaboración de pruebas diagnósticas más específicas y más adelante la creación de vacunas. Es importante destacar que este es el primer proyecto realizado en la región que intenta realizar la caracterización de cepas de *T. cruzi* con fines preventivos de carácter prospectivo.

MATERIALES Y METODOS

Muestra: 40 ratas Sprague Dawley de 3 semanas de edad, divididas en 4 grupos. Cada grupo fue inoculado por una de 4 cepas: 1) YBM, cepa de referencia, aislada en los llanos venezolanos y caracterizado por Moreno y colaboradores (7); 2) Cauderales, cepa aislada del vector *Triatoma maculata* en Cauderales, Municipio Urdaneta, Estado Lara; 3) Nirgua, cepa aislada del vector *Panstrongylus geniculatus* en Nirgua, Municipio Nirgua, Estado Yaracuy; 4) Guariquito, cepa aislada del reservorio cachicamo en Guariquito, Municipio Morán, Estado Lara.

Infectividad. Fue evaluada semanalmente en un Hemocitómetro a partir de una gota de sangre tomada de la porción distal de la cola.

Estudios electrocardiográficos. Se realizaron tres estudios electrocardiográficos: Antes de inocular al animal, a la cuarta semana post – inoculación y a la novena semana post – inoculación. Cuatro registros fueron realizados en cada período bajo anestesia general con Pentobarbital (60 mg/Kg.): un registro basal al tiempo 0 y tres registros a los 10 min., 20 min. y 40 min. posteriores a la administración de Fenilefrina (1 mg/kg). Se midieron la frecuencia cardíaca, los intervalos RR, PR, QRS y QT y se determinó la presencia de alteraciones en la morfología de las ondas P, QRS y T. Estos estudios permitieron valorar la funcionalidad cardíaca y la integridad del Sistema Nervioso Autónomo. La respuesta bradicardizante inducida por Fenilefrina fue expresada en porcentaje de acuerdo a la siguiente ecuación: $1 - (\text{FcF} / \text{FcB}) \times 100$, donde **FcF** significa frecuencia cardíaca inducida con Fenilefrina, **FcB** significa frecuencia cardíaca basal en ausencia de Fenilefrina.

Inmunogenicidad. Medida a las 9 semanas post – inoculación a través de dos procedimientos: titulación de anticuerpos tipo Ig G anti – *T. cruzi* mediante la técnica de inmunofluorescencia indirecta utilizando antígenos homólogos según Camargo (1988) (8) e hipersensibilidad retardada medida a las 48 y 72 horas después de administrar 10 μ grs de proteína de promastigotos homólogos.

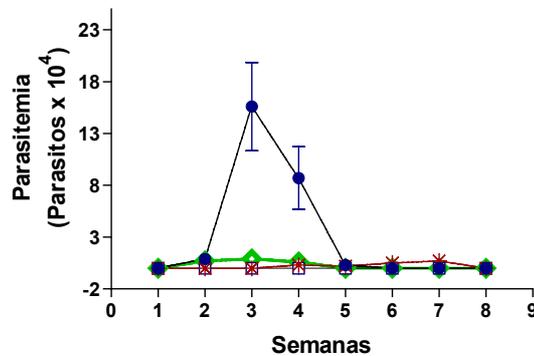
RESULTADOS

En el gráfico 1 se muestra la parasitemia observada en el transcurso de 8 semanas. En las ratas inoculadas con YBM se observó un periodo prepatente de una semana, una patencia de 4 semanas y un pico máximo de parasitemia a la tercera semana, alcanzando un promedio de 9000 ± 3700 parásitos/ml. Cauderales mostró comportamiento similar a YBM en cuanto al período prepatente, sin embargo, su parasitemia fue significativamente mayor ($p < 0.05$) que YBM, con un promedio de 156.000 ± 42.600 parásitos/ml y su patencia se mantuvo hasta la quinta semana. Las cepas de Nirgua y Guariquito, presentaron comportamientos diferentes a YBM. La primera con una prepatencia de 3 semanas, una patencia de 5 semanas y un nivel máximo de parasitemia a la séptima semana con promedio de 7.000 ± 4.200 parásitos/ml. La cepa de Guariquito no desarrolló parasitemia

En el gráfico 2 se muestran los títulos de anticuerpos (IgG) anti *T. cruzi* observados en los diferentes grupos. La cepa YBM fue seropositiva, mostrando títulos inversos de IgG iguales a $73,60 \pm 12,67$ diluciones, mientras que Cauderales presentó títulos de $124,80 \pm 48,75$ diluciones, sin embargo, estos valores a pesar de ser más elevados no son estadísticamente significativos ($p > 0.05$) con respecto a YBM. Nirgua fue la que indujo una mayor inmunidad humoral ($p < 0.05$), presentando títulos $211,20 \pm 57,85$ diluciones. Por otra parte la cepa proveniente de Guariquito no presentó títulos de anticuerpos.

Gráfico No. 1

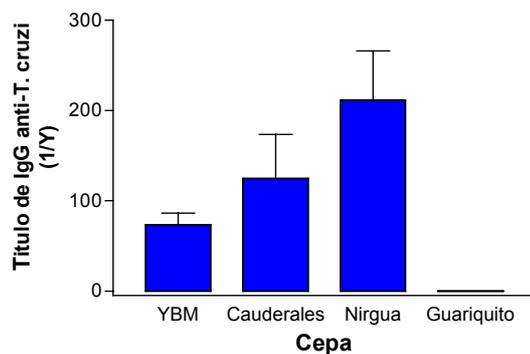
Perfil de Parasitemia en ratas Sprague Dawley infectadas con cepas salvajes de *T. cruzi*.



Los resultados se obtuvieron a partir de la medición semanal mediante un hemocitómetro. La cepa YBM (\diamond) obtuvo un período prepatente de dos semanas, una patencia entre la segunda y quinta semana, con un pico máximo a la tercera semana. La cepa proveniente de Cauderales (\square) mantuvo un comportamiento similar a YBM, sin embargo, su parasitemia alcanzó mayores niveles significativamente mayores ($p < 0.05$) al compararla con los demás grupos. Nirgua (*) presentó un período prepatente de cuatro semanas y un pico máximo de parasitemia a la séptima semana. Guariquito (\square) no desarrolló parasitemia. Estos resultados demuestran que Cauderales es la cepa más infectiva.

Gráfico No. 2

Títulos de Anticuerpos (IgG) anti *T. cruzi*, en ratas sprague Dawley infectadas con diferentes cepas de *T. cruzi*.

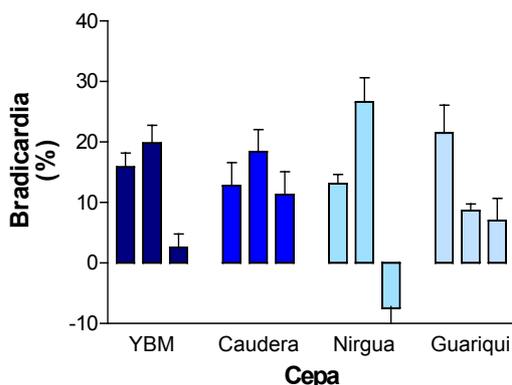


Los datos expresan el promedio \pm error estándar de los títulos de anticuerpos (IgG) anti-*T. cruzi* obtenidos a las nueve semanas post – inoculación con cuatro cepas diferentes de *T. cruzi* a través de la técnica de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) en ratas. La cepa de Nirgua fue la que indujo una respuesta inmune significativamente mayor ($p < 0.05$).

Los resultados de la evaluación electrocardiográfica del SNA son mostrados en el gráfico 3. La bradicardia inducida por Fenilefrina es mostrada en valores porcentuales (ver materiales y métodos). En las ratas inoculadas con la cepa YBM alcanza en su período de preinoculación un promedio de $15.9 \pm 2,31$ %, en el período agudo $19.8 \pm 2.9\%$ y para el subagudo un $2.6 \pm 2,2\%$, la respuesta bradicardizante en el periodo subagudo fue significativamente menor ($p < 0.05$) al compararla con el periodo preinoculación. En las ratas inoculadas con la cepa Cauderales la bradicardia fue del 12.8 ± 3.8 % en el período preinoculación, 18.4 ± 3.7 % en el período agudo y 11.3 ± 3.8 % en el periodo subagudo, no existiendo diferencia significativas entre los diferentes periodos. En las ratas inoculadas con la cepa Nirgua se observó una bradicardia del 13.1 ± 1.6 % para el período preinoculación, observándose un incremento significativo ($p < 0.05$) de la respuesta bradicardizante en el período agudo con valores 26.6 ± 4 %, para luego manifestar una respuesta taquicardizante significativa ($p < 0.05$) con valores de 7.4 ± 5.8 % en el periodo subagudo. En las ratas inoculadas con la cepa Guariquito en su etapa de preinoculación alcanza un promedio de bradicardia de 21.5 ± 4.6 %, en el período agudo disminuye su respuesta bradicardizante a 8.6 ± 1.1 %, manteniendo ésta en el periodo subagudo con un valor de $7,0 \pm 3.7$ %, evidenciándose una diferencia significativa ($p < 0.05$) entre el período de preinoculación y las dos últimas etapas.

Gráfico No. 3

Bradicardia inducida por Fenilefrina en diferentes etapas de la Enfermedad de Chagas en ratas Sprage Dawley infectadas con diferentes cepas de *T. cruzi*.



Se realizaron registros electrocardiográficos en diferentes etapas del experimento (ver materiales y métodos), animales

sanos (preinoculación; barras de la izquierda), animales en la etapa aguda (barra central) y animales en la etapa subaguda (barra de la derecha). Los resultados son presentados con el porcentaje de Bradicardia (ver materiales y métodos). Obsérvese que la cepa de Nirgua indujo una bradicardia significativamente mayor ($p < 0.05$) en la etapa aguda y una respuesta taquicardizante de carácter significativo ($p < 0.05$) en la etapa subaguda.

DISCUSIÓN

En este trabajo se caracterizan 3 cepas de *T. cruzi* provenientes de regiones endémicas de los estados Lara y Yaracuy. Las cepas fueron obtenidas de los vectores *Triatoma maculata* y *Pastrogylus geniculatus* y del reservorio cachicamo, repicadas secuencialmente en ratones NMRI y en el vector *Rhodnius prolixus*, por lo tanto, a pesar de tener diferentes orígenes, fueron homogeneizadas al infectar hospederos y vectores similares, en consecuencia podríamos sugerir que las variaciones observadas representan diferencias adjudicables a la naturaleza de la cepa.

Estudios previos realizados para caracterizar la cepa YBM han mostrado una infección caracterizada por un periodo prepatente de 12 días, un periodo de patencia de 30-45 días y un pico de parasitemia entre los 18 y los 24 días con un nivel de parasitemia entre 200 y 350 parásitos/ml (4,7). En concordancia con tales estudios, la cepa YBM en nuestras condiciones experimentales se observaron resultados similares para los periodos prepatente y patente y del pico de parasitemia (ver resultados y gráfico 1), sin embargo; se obtuvieron niveles de parasitemia muy superiores alcanzando valores de 9.000 parásitos/ml. Esta diferencia podría ser atribuible al menor inóculo utilizado y a la especie de animal utilizado.

Desde el punto de vista inmunogénico, ha sido reportado que la respuesta humoral inducida por YBM es detectable a los 10 a 12 días post – inoculación, alcanzando los máximos valores entre los 24 y 90 días, con títulos entre 1:2048 y 1:4096 (4,7). Por contraste los niveles de anticuerpos detectados en nuestro trabajo fue menor posiblemente debido a la especie utilizada y a metodología utilizada para detectar los anticuerpos.

La cepa proveniente de Cauderales desde el punto de vista parasitológico, exhibió semejanzas en cuanto a su periodo prepatente y pico máximo de parasitemia con respecto a la cepa control con niveles máximos de parasitemia de 156.000 parásitos/ml de sangre, lo que sugiere que Cauderales es más infectiva que YBM y que el

resto de las cepas estudiadas. Electrocardiográficamente no presento diferencias con respecto a YBM y no indujo daños en el SNA. Desde el punto de vista de inmunidad humoral, a pesar de ser mayor su respuesta, la variabilidad entre individuos no permitió obtener una diferencia estadísticamente significativa. La respuesta inmune celular de esta cepa fue mayor (mas no significativa) que YBM en las dos lecturas realizadas (48 – 72 horas).

La cepa proveniente de Nirgua tuvo un período prepatente prolongado y un pico de parasitemia retrasado similar al de la cepa GBA proveniente de Quebrada Seca (Barinas) (4), obteniendo una máxima cantidad de parásitos de 7.000 parásitos/ml de sangre, lo que indica que su infectividad es similar a YBM. En cuanto a la inmunidad de tipo humoral esta cepa fue la que obtuvo mayores títulos representado por un promedio de 1:211,2 y diluciones que van desde 1:64 a 1:512. La cepa de Nirgua fue la que indujo mayor daño al SNA, esto puede relacionarse con la mayor respuesta humoral que indujo esta cepa y de acuerdo a la teoría neurogénica podría explicar el daño inducido al SNA en la etapa subaguda (9,10). Sin embargo, en el periodo agudo de la enfermedad se observó una supersensibilidad vagal, lo cual sugiere que existen anticuerpos capaces de interactuar con receptores colinérgicos, lo cual potencia el efecto de la acetilcolina liberada por el nervio vago. En concordancia con este planteamiento ha sido reportado la existencia de anticuerpos en sueros de pacientes y animales con Enfermedad de Chagas capaces de interactuar con los receptores colinérgicos e inducir un efecto agonista (11). Este efecto farmacológico precedería al efecto citotóxico.

La cepa proveniente de Guariquito presentó un comportamiento atípico debido a que no mostró parasitemia, ni evidenció respuesta humoral; sin embargo, produjo cambios en la respuesta posterior a la administración de fenilefrina y mostró hipersensibilidad retardada. Estos resultados podrían estar relacionados con la naturaleza de la cepa y del hospedero y del antígeno utilizado para la prueba de hipersensibilidad retardada

En conclusión: Los tres aislados son diferentes desde el punto de vista biológico, siendo la cepa de Cauderales la más infectiva, la cepa de Nirgua la más patógena e inmunogénica y la cepa de Guariquito la menos infectiva e inmunogénica, indicando que los tres aislados son diferentes entre sí y a YBM.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por el proyecto “Una Visión Integral de la Enfermedad de Chagas en los estados Lara y Yaracuy”, en el marco de los proyectos integrales auspiciados por el Vicerectorado Académico de la Universidad Centroccidental “Lisandro Alvarado” (UCLA) a través de las direcciones de Postgrado, Extensión y el CDCHT, así como por el FONACIT proyecto S1-20010034. Nuestro agradecimiento al Dr. Nestor Añez, por habernos cedido la cepa YBM.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. RASSI, A.; TRANCHESI, J. Y TRANCHESI, B. Doença de Chagas. En Doenças Infecciosas Parasitárias. 8va Edición. Veronesi, A. Guanabara Koogan. Río de Janeiro. Pags: 674 - 705. 1991.
2. MILES, M.; LANHAM, S.; DE SOUSA, A.; POVOA, M.; Further Enzymatic Characters of *Trypanosoma cruzi* and their evaluations for strains identification. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. & Hyg.; 74: 221 – 237. 1980
3. TYBARENCE, M.; WARD, P.; MOLLA, A.; AYALA, F. Natural populations of *Trypanosoma cruzi* the agent of Chagas Disease, have a complex multiclonal structure. Prog. Natl. Acad. Sci.; 83: 115 – 119. 1986.
4. RIVERA, I.; MORENO, E.; GONZÁLEZ, N.; DE YARBUH, A. Caracterización de aislados de *Trypanosoma cruzi* del occidente de Venezuela. Rev. Ecol. Lat. Am.; 7: 01- 10. 2000
5. ZINGALES, B.; STOLF, B.; SOUTO, R.; FERNANDES, O.; BRIONES, M. Epidemiology, biochemistry and evolution of *Trypanosoma cruzi*; lineages based on ribosomal RNA sequences. Mem Inst Oswaldo Cruz, 94: 159-164. 1999
6. ANDRADE S. *Trypanosoma cruzi*: Clonal structure of parasite strains and the importance of principal clones. Mem Inst Oswaldo Cruz. 94: 185 – 187. 1999
7. MORENO, E.; GONZÁLEZ, N.; RIVERO, I.; GUILLÉN, B.; LUGO, A.; AÑEZ, N. Caracterización biológica e isoenzimática de aislados de *T. cruzi*. Boletín de Malariología y Saneamiento Ambiental. XLII: 17 – 28. 2002
8. CAMARGO, M.E. American tripanosomiasis (Chagas' disease). En: Laboratory diagnosis of infectious disease: principle and practice. Edit: Ballows, A.; Hausler, W. and Lennete E. New York., 1: 774-783. 1988.

9. KOBERLE, F. Chagas' Heart disease. Pathology. Cardiology. 52:82-90.1968
10. DÁVILA, D.F.; ROSELL, R.O. Y DONIS, J.H. Cardiac parasympathetic abnormalities: cause or consequence of chagas' heart disease?. Parasitology Today, 5:327-329.1989
11. FARIAS DE OLIVEIRA, S.; PEDROSA, R.C.; NASCIMENTO, J.H.M.; CAMPOS DE CARVALHO, A. C. y MASUDA, M.O. Sera from chronic chagasic patients with complex arrhythmias depress electrogenesis and conduction in isolated rabbit hearts. Circulation 96: 2031 – 2037. 1997