



# Signos y alteraciones histopatológicas en *Mus Musculus* BALB/c infectados con *Trypanosoma cruzi* procedente de Arequipa y de Amazonas (Perú)

Signs and histopathological alterations in *Mus Musculus* BALB/c infected with *Trypanosoma cruzi* from Arequipa and Amazonas (Peru)

Angie Saguma<sup>1</sup>, Ana Ñazco<sup>1</sup>, Diana Maldonado<sup>1</sup>, Karla Arteaga<sup>1</sup>, Belén Ramírez<sup>1</sup> y Hermes Escalante<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Escuela AP de Microbiología y Parasitología. Universidad Nacional de Trujillo (UNT. Trujillo. Perú.

<sup>2</sup>Departamento de Microbiología y Parasitología. UNT

## RESUMEN

Se determinó a los signos y alteraciones histopatológicas producidos por dos cultivos de *Trypanosoma cruzi*, uno procedente del Departamento de Arequipa (C-Areq) ubicado en el sur del Perú y otro del Departamento de Amazonas (C-Utc) ubicado en el norte peruano en *Mus musculus* BALB/c. Los epimastigotes mantenidos en medio bifásico BHI/PYLB se subcultivaron en medio Grace's Insect para obtener los tripomastigotas metacíclicos. Se utilizaron 22 ejemplares de *M. musculus* BALB/c: 10 se inocularon con C-Areq, 10 con C-Utc y 2 fueron inoculados con SSF (testigo). Se evaluó los niveles de parasitemia, y los signos y alteraciones histopatológicas en el modelo animal. A los 20 días post inoculación (pi), se encontró niveles de parasitemia de  $6,6 \times 10^7$  tripomastigotas sanguíneos de la población C-Areq, cifra superior a la alcanzada por la población C-Utc ( $1,7 \times 10^6$ ) en el mismo periodo. El estudio histopatológico del encéfalo de ratones inoculados con ambas poblaciones del protozoo mostró, edema, congestión vascular, células gliales, necrosis y grupos (nidos) de amastigotas de *T. cruzi*; del miocardio, también grupos de amastigotes, edema, congestión vascular, hemorragia y necrosis y del hígado se observó una marcada congestión vascular y balonamiento. La totalidad de los ratones del grupo experimental inoculados con tripomastigotes de *T. cruzi* procedentes de Arequipa, presentaron diferente comportamiento en relación al ratón control. Se observó erizamiento del pelo, agitación y parálisis de extremidades inferiores, muriendo la totalidad de ejemplares, sin embargo, en los ratones inoculados con la población de *T. cruzi* C-Utc no apareció el erizamiento del pelo, pero sí se observó agitación de los ejemplares, muriendo la totalidad de ellos.

**Palabras clave:** Parasitemia, signos, alteraciones histopatológicas, *Mus musculus* BALB/c, *Trypanosoma cruzi*

## ABSTRACT

Signs and histopathological alterations produced by the inoculation of two *Trypanosoma cruzi* cultures, one from the Department of Arequipa (C-Areq) located at South of Peru, and another from the Department of Amazonas (C-Utc) located at Northern in *Mus musculus* BALB/c under experimental conditions. Epimastigote were maintained in BHI/PYLB medium from which they subcultured in Grace's Insect medium supplemented to generate metacyclogenesis were made. Twenty-two specimens of *M. musculus* BALB/c were used, of which 10 were inoculated with C-Areq metacyclic trypomastigotes, 10 with C-Utc metacyclic trypomastigotes and 2 were inoculated with SSF (control). 20 days post inoculation (pi), found levels of parasitemia in the animal model used of  $6,6 \times 10^7$  blood tripomastigotes of the population C-Areq, a figure higher than that achieved by the population C-Utc ( $1,7 \times 10^6$ ) in the same period. Histopathological study of the brain of mice inoculated with both populations of the Protozoan showed, oedema, vascular congestion, cell glial, necrosis and groups (nests) of amastigotes of *T. cruzi*; myocardial, groups of amastigotes, oedema, vascular congestion, haemorrhage and necrosis and liver was also observed a marked vascular congestion and reg. All of the experimental group mice inoculated with tripomastigotes of *T. cruzi* from Arequipa, showed different behavior in relation to the mouse control. Was bristling of hair, agitation, and paralysis of lower extremities, dying all copies, however, in mice inoculated with the population of *T. cruzi* C-Utc did not appear the hair bristling, but yes there was agitation of the specimens, and death all of them.

**Keywords:** signs, histopathological alterations, *Mus musculus* BALB / c, *Trypanosoma cruzi*.

## INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas, producida por el parásito *Trypanosoma cruzi*, es transmitida por vectores conocidos como triatominos, que están ampliamente distribuidos en todo el territorio peruano<sup>1</sup>. Se estima que en el Perú existen 621 000 personas infectadas por *T. cruzi* y una de las áreas endémicas de mayor importancia en la región sudoccidental es Arequipa, de donde provienen más del 80% de los casos reportados al sistema de vigilancia epidemiológica del Ministerio de Salud (MINSU)<sup>2</sup>.

Recientemente se está informando un número creciente de casos agudos de la enfermedad de Chagas en los países amazónicos<sup>3</sup>. En cambio en la región amazónica del Perú se han registrado pocos casos humanos; no obstante, investigaciones efectuadas en las dos últimas décadas han permitido conocer que existen alrededor de 18 especies de triatominos en esta área, lo cual hace dudosa la poca incidencia de casos, que hace pensar que este padecimiento no es una afección de importancia para la salud; por lo tanto, éstas cifras pueden relacionarse con el hecho de que: a) no se establece un diagnóstico adecuado en los servicios de salud sean públicos o privados, dado que la enfermedad se puede confundir con otras anomalías; b) no se considera dentro de los diagnósticos diferenciales de los pacientes, o c) no se usan métodos diagnósticos más sensibles y específicos<sup>4</sup>.

Estudios realizados sobre los niveles de parasitemia en modelos murinos infectados con *T. cruzi* muestran una gran variación respecto a los datos obtenidos, es decir se extiende desde  $1 \times 10^4$  hasta  $1 \times 10^7$ , esto depende de la concentración de parásitos/mL en el inóculo y de la virulencia del cultivo de *T. cruzi*<sup>7</sup>.

El conocimiento de la parasitemia resulta importante, porque las diferencias en cuanto al comportamiento patogénico de las distintas cepas, podría correlacionarse con el curso de la enfermedad en humanos<sup>7</sup>.

Se evaluó los signos, niveles de parasitemia y alteraciones histopatológicas producidas en el cerebro, hígado y corazón de *M. musculus* BALB/c en el curso de una infección experimental con *T. cruzi* procedente de los departamentos de Arequipa y Amazonas.

Los cultivos de Arequipa y Amazonas fueron escogidos por la sencilla razón que Arequipa es la zona con mayor número de casos severos en el Perú y Amazonas es una región que cuenta con muchos vectores triatominos pero no reporta casos nuevos con mucha frecuencia, y que quizá si existan personas portadoras de *T. cruzi* pero con signos imperceptibles.

Los signos y alteraciones histopatológicas presentes en *Mus musculus* BALB/c inoculados con *Trypanosoma cruzi* procedentes de Arequipa y Amazonas presentan diferencias notables.

Se buscó determinar la diferencia de los signos y alteraciones histopatológicas que produce *T. cruzi* y comprobar la variabilidad intraespecífica patogénica que presenta.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Animales de experimentación:

Se utilizaron 22 ejemplares de *Mus musculus* BALB/c isógenos machos, de 21 días de edad, obtenidos del Bioterio del Instituto Nacional de Salud. Dos de ellos se utilizaron como control y los otros 20 restantes se dividieron en dos grupos de 10 que conformaron los grupos experimentales.

### Parásitos:

Se utilizaron dos cultivos de *T. cruzi* uno proveniente de Arequipa y otro proveniente de Amazonas, los que fueron proporcionados por la Unidad de Investigación y producción de Escacorp SRL de Trujillo, en la forma de epimastigotas con los códigos C-Areq S01 y C-Uct A04, en medio BHI.

### Cultivo de epimastigotes de *T. cruzi*

Las formas epimastigotes de *T. cruzi* proporcionadas fueron cultivadas en 20 tubos de 25x150mm, estériles, con medio bifásico constituido por BHI, fase sólida, y PYLB fase líquida. La siembra se hizo a partir de dos tubos procedentes del mantenimiento de la cepa, a razón de 0.5 mL por tubo.

### Metaciclización in vitro de *T. cruzi*.

A partir de un lote, después de 15 días de cultivo, se extrajeron los medios líquidos en tubos estériles de 13x100mm, para luego centrifugarlos a 4000 rpm por 5 min. Inmediatamente después, se descartó el sobrenadante de cada tubo y los precipitados se reagruparon en un solo tubo hasta formar aprox. 2mL. Se realizó dos procesos de lavado con PBS estéril y un tercer lavado con PBS estéril

suplementado con Bencil Penicilina y Gentamicina. Los epimastigotes, obtenidos del sedimento, fueron cultivados en el medio Grace's Insect suplementado al 20% con SBF y con Penicilina G sódica y Gentamicina. Con motivo de evaluar la viabilidad de los epimastigotes, se realizó un recuento de parásitos en la cámara hematocitométrica.

#### **Inoculación de tripomastigotes de *T. cruzi*.**

De la suspensión que se obtuvo de tripomastigotes metacíclicos se inoculó 0.2 mL ( $5 \times 10^7$  parásitos/mL) vía intraperitoneal a 20 especímenes machos de *Mus musculus* Balb/c. De los 20 especímenes, 10 de ellos fueron inoculados con el cultivo de Arequipa y 10 con el cultivo de Amazonas. Dos ratones control se inocularon, por la misma vía, con 0,2 mL de solución salina fisiológica.

#### **Evaluación de signos y de las alteraciones histopatológicas**

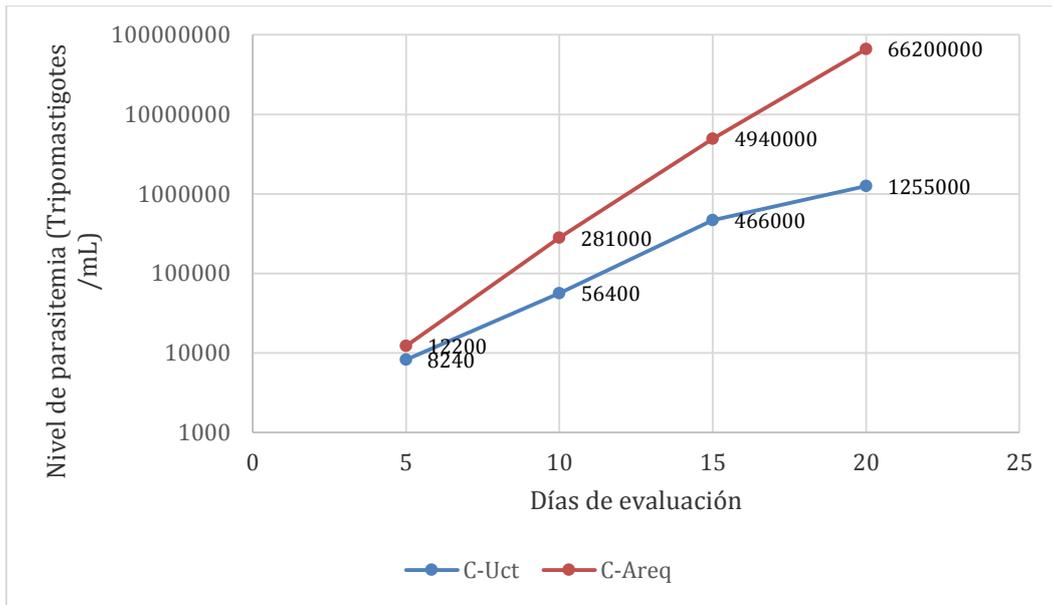
Durante el transcurso de la experiencia se observó la manifestación de los signos clínicos en fase aguda evidentes a simple vista, tales como: erizamiento de pelo, agitación y parálisis de extremidades posteriores. Además, se determinó los niveles de parasitemia en la cámara hemacitométrica al 5°, 10°, 15° y 20° día de la inoculación. También se evaluó la fase crónica de la enfermedad, reflejada en las alteraciones histopatológicas desarrolladas en los especímenes. Los ratones que murieron de manera natural fueron necrosados inmediatamente para la preservación de sus tejidos en solución de formol al 4%. Al cumplirse los 35 días post infección los ratones sobrevivientes se sacrificaron y fueron necrosados para extraer el encéfalo, hígado y el corazón para observar las alteraciones histopatológicas.

## **RESULTADOS**

A los 20 días post inoculación (pi), se encontró niveles de parasitemia en el modelo animal empleado de  $6,6 \times 10^7$  tripomastigotas sanguíneos de la población C-Areq, cifra superior a la alcanzada por la población C-Uct ( $1,7 \times 10^6$ ) en el mismo periodo (Fig. 1).

El estudio histopatológico del encéfalo de ratones inoculados con ambas poblaciones del protozoario mostró, edema, congestión vascular, células gliales, necrosis y grupos (nidios) de amastigotas de *T. cruzi*. (Fig. 2); del miocardio, también grupos de amastigotes, edema, congestión vascular, hemorragia y necrosis (Figs. 3 y 5) y del hígado se observó una marcada congestión vascular y balonamiento (Figs. 4 y 6).

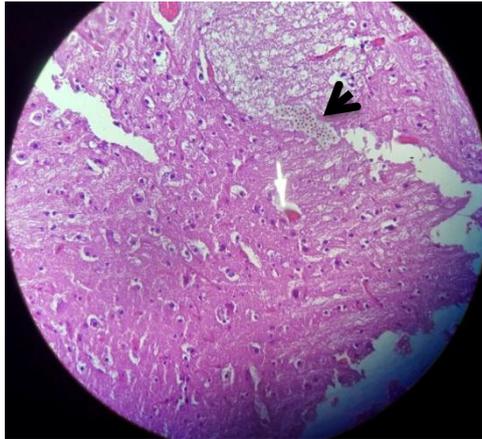
La totalidad de los ratones del grupo experimental inoculados con tripomastigotes de *T. cruzi* procedentes de Arequipa, presentaron diferente comportamiento en relación al ratón control. Se observó erizamiento del pelo, agitación y parálisis de extremidades inferiores, muriendo la totalidad de ejemplares, sin embargo, en los ratones inoculados con la población de *T. cruzi* C-Uct no apareció el erizamiento del pelo, pero sí se observó agitación de los ejemplares, meriendo a la totalidad de los ejemplares (Tabla 1).



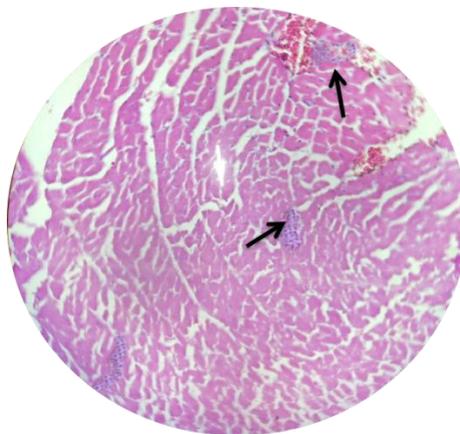
**Fig. 1.** Niveles de parasitemia en *Mus musculus* BALB/c infectado experimentalmente con *Trypanosoma cruzi* procedente de Arequipa (C-Areq) y de Amazonas -C-Utc- (Perú).

**Tabla 1.** Niveles de parasitemia y signos observados en *Mus musculus* BALB/c infectados experimentalmente con *Trypanosoma cruzi* procedente de Arequipa (C-Areq) y de Amazonas -C-Utc- (Perú)

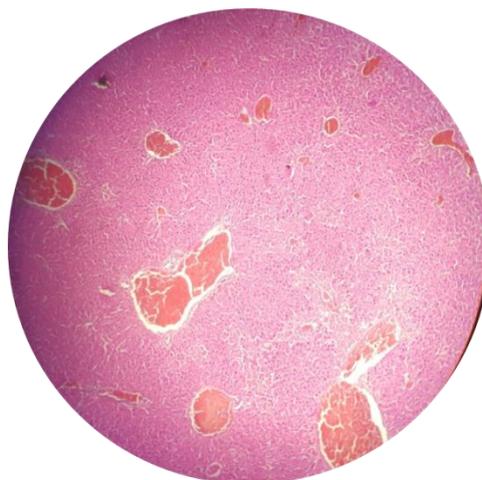
Días	Cultivo Arequipa C-Areq S01		Cultivo Amazonas C-Amaz A04	
	Nivel de Parasitemia (tripomastigotes/mL)	Signos	Nivel de Parasitemia (tripomastigotes/mL)	Signos
00	0	Ninguno	0	Ninguno
05	12200	Erizamiento Agitación	8240	No erizamiento
10	281000	Agitación	56400	Agitación
15	4940000	Incontinencia	466000	-
20	66200000	2: Parálisis de extremidades inferiores	1255000	-
25	-	2: Muerte	-	-
30	-	3: Muerte	-	-



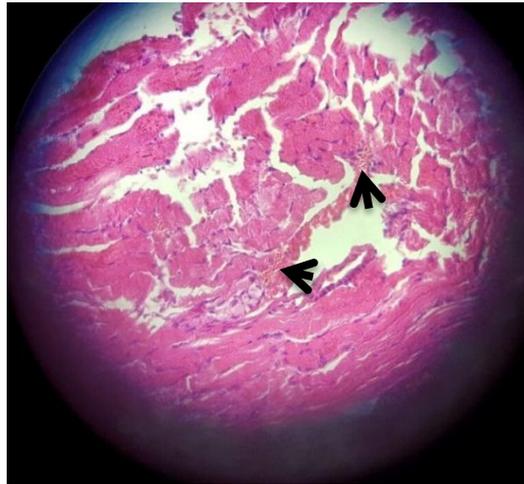
**Fig. 2.** Corte histológico de cerebro de *Mus musculus* BALB/c inoculado experimentalmente con un cultivo de Arequipa. Se observan áreas con edema (flecha blanca), congestión, gliosis, necrosis y nidos de amastigotes de *T. cruzi* (flecha negra)



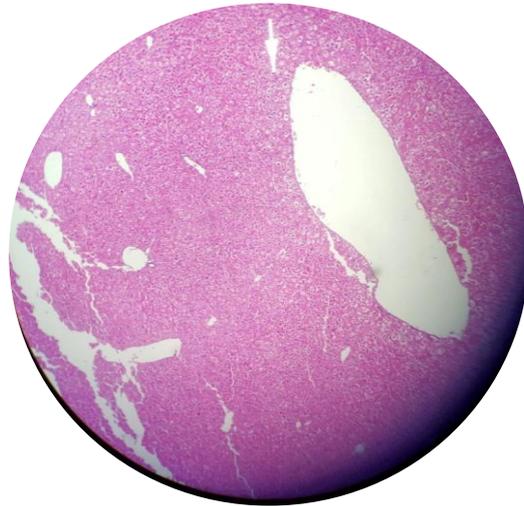
**Fig. 3.** Corte histológico de tejido cardíaco de *Mus musculus* BALB/c inoculado experimentalmente con un cultivo de Arequipa. Se observan áreas de edema, congestión, hemorragia, necrosis (flecha blanca) y nidos de amastigotes de *T. cruzi* (flecha negra)



**Fig. 4.** Corte histológico de hígado de *Mus musculus* BALB/c inoculado experimentalmente con un cultivo de Arequipa. Se observa marcada congestión vascular.



**Fig. 5.** Corte histológico de tejido cardíaco de *Mus musculus* BALB/c inoculado experimentalmente con un cultivo de Amazonas. Se observan áreas con edema, congestión vascular y nidos de amastigotes de *T. cruzi* (flecha negra)



**Fig. 6.** Corte histológico de hígado de *Mus musculus* BALB/c inoculado experimentalmente con un cultivo de Amazonas. Se observa balonamiento de los hepatocitos.

## DISCUSIÓN

Se utilizó especímenes de *Mus musculus* BALB/c machos debido a que en otros estudios se encontró que esta cepa era más susceptible a la infección por *Trypanosoma cruzi*, pudiéndose comparar con el cuadro clínico que afecta al hombre, especialmente los machos ya que en las hembras los estrógenos estimulan la actividad fagocítica de los macrófagos incrementando la respuesta inmune local<sup>7</sup>. Esta elevada susceptibilidad se confirma con el 50% de mortalidad y daños histológicos, hasta el día 30, en ratones infectados con el cultivo de Arequipa.

A fin de facilitar la discusión de los datos que aporta nuestro trabajo se menciona los niveles de parasitemia, signos y alteraciones histopatológicas en la Tabla 1 elaborada a partir de los valores obtenidos en la tabla 1 de parasitemia.

Como se ha venido reflejando a lo largo de todo el trabajo es bien conocida la heterogenicidad existente entre las poblaciones naturales de *T. cruzi*, una variabilidad que se manifiesta en aspectos como su virulencia y morbilidad en el modelo de animal estudiado, capacidad de invasión celular, morfología o composición antigénica.

También está sobradamente contrastado que la naturaleza de la célula hospedadora y las distintas variedades del parásito afecta decisivamente al nivel de parasitación; hay tejidos y líneas celulares especialmente susceptibles a la infección por *T. cruzi* frente a otros que raramente lo sufren.

De acuerdo a una investigación realizada en el norte peruano (Cajamarca), la mayor cantidad de daños histopatológicos se da en el tejido cardiaco y esquelético<sup>8</sup>. Esto se puede verificar en el caso de los ratones infectados con el cultivo de *T. cruzi* procedente de Amazonas, que limita con Cajamarca, pues no se halló daño en el tejido cerebral, pero sí en el tejido cardiaco.

Respecto a los ratones infectados con el cultivo de *T. cruzi* procedente de Arequipa, la presencia de nidos de amastigotas y de los demás daños histopatológicos a nivel de encéfalo y corazón muestra una relación directa con el nivel de parasitemia alcanzado, lo que indica que los parásitos después de instalarse y reconocer los diferentes tejidos se reproducen intensamente a nivel intracelular, dando lugar a cada vez mayor número de parásitos en sangre luego de diferenciarse en tripomastigotas.

Estas diferencias entre los distintos cultivos de diversas zonas geográficas confirman la gran variedad de cepas de este parásito, no sólo desde el punto de vista morfofisiológico, sino también patogénico tratándose de un complejo denominado “cruzi”. Este fenómeno se ve influenciado por factores ambientales e inmunológicos, virulencia, patogenicidad y posible selección de cepas y clones después de interactuar con los vectores y huéspedes vertebrados. La combinación de varios de estos factores podría explicar la variabilidad en el comportamiento biológico del parásito<sup>10</sup>.

En general, hemos podido comprobar que la variabilidad de comportamiento demostrada por los dos cultivos estudiados en nuestras experiencias se correlaciona con factores conocidos previamente como la procedencia geográfica o biológica, o la patogenicidad.

Pero el resultado más llamativo aparece cuando, al realizar la comparación de los datos obtenidos de la infección experimental en los especímenes, muestran marcada diferencia. El cultivo de Arequipa generó daño a nivel SNC y SNP, mientras que el cultivo de Amazonas dañó las vísceras, aunque no de manera muy marcada. Estos datos biológicos coinciden con los procedentes de los distintos estudios epidemiológicos, donde Arequipa es zona epidemiológica en alerta, por el número elevado de casos, y Amazonas mantiene un silencio epidemiológico, que claramente no se debe a la falta de casos, más bien a la poca severidad de la enfermedad en esa zona.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Alroy K, Huang C, Gilman R, Quispe-Machaca V, Marks M, Ancca-Juarez J, et al. Prevalence and Transmission of *Trypanosoma cruzi* in People of Rural Communities of the High Jungle of Northern Peru. PLoS Negl Trop Dis. 2015; 9(5): e0003779
2. Cabrera R, Vega S, Valderrama Y, Cabanillas K, Fernández C, Rodríguez O, et al. New focus of active transmission of Chagas disease in indigenous populations in the Peruvian Amazon basin. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 2013; 46(3): 367-372
3. Delgado S, Ernst K, Hanco M.L, Yool S, Comrie A, Sterling C, Gilman R, Náquira C, Levy M. A country bug in the city: urban infestation by the Chagas disease vector *Triatoma infestans* in Arequipa, Peru. International J Health Geographics. 2013; 12: 48
4. Becerril, M. Parasitología médica. 3º ed. Mc Graw Hill: México, 2011.
5. Devera R, Fernandez O, Coura J R. Should *Trypanosoma cruzi* be called “cruzi Complex? A review of the parasite diversity and the potential of selecting population after in vitro culturing and mice infection. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro 2003; 98: 1-12.
6. Guhl F. Epidemiología de la enfermedad de Chagas en Latinoamérica y en Colombia. En: Fernando-Rosas MD, Diego I, Vanegas MD, Mauricio F, Cabrales MD, editores. Enfermedad de Chagas. Bogotá: Sociedad Colombiana de Cardiología y Cirugía Cardiovascular; 2007. p. 7-14.
7. Suárez, N., Cabrera, R., Cartagena, L., Ayaqui R. Características biológicas de una cepa de *Trypanosoma cruzi* en un modelo murino y análisis de supervivencia. Rev. peru. med. exp. salud pública. Lima, Perú 2009; 26(2): 187-192
8. Díaz E, Escalante H, Jara C. Niveles de parasitemia y alteraciones histopatológicas en *Mus musculus* BALB/c infectado con *Trypanosoma cruzi* obtenido de *Pastronylus chinai* del Valle Chamán, La Libertad – Perú. Parasitol Latinoam. 2004; 59: 153-158
9. Aurazo C, Roldan J, Jara C. Caracterización histopatológica en *Mus musculus* BALB/c de *Trypanosoma cruzi* aislado de *Panstrongylus chinai* y de *Panstrongylus herreri* del norte peruano. SCIENDO. 2013; 16(1): 79-90.