

INFECCION CON *TRYPANOSOMA CRUZI* EN RATONES CONGENITAMENTE ATIMICOS

ELSA L. SEGURÁ °, MONICA ESTEVA °°, C. J. QUINTANS, L. S. MONTORO,
MERCEDES C. WEISSENBACHER °

Instituto Nacional de Diagnóstico e Investigación de la Enfermedad de Chagas Dr. Mario Fátala Chabén; Sección Bioterio, Comisión Nacional de Energía Atómica; Cátedra de Microbiología, Parasitología e Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires

La explicación de la resistencia durante las etapas aguda y crónica de la enfermedad de Chagas⁴, así como el conocimiento de los mecanismos que fallan para que algunos pacientes no sobrevivan la infección aguda y otros queden lesionados en la crónica, son algunos de los puntos que se deberían dilucidar en la búsqueda de métodos activos o pasivos para curar o impedir la enfermedad. Se demostró que la respuesta inmune del huésped opera en la resistencia contra la infección por *Trypanosoma cruzi*, comparando la infección en animales irradiados¹ y/o tratados con inmunosupresores¹⁷, con la producida en animales que no habían recibido trata-

Existe un efecto protector del suero inmune transferido pasivamente a un animal infectado^{5, 10}. Los inmunoseros pueden también aglutinar a los trypomastigotes, dependiendo de la cepa del parásito con que se trabaje y del período de la infección durante el cual se extraiga el

inmunosuero⁹, presentando mayor efecto aglutinante el suero de ratón obtenido después de las 6 semanas del comienzo de la infección⁷.

Otro mecanismo de destrucción del parásito es la lisis mediada por complemento², la cual se observó con el suero de pacientes o de animales infectados en presencia de complemento. La participación de los anticuerpos en la resistencia a la infección ha sido estudiada con cepas de ratones Biozzi que difieren genéticamente en su capacidad de formar anticuerpos⁸. Después de la infección con *T. cruzi*, los ratones que responden más débilmente presentaron parasitemias más altas y mayor mortalidad que los ratones que responden con altos niveles de anticuerpos.

En cuanto a la participación de la inmunidad mediada por células en la resistencia contra la infección chagásica, existen experimentos que sugieren su importancia. Así, los ratones timectomizados neonatalmente, presentaron mayor parasitemia y más rápida mortalidad que los controles no timectomizados¹⁹. La administración de suero antitimocito también exacerba el curso de la infección¹⁵ con *T. cruzi*. La transferencia de células linfoides de bazo de ratones infectados protegió a los animales receptores de una infección posterior con *T. cruzi*^{16, 18}. La carencia de células T funcionales convierte

Recibido: 18-III-1981. Aceptado: 25-III-1981.

* Miembro de la Carrera del Investigador, CONICET (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas).

•• Becaria del CONICET.

Dirección postal: INDIECH, Paseo Colón 568,
1063 Buenos Aires, Argentina.

al ratón congénitamente atímico en un modelo de laboratorio sumamente útil, para estudiar el papel de la inmunidad celular en la fisiopatología del daño, o en la defensa contra las infecciones. La mutación recesiva denominada "nude", y simbolizada "nu" fue descripta en el ratón por Flanagan⁶, y llamó inicialmente la atención por causar ausencia de pelo, acompañada por un notable acortamiento del lapso de vida e inusual sensibilidad a las infecciones. El posterior descubrimiento de que estos ratones "desnudos" poseían un epitelio tímico deficiente que los incapacita para inducir la normal diferenciación de los linfocitos T^{12, 13}, llevó a esta mutante a ocupar un lugar destacado entre los animales de laboratorio. Kierszenbaum y Pienkowski demostraron que los ratones atímicos infectados con altas dosis de *T. cruzi* son más susceptibles a la infección que sus controles inmunológicamente competentes^{8 bis}.

En este trabajo se presentan los resultados del seguimiento de la infección con bajas dosis infectantes de *T. cruzi* en ratones genéticamente atímicos (nu/nu), en comparación con la infección de sus hermanos fenotípicamente normales (nu/+), de la misma camada.

Material y métodos

Animales: Se emplearon ratones de la cepa N: NIH (S) portadores de la mutación nude (nu). El núcleo inicial de reproductores provino del National Institutes of Health, Small Animals Section, Veterinary Resources Branch, de Estados Unidos de Norteamérica.

Los animales utilizados en este trabajo fueron criados en la Sección Bioterio, Departamento de Radiobiología de la Comisión Nacional de Energía Atómica, bajo condiciones destinadas a asegurar la ausencia de patógenos específicos. Se utilizó para tal fin una instalación provista de un flujo laminar de aire tratado con filtros absolutos (H.E.P.A. 99.97 % eficiencia). Antes de ingresar al cuarto de cría el personal encargado del mismo se duchaba y vestía con ropa estéril, colocándose también gorro, barbijo y guantes. Se emplearon cajas de acero inoxidable, provistas de lecho de viruta de madera blanca y alimento Cargill en comprimidos RR. El agua se suministró mediante botellas de vidrio de 400 ml con tapones de goma y picos de acero inoxidable; todos esos elementos se renovaban una vez por semana. La totalidad del material se esterilizaba por autoclave, con excepción del alimento que se trataba con una dosis de 2.5 megarad de radiación gam-

ma proveniente de una fuente de cobalto 60. El agua luego de esterilizada se llevaba a pH 2.5 con ácido clorhídrico. Para manejar los animales se usaban pinzas de disección que se mantenían sumergidas en antiséptico entre uso y uso. En este experimento se utilizaron 20 ratones machos de 22 a 30 días de edad y cuya constitución genética era nu/nu (timodeficientes) y nu/+ (eutéimicos). Se obtuvieron apareando machos heterozigotas y hembras homozigotas (nu/nu). Este apareamiento da un rendimiento de 50 % de animales desnudos (nu/nu) y 50 % de animales con pelo (nu/+).

Durante el transcurso de la infección por *T. cruzi* los animales se mantuvieron en un cuarto aislado que no se había utilizado previamente con otros animales de experimentación. Se colocaron 5 animales por caja, protegiéndolos con tapas filtrantes de fibra poliéster. Las cajas se mantuvieron en una campana bajo presión positiva de aire esterilizado por filtración, que circulaba constantemente produciendo aproximadamente 8 cambios completos por hora.

Parásitos: Se utilizaron trypomastigotes de la cepa Tulahuen obtenidos de sangre de ratón Swiss, infectado siete días antes con 5×10^5 trypomastigotes por vía intraperitoneal.

La sangre se obtuvo por punción cardíaca, bajo flujo laminar y se recogió sobre heparina. El número de parásitos se determinó en una cámara de Malassez, de 0.8 mm³ de capacidad. Para ratones Swiss de 30 días, una DL₅₀ es igual a 5×10^3 parásitos, determinada por el método Reed y Muench¹⁴. La sangre conteniendo los parásitos se diluyó en medio RPMI con 5 % de suero fetal bovino.

Diseño experimental: Diez ratones nu/nu y 10 ratones nu/+ recibieron el total de la dosis de 5×10^3 parásitos en 0.2 ml de la dilución de sangre, por vía intraperitoneal. Se controló diariamente la evolución clínica y mortalidad de los animales. La parasitemia se determinó a los 3, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 14, 15, 16, 34, 37 y 40 días después de la infección, extrayendo 5 µl de sangre de la cola a 5 ratones de cada grupo por punto y realizando el recuento por observación microscópica. Un segundo grupo de 20 ratones (10 nu/nu y 10 controles) recibió 5 parásitos en 0.2 ml por vía intraperitoneal.

Resultados

Ratones infectados con 5×10^3 parásitos:

Desde los 7 días post infección (pi), los ratones inmunocompetentes se observaron adinámicos y con el pelo erizado en contraposición a los ratones nu nu, de apariencia normal. Estos signos siguieron sin variación a lo largo de la infección y hasta los 14 días pi en que murieron cinco (50 %) de los ratones inmunocompetentes; otro ratón murió el día 19 pi y el siguiente a los 25 días después de la infec-

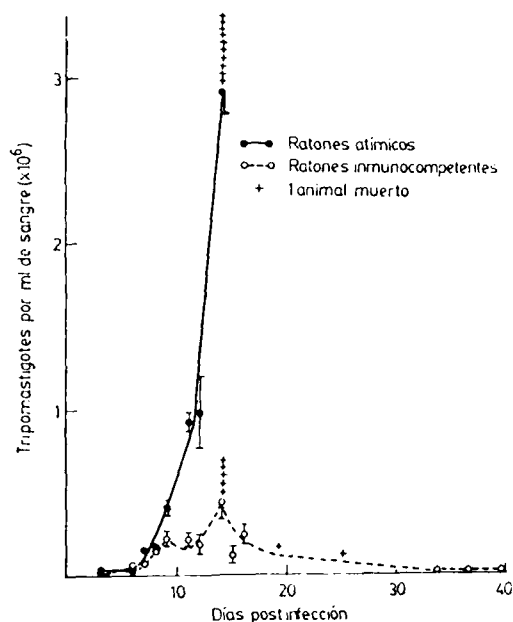


Fig. 1. — Niveles de parasitemia en ratones genéticamente atímicos (nu/nu) y controles inmunocompetentes (nu/+), infectados con 5×10^2 trypomastigotes de *T. cruzi* (cada punto representa el promedio de la parasitemia de 5 animales, a excepción de los días 34, 37 y 40 pi). $\pm$ 2 desvíos standard (sólo cuando la diferencia fue estadísticamente significativa).

ción como se observa en la Figura 1. A los 30 días pi los tres ratones nu/+ sobrevivientes se mostraron recuperados. Los ratones nu/nu mostraron signos de excitación desde el noveno día presentando decaimiento y adinamia extrema desde el día 12 pi. En el día 14 después de la infección murieron los diez ratones inmunodeficientes (100 %).

La parasitemia (Fig. 1) comenzó ya al tercer día ($500 T. cruzi$ /ml) en los ratones desnudos, observándose una fase lag de 4 días. El pico más alto de parasitemia (3×10^6 parásitos/ml) se observó al día 14 y coincidió con la mortalidad del total de los animales de este grupo. La parasitemia en los animales nu/+ comenzó a detectarse a los 6 días pi (2.8×10^3), llegando al pico máximo de 4.2×10^5 parásitos/ml en el día 14, durante el cual murió el 50 % de los animales infectados. La mejoría clínica de los animales sobrevivientes coincidió con la negativización de la parasitemia.

Como se observa en la Figura 1 hay una diferencia significativa de parasitemia

entre el grupo de ratones atímicos y sus controles inmunocompetentes, desde el noveno día de la infección ($p < 0.001$, $p < 0.05$ y $p < 0.001$, respectivamente).

Ratones infectados con 5 parásitos:

En este grupo se observaron parásitos en sangre de los ratones atímicos recién a los 7 días pi, siendo el pico de parasitemia (1×10^7 /ml) a los 16 días pi, que coincidió con el 100 % de mortalidad de los ratones. En cambio, el 100 % de los controles inmunocompetentes sobrevivieron hasta los 60 días pi con una parasitemia apenas detectable.

Discusión

En este trabajo se corrobora que los ratones genéticamente atímicos resisten menos la infección por *T. cruzi*, que sus hermanos eutímicos, con las dosis utilizadas y según los parámetros de parasitemia y mortalidad. El motivo por el cual se utilizaron 5×10^3 parásitos para infectar un grupo de ratones fue que se demostró previamente que para ratones Swiss este número de parásitos equivale a 1 DL_{50} , a los 14 días pi. En este trabajo, se demostró que los animales nu/+ repetían este comportamiento, mientras se observaba en sus hermanos inmunodeficientes el 100 % de mortalidad a los 14 días. Los experimentos llevados a cabo realizando la infección con 5 parásitos muestran que los ratones nu/nu también mueren en un 100 %, mientras que sus hermanos eutímicos sobreviven en su totalidad hasta por lo menos 60 días pi, fecha de finalización del experimento. Estos últimos ratones (nu/+) parecen comportarse como los ratones Swiss¹¹ al recibir bajo número de parásitos.

Schmuñis y col.¹⁹ describieron una mayor severidad en la evolución de la infección por *T. cruzi* en ratones timectomizados al nacer. Así observaron una parasitemia más alta y una sobrevida más corta en los ratones timoprivos, comparados con los controles inmunocompetentes. Posteriormente Kierszenbaum y Pienkowski^{8 bis} confirmaron estos resultados utilizando ratones genéticamente atímicos, a los que

infectaron con 50 DL₅₀ de tripomastigotes de la cepa Tulahuen. Ambos hallazgos concuerdan con los resultados que se discuten en este trabajo, y señalan que la falta de información proporcionada por el timo, ya sea en animales congénitamente atímicos o timoprivos quirúrgicamente, indica que la presencia del linfocito T es decisiva para la resistencia en la infección chagásica aguda de los ratones. El empleo de dosis masivas de parásitos para inducir una infección, puede enmascarar el efecto buscado. Así, cuando se emplearon 50 DL₅₀ para infectar a los ratones atímicos y a sus controles, los autores⁹ consiguen observar una diferencia de 5 días en la mortalidad acumulativa entre los ratones nu/nu y nu/+.

Esto se repite en nuestra experiencia utilizando 1 DL₅₀ (5000 parásitos), mientras que en los animales inoculados con 5 parásitos la gran diferencia de mortalidad observada permite claramente determinar el grupo de los animales timoprivos de sus controles inmunocompetentes. Además, la mortalidad de los nu/nu se observó a los 16 días pi, lo cual facilitará el estudio de la respuesta humoral y los trastornos electrocardiográficos en estos ratones.

En este sentido, se están realizando estudios de anticuerpos humorales, electrocardiográficos e histopatológicos y se efectuarán experimentos de transferencia de linfocitos T en ratones timoprivos de cepas endocriadas.

A diferencia de los resultados obtenidos en este trabajo, los ratones genéticamente atímicos infectados con *Trypanosoma rhodesiense*, agente etiológico de la Trypanosomiasis Africana, presentaron menor parasitemia y menor mortalidad que sus hermanos inmunocompetentes, también infectados³, lo cual indica que existe un mecanismo diferente de defensa en la infección por *T. rhodesiense*, comparado con el que se observa en la infección por *T. cruzi*.

Resumen

En este trabajo se intentó dilucidar el papel que juega la inmunidad celular en la enfermedad del ratón infectado con dosis bajas de T. cruzi, comparando el curso

de la infección de ratones congénitamente atímicos (nu/nu) con sus hermanos de camada fenotípicamente normales (nu/+). Para esto se infectaron ratones de ambos grupos de 4 semanas de edad, por vía intraperitoneal con 5000 ó 5 tripomastigotes de sangre. El curso de la enfermedad fue más severo en los ratones atímicos, con parasitemia significativamente más alta y promedio de sobrevivencia menor que en los controles inmunocompetentes, sugiriendo que en este caso, los linfocitos timodependientes tienen un papel importante en la defensa contra la infección con T. cruzi.

Summary

Trypanosoma cruzi INFECTION IN CONGENITALLY ATHYMIC MICE.

Present evidence suggests that cellular immunity may play an important role in the acute and chronic T. cruzi infection of animals and man⁷. Neonatal thymectomy was shown to cause higher parasitemia levels and mortality rates in mice infected with T. cruzi¹⁹. Congenitally athymic mice were shown to be more susceptible to high doses of T. cruzi. The role of T lymphocytes in the pathogenesis of T. cruzi infection was studied by comparing the course of the acute infection in congenitally athymic (nu/nu) mice with that in phenotypically normal littermates (nu/+). The strain used was N:NIH (S) which carries the mutant nu gene. Bloodstream trypomastigotes of the Tulahuen strain (5 x 10³ or 5 organisms in 0.2 ml) were inoculated intraperitoneally into 4-week-old mice of two groups: 10 immunodeficient and 10 normal littermates. All animals were housed, in standard cages with a polyester filter cover and kept in an isolated room for 40 days. Sterilized standard laboratory food and water (pH 2.5) were provided ad libitum. Morbidity and mortality were recorded daily. Trypanosome counts were performed in fresh tail blood at 3, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 14, 15, 16, 34, 37 and 40 days after infection. Figure 1 shows that no parasites were found in the blood of immunocompetent mice 3 days postinfection, whereas in athymic mice a low parasitemia was already present (500 parasites per

ml). *Trypomastigote* counts in athymic mice increased steadily, reaching a peak at day 14, with 3×10^6 parasites per ml, a significantly higher number than in the phenotypically normal littermates which presented 4×10^5 parasites/ml on the same day. In nude mice, the course of the disease was more severe; curiously, all animals died on the 14th day. However, only 50 % of immunocompetent infected control mice died on that same day, the remainder surviving significantly longer. Nude mice infected with 5 *Trypomastigotes*, also failed to recover from the infection exhibiting 100 % mortality, while control mice likewise infected showed 100 % survival. The present experiment demonstrates that nude mice are more susceptible than immunocompetent mice to *T. cruzi* acute infection with regard to parasitemia and mean survival time. Histopathological studies and antibody assays are now in progress while T-cell restitution experiments will soon be undertaken.

Agradecimientos: Este trabajo fue realizado con fondos provenientes de subsidios otorgados por SECYT (Secretaría de Estado de Ciencia y Tecnología) y CONICET (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas).

Bibliografía

1. Brener Z, Chiari E: The effects of some immunosuppressive agents in experimental chronic Chagas disease. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 65: 629, 1971.
2. Budzko DB, Pizzimenti MC, Kierszenbaum F: Effects of complement depletion in experimental Chagas' disease: Immune lysis of virulent blood forms of *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun* 11: 86, 1975.
3. Campbell GH, Esser KM, Phillips SM: *Trypanosoma rhodesiense* infection in congenitally athymic (nude) mice. *Infect Immun* 20: 714, 1978.
4. Chagas C: Nova tripanosomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1: 159, 1909.
5. Culbertson JT, Kolodny MH: Acquired immunity in rats against *Trypanosoma cruzi*. *J Parasitol* 24: 83, 1938.
6. Flanagan SP: "Nude", a new hairless gene with pleiotropic effects in the mouse. *Genet Res Camb* 8: 295, 1966.
7. Hanson WL, Roberson EL, Chapman WL, Logan LL, Chien JJ, Devlin RF: Studies on immunity in Chagas disease. *Proc 9th Intern Congr Trop Med Mal* p 57, 1973.
8. Kierszenbaum F, Howard JG: Mechanisms of resistance against experimental *Trypanosoma cruzi* infection: The importance of antibodies and antibody-forming capacity in the Biozzi high and low responder mice. *J Immunol* 116: 1208, 1976.
- 8 bis. Kierszenbaum F, Pienkowski MM: Thymus-dependent control of host defense mechanisms against *Trypanosoma cruzi* infection. *Infect Immun* 24: 117, 1979.
9. Kretzli AV, Brener Z: Antigenic variation in bloodstream forms of *Trypanosoma cruzi* from different strains. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 18: 134, 1976.
10. Kulin RE, Durum SK: The outset of immune protection in acute experimental Chagas' disease C3H (ME) mice. *Intern J Parasitol* 5: 241, 1975.
11. Lagunas RP, Cabeza Merckert P, Basombrío MA, Chambló GJ, Cossio PM, Arana RM: Infección experimental del ratón con *Trypanosoma cruzi*. Modelo experimental de Enfermedad de Chagas. *Medicina (Bs Aires)* 40: 33, 1980.
12. Pantelouris EM: Absence of a thymus in a mouse mutant. *Nature (London)* 217: 370, 1968.
13. Pantelouris EM: Observations on the Immunobiology of "Nude" mice. *Immunology* 20: 247, 1971.
14. Reed LJ, Muench HA: A simple method of estimating fifty per cent end points. *Am J Hyg* 27: 493, 1938.
15. Roberson EL, Hanson WL, Chapman WL: *Trypanosoma cruzi*: effects of anti-thymocyte serum in mice and neonatal thymectomy in rats. *Exptl Parasitol* 34: 168, 1973.
16. Roberson EL, Hanson WL: Transfer of immunity to *Trypanosoma cruzi*. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 68: 338, 1974.
17. Rubio M: Estudio de los factores que intervienen en la virulencia de una cepa de *Trypanosoma cruzi*. Acción de la cortisona en la capacidad de invasión y multiplicación del parásito. *Biológica (Santiago)* 20: 89, 1954.
18. Santos RP: Contribuição ao estudo da imunidade na fase aguda da doença de Chagas experimental. *Rev Pat Trop* 4: 433, 1973.
19. Schmunis GA, González Cappa SM, Traversa DC, Yanovsky JF: The effect of immuno-depression due to neonatal thymectomy on infections with *Trypanosoma cruzi* in mice. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 65: 89, 1971.