

Caracterización biológica e isoenzimática de aislados de *Trypanosoma cruzi*

Elio Moreno, Néstor González, Ivón Rivera, Briceida Guillén de Pernía,
Ana Lugo de Yarbuh y Néstor Añez

Se presenta el resultado de un estudio experimental sobre el comportamiento biológico de ocho aislados de *Trypanosoma cruzi* provenientes del Occidente de Venezuela y obtenidos de casos humanos y de muestras de didélfidos, cánidos y triatominos, llevados a cabo en el modelo rata Wistar. Asimismo, se muestrean los perfiles de las enzimas PGM, GPI, IDH-NADP, ME, MDH, G6PDH, MPI y 6PGDH determinados por electroforesis de isoenzimas en extracto de parásito cultivados en medio difásico. El comportamiento de los aislados fue evaluado siguiendo el curso de la parasitemia, la mortalidad, la evolución de la respuesta humoral, el hemograma, el tropismo tisular y los aspectos histopatológicos en ratas machos inoculados intradermalmente con 1×10^4 tripomastigotos metacíclicos. Observaciones llevadas a cabo entre los 6 y 180 días post-infección (pi) revelaron, parasitemias patentes en todas las ratas entre los 12 y 45 días, con altos niveles de parásitos por volumen de sangre (44 y 468 trip/mm³) entre los 18 y 24 días. Similar porcentaje de mortalidad (13,3 y 16,7 %) fue detectado en ratas infectadas con aislados provenientes de casos humanos, didélfidos y triatominos. Anticuerpos circulantes (Ac) anti-*T. cruzi* fueron detectados a partir de los 12 días, registrándose los mayores títulos (1:2048 y 1:4096) entre los 30 y 90 días pi, los cuales permanecieron elevados hasta los 180 días. El hemograma mostró un significativo incremento de linfocitos y disminución de los neutrófilos ($P < 0,001$) durante la fase aguda y subaguda de la infección, estos valores retornaron a la normalidad después de los 90 días pi. Observaciones histopatológicas evidenciaron parasitosis en el músculo cardíaco y músculo esquelético en mayor proporción que en el esófago, vejiga urinaria e intestinos, no habiéndose detectado parásitos en testículo, riñón, bazo, hígado, páncreas y cerebro. Moderada miocarditis y miositis aguda fue detectada a partir de los 18 días con abundantes nidos de amastigotos en algunos casos y un proceso inflamatorio linfomonohistiocitario focal y/o difuso. Lesiones vasculares y discretos focos de fibrosis fueron evidentes después de los 60 días pi. Los aislados de *T. cruzi* utilizados mantuvieron sus características biológicas intrínsecas, exhibiendo grados de virulencia y patogenicidad independientes de su procedencia. La caracterización enzimática, reveló que los aislados de *T. cruzi* utilizados son marcadamente heterogéneos, aún cuando provengan de la misma especie de hospedador y de la misma región geográfica.

Palabras clave: *Trypanosoma cruzi*, comportamiento biológico, infección chagásica, patrones isoenzimáticos, rata Wistar, Venezuela.

INTRODUCCIÓN

Desde el descubrimiento de *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909), agente etiológico de la tripanosomiasis americana o infección chagásica, muchos investigadores han logrado obtener un gran número de aislados del parásito a partir de casos humanos y de muestras

tomadas de triatominos y/o mamíferos naturalmente infectados. Estudios experimentales llevados a cabo en diferentes modelos vertebrados han demostrado una gran variabilidad en las características biológicas y bioquímicas de *T. cruzi* lo cual se sospecha podría influir sobre las manifestaciones clínicas de la enfermedad en el hombre (Andrade *et al.*, 1985; Miles *et al.*, 1980, Carneiro *et al.*, 1991; Lauria-Pires *et al.*, 1996; Duarte Fernández *et al.*, 1997). Los conocimientos obtenidos han sido usados en estudios clínicos y epidemiológicos para determinar la posible relación entre el parásito y las características de la infección chagásica en áreas

Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Los Andes, Mérida, 5101, Venezuela. Telef. 074 - 401285; Fax: 074 -401286; Email: emorenob @ ciens.ula.ve.

endémicas de países de Centro y Sur América, donde la enfermedad de Chagas es un problema de salud pública a juzgar por los 100×10^6 de habitantes que viven bajo riesgo de adquirir la infección (WHO, 1991). Venezuela, país endémico para la enfermedad de Chagas, ha sido afectado recientemente por un brote de casos agudos en uno de los estados del occidente, específicamente el estado Barinas (Parada *et al.*, 1996; Añez *et al.*, 1999). Este hecho motivó el presente trabajo, en el cual varios aislados obtenidos de pacientes con enfermedad de Chagas en fase aguda, son comparados con otros aislados provenientes de animales silvestres, domésticos y triatominos, tomando en consideración variables como virulencia, patogenicidad y evolución de la respuesta humoral, en un modelo experimental. Por otro lado, la caracterización bioquímica de los parásitos permitió correlacionar sus perfiles enzimáticos con la procedencia de los mismos y con su expresión en el modelo vertebrado utilizado.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislados de *Tyranosoma cruzi*. Se estudiaron ocho aislados obtenidos por xenodiagnóstico y hemocultivo a partir de casos humanos naturalmente infectados (4), *Didelphis marsupiales* (2), perro (1), triatominos (1), procedentes de áreas endémicas ubicadas en el piedemonte oriental de la Cordillera de los Andes en el estado Barinas, Venezuela (Figura 1; Tabla 1). Los parásitos fueron mantenidos en medio NNN a 26 °C y por pasajes sucesivos por triatominos y ratones NMRI. Parásitos de la cepa Y de *T. cruzi* (Silva & Nussenzweig, 1953) fueron usados en el experimento como control.

Infección experimental. Un total de 270 ratas Wistar machos de 200-250 gr fueron inoculados intradérmicamente con aproximadamente 1×10^4 tripomastigotos metacíclicos de los diferentes aislados de *T. cruzi* obtenidos de *Rhodnius prolixus* experimentalmente infectados. 90 ratas sanas con las mismas características antes señaladas fueron utilizadas como controles. Las ratas fueron mantenidas en el Vivario experimental bajo condiciones controladas y alimentadas con dieta comercial ratarina^R y agua *ad libitum*.

En cada grupo experimental de 35 ratas infectadas con cada aislado, 12 ratas fueron evaluadas individualmente; 10 ratas en forma continua a los 6, 12, 18, 24, 30, 45, 60, 90, 120, 150 y 180 días post-infección (pi), estimando la virulencia expresada en niveles de parasitemia y mortalidad; variaciones en el hemograma y evolución de la respuesta humoral. De las 25 ratas restantes, 2 animales separados al azar más un control fueron utilizados para estudios histotrópico e histopatológico durante los días de muestreos. Antes

del sacrificio, a cada animal se le practicó una evaluación parasitológica y serológica.

Evaluación parasitológica. La parasitemia fue estimada individualmente a las 12 ratas siguiendo el método de Pizzi (1957) modificado por Brener (1962), usándose cada vez 5 mm³ de sangre extraída con capilares heparinizados por punción del plexo retro-orbital durante los días de muestreos.

Mortalidad. Fue registrada en cada uno de los grupos experimentales anotándose cada vez la fecha y aspecto de los animales postmortem.

Hemograma. Fue realizado en extendidos de sangre de las ratas infectadas y controles. Los extendidos fueron fijados con metanol por 2 a 5 minutos y coloreados con Giemsa al 10 % en buffer-fosfato a pH 7.2 durante 1 hora. Para el recuento de leucocitos se utilizó un ocular 10x y objetivo 100x en inmersión contándose en cada caso 100 células blancas.

Estimación de la respuesta humoral. 0,5 ml de sangre del plexo retro-orbital fue utilizada para separar sueros por centrifugación. Los anticuerpos (Ac) específicos anti-*T. cruzi* fueron determinados mediante las técnicas de Aglutinación Directa (T-AD) con previo tratamiento de los sueros con 2-Mercaptoetanol (Storni *et al.*, 1975) y por inmunofluorescencia indirecta (IFI) (Camargo, 1966), utilizándose en ambas reacciones como antígenos epimastigotos de *T. cruzi* colectados en fase exponencial de crecimiento en el medio de cultivo NNN. Los resultados son expresados como el Logaritmo de la inversa de los títulos de anticuerpos (TAc).

Estudio histotrópico e histopatológico. Fue llevado a cabo en 2 ratas infectadas más un control sano, estos animales fueron sacrificadas por sobree anestesia con éter dietílico durante los días de muestreos y de ellos se extrajeron el corazón completo cortado frontalmente en dos partes y fragmentos de músculo esquelético poplíteo, intestino delgado a nivel del duodeno, intestino grueso a nivel del colon, esófago, hígado, bazo, riñón, vejiga urinaria, testículo y cerebro. Los tejidos fueron fijados en formalina neutra al 10% e incluidos en paraplast. Las secciones de 6 mm de espesor fueron cortadas con un microtomo American Optical Spencer y coloreadas por el método de Giemsa-colofonio (Bray & Garnham, 1962) para evidenciar la infección tisular. Electroforesis enzimática. Los extractos de parásitos de cada aislado para la caracterización bioquímica, fueron obtenidos usando el método de Arcos (1991) y Grimaldi & Momen (1989). La electroforesis de isoenzimas fue realizada en geles de agarosa como es descrita por Cupolillo *et al.*, (1994;1995). Las siguientes enzimas fueron estudiadas: PGM [E.C.1.4.1.9.] Fosfoglucomutasa,

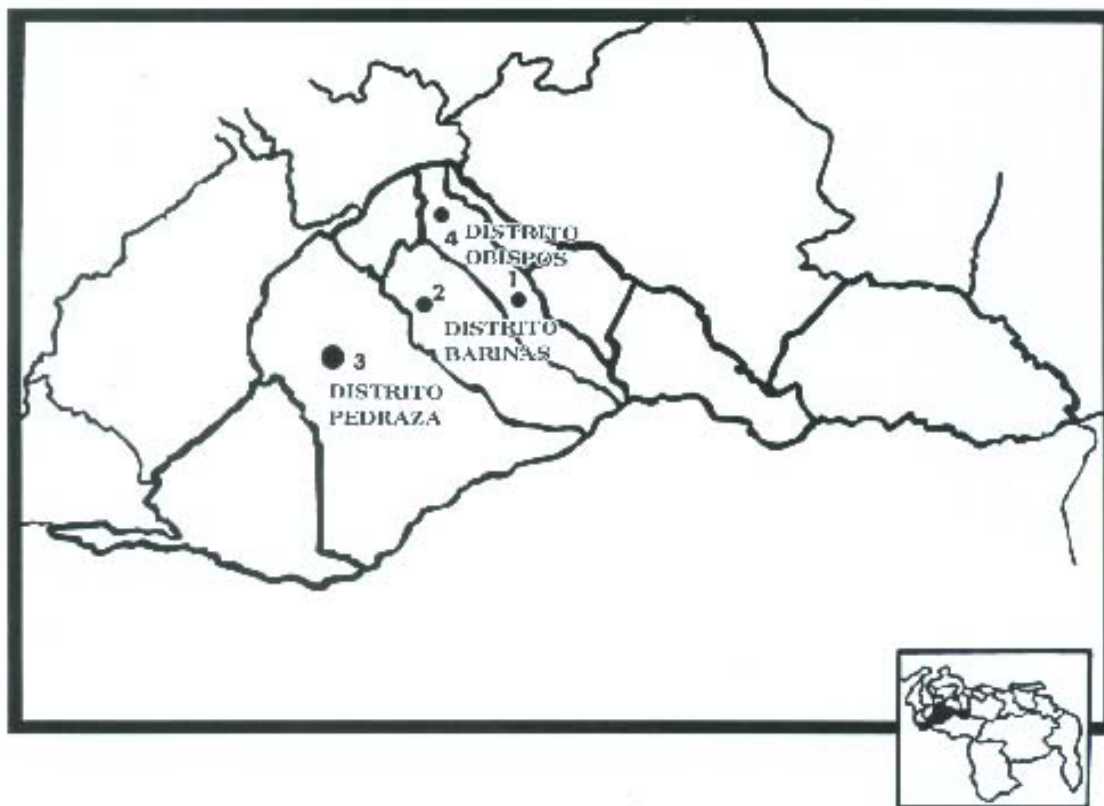


Figura 1. Lugares de procedencia de los aislados de *Trypanosoma cruzi* en el estado Barinas - Venezuela. 1.- YBM 2.- LXE, GRA. 3.- NP, Chipo, Perrote. 4.- Dml, DmD.

Tabla 1

Detalles sobre la procedencia de los aislados de *Trypanosoma cruzi* utilizados en el estudio.

Código de aislado	Método de aislamiento y hospedador	Sexo/ Edad (años)	Lugar de procedencia Estado Barinas-Venezuela
M/HOM/VE/92/YBM	Hemocultivo caso humano agudo	H/3	La Maporita Dtto. Obispo
M/HOM/VE/93/LXE	Hemocultivo caso humano agudo	M/11	Quebrada Seca, Dtto. Barinas
M/HOM/VE/93/NP	Hemocultivo caso humano agudo	H/27	Pedraza, Dtto. Pedraza
M/HOM/VE/94/GBA	Hemocultivo caso humano agudo	H/19	Quebrada. Seca, Dtto. Barinas
M/DID/VE/92/DmI	Xenodiagnóstico de <i>D. marsupialis</i>	H/-	Bosque Caimital, Dtto. Obispo
M/DID/VE/92/DmD	Xenodiagnóstico de <i>D. marsupialis</i>	H/-	Bosque Caimital, Dtto. Obispo
I/RHO/VE/93/chipo	Deyecciones de <i>R. prolixus</i>	H/M/-	Pedraza, Dtto. Pedraza
M/CAN/VE/94/perrote	Hemocultivo y xenodiagnóstico de <i>C. familiaris</i>	M/-	Pedraza, Dtto. Pedraza
M/HOM/BR/50/Y*	Caso humano agudo, Brasil	M/2	

*: Referencia internacional.

H: hembra; M: macho.

GPI [E.C.5.3.1.9] Glucosa fosfatoisomerasa, IDH-ADP [E.C.1.1.1.4.2.] Isocitrato deshidrogenasa, ME [E.C.1.1.1.4.0] Enzima málica, MDH [E.C.1.1.1.3.7] Malato deshidrogenasa, G6PDH [E.C.1.1.1.4.9] Glucosa-6-Fosfato-deshidrogenasa, MPI [E.C.5.3.1.8] Manosa fosfato deshidrogenasa, 6PGDH [E.C.1.1.1.4.4] 6-Fosfogluconato-deshidrogenasa).

Análisis estadístico. Los títulos de anticuerpos fueron analizados usando la moda aritmética. Los valores obtenidos en el hemograma se analizaron mediante un análisis de regresión múltiple (Kleinbaum *et al*, 1998).

RESULTADOS

Parasitemia y Mortalidad. El seguimiento del curso de la infección en los animales inoculados intradérmicamente con las formas metacíclicas de los diferentes aislados de *T. cruzi* utilizados, permitió apreciar infecciones patentes entre los 12 y 45 días en los aislado DmD de *D. marsupialis* y LXE de humano, entre los 12 y 30 días para los aislados YBM y GBA de humanos, Perrote de cánidos y Chipo de triatominos y entre 18 y 30 días en los aislados NP de humano y DmI de *D. marsupialis*, detectándose entre 50 y 100% de infección a los 18 y 24 días y niveles de parasitemia que oscilaron en 27 y 468 trips/mm³ de sangre. Los muestreos realizados a 30 y 45 días pi revelaron una brusca disminución en las parasitemias patentes, observándose niveles muy discretos de 3 y 2 trips/mm³ de sangre (Gráfico 1). Entre los 60 y 180 días pi, no se observaron

parásitos en la sangre de las ratas examinadas. Los porcentajes de mortalidad fueron diferentes, desde ninguna en los animales infectados con NP y la cepa Y de referencia, hasta 13,3 % y 16,7 % en las ratas infectadas con los aislados YBM y DmD (Tabla 2). 10 ratas murieron durante la fase aguda de la infección y 13 entre los 60 y 180 días pi, para un total de mortalidad acumulada de 23/270 animales. En los grupos inoculados con parásitos de los aislados YBM, DmD, GBA y Chipo, las ratas presentaron distensión abdominal, moderada protrusión rectal y dificultad en los movimientos de las extremidades posteriores.

Hemograma. Se observó una variación significativa en el recuento diferencial de linfocitos y neutrófilos (P<0,001) durante las fases aguda y subaguda de la infección, normalizándose después de los 90 días pi. Los monocitos, eosinófilos y basófilos permanecieron dentro de los porcentajes normales como en las ratas controles.

Respuesta humoral. Anticuerpos específicos anti-*T. cruzi* fueron detectados en todas las ratas infectadas a partir de los 12 y 18 días pi, registrándose los mayores TAc (1:2048 y 1:4096) entre los 30 y 90 días pi y permaneciendo en niveles elevados hasta los 180 días cuando se realizó el último muestreo (Gráfico 2 a,b).

Hallazgos histotrópicos e histopatológicos. La presencia de formas tisulares de *T. cruzi* fue detectada indistintamente en corazón, músculo esquelético,

Gráfico 1
Estimación de parasitemia en ratas infectadas con metacíclicos de diferentes aislados de *Trypanosoma cruzi*.

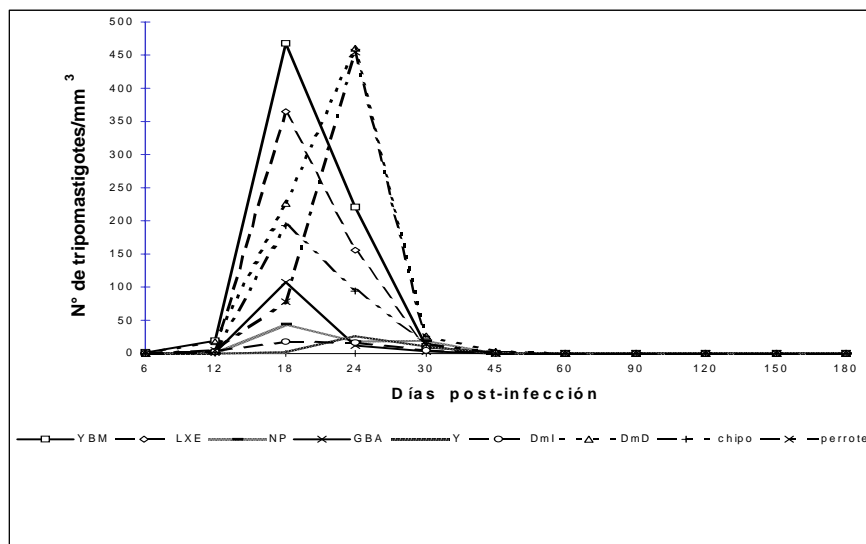


Tabla 2
Expresión de la virulencia de aislados de *Trypanosoma cruzi* en ratas wistar

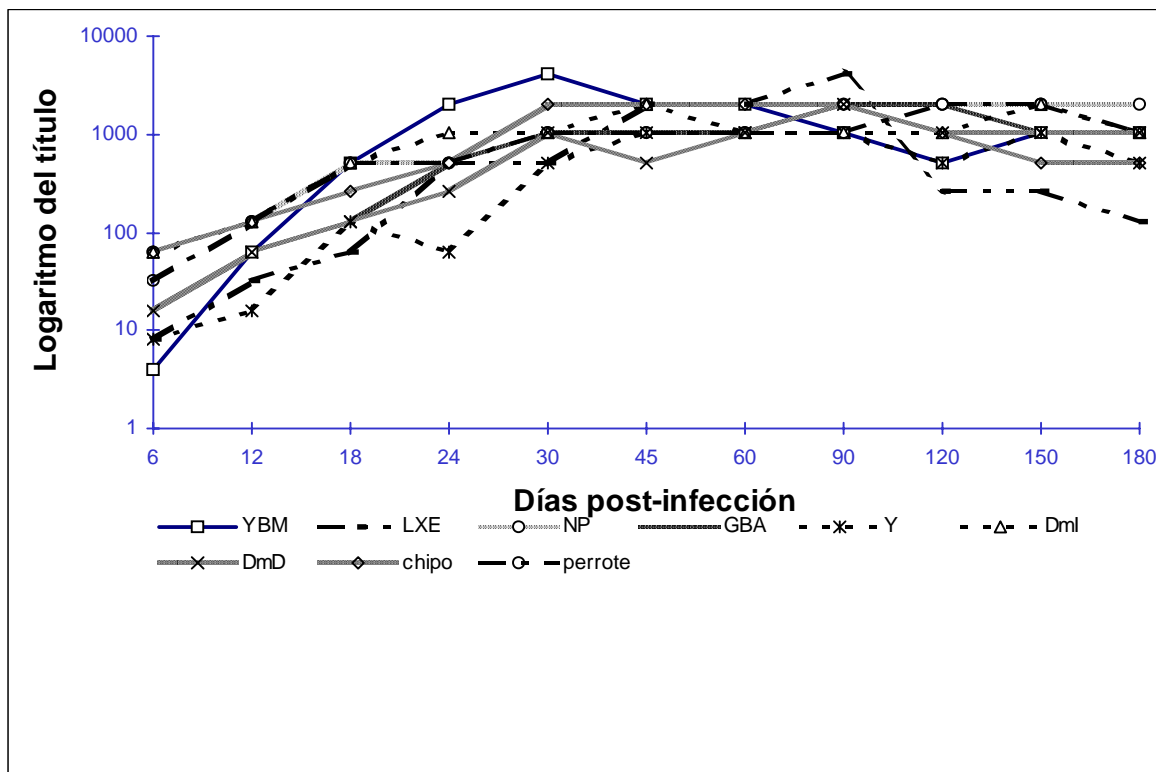
Código de aislado	Período (días)		Parasitemia	Mortalidad		
	Pre-patente	Duración de la patencia	Trips/mm3	Fa	Fc	%
M/HOM/VE/92/YBM	12	18	10-468	2	2	13,3 (4/30)
M/DID/VE/92/DmD	12	33	18-460	2	3	16,7 (5/30)
M/CAN/VE/94/perrote	12	18	4-454	1	2	10,0 (3/30)
M/HOM/VE/93/LXE	12	33	2-365	1	2	10,0 (3/30)
I/RHO/VE/93/chipo	12	18	1-198	2	2	13,3 (4/30)
M/HOM/VE/94/GBA	12	18	1-108	2	1	10,0 (3/30)
M/HOM/VE/93/NP	18	12	19-44	-	-	0,0 (0/30)
M/DID/VE/92/DmI	18	12	3-16	-	2	6,7 (2/30)
M/HOM/BR/50/Y*	18	12	2-27	-	-	0,0 (0/30)

Fa : Fase aguda

Fc: Fase crónica.

*: Referencia internacional

Gráfico 2
Evolución de niveles de anticuerpos séricos en ratas infectadas con metacíclicos de aislados de *Trypanosoma cruzi*, detectados mediante la técnica de Inmunofluorescencia Indirecta



esófago e intestinos, aún cuando en cantidades significativamente mayores en el tejido muscular cardíaco y esquelético. Histopatológicamente, todas las ratas presentaron parasitosis en el tejido muscular entre los 12 y 45 días pi, acompañado de instauración temprana de una miocarditis y miositis aguda a partir de los 12 y 18 días pi, con un infiltrado celular discreto de tipo mononuclear y abundantes nidos de amastigotos dispersos en toda la masa muscular en algunos casos. La mayor parasitosis fue evidente en el músculo cardíaco entre los 18 y 30 días pi en niveles que oscilaron entre 3 pseudoquistes/50 campos microscópicos en las ratas infectadas con el aislado DmI y 356 pseudoquistes/50 campos en aquellas infectadas con el aislado NP y en el músculo esquelético entre 1 pseudoquistes/ 50 campos en los animales inoculados con los aislados NP, GBA, Perrote y Chipo y 24 pseudoquistes/50 campos en aquellas infectadas con el aislado DmD (Figuras 2 a, b, Tabla 3). El infiltrado focal se transformó progresivamente en un proceso inflamatorio de naturaleza linfomonohistiocitario focal y/o difuso, con invasión de las fibras musculares cardíacas, vasos sanguíneos y células ganglionares parasimpáticas. Después de los 60 días pi, se evidenciaron lesiones vasculares, discretos focos de fibrosis observados hasta los 180 días cuando finalizó nuestra investigación.

Por otro lado, amastigotos de los aislados YBM, Chipo, NP, DmI y Y también invadieron durante la fase aguda de la infección la musculatura lisa del esófago, vejiga urinaria, intestinos delgado y grueso, mostrándo

entre 1 y 7 pseudoquistes/50 campos microscópicos entre los 18 y 30 días pi, evidenciándose, asimismo, un infiltrado inflamatorio de variable intensidad que persistió en algunos sitios de la capa muscular con destrucción de fibras, plexos nerviosos y dilatación discreta de estos órganos (Figura 2 d, Tabla 3).

En las secciones de hígado, bazo, páncreas, testículo, riñón y cerebro, no se detectaron parásitos tisulares durante el estudio. Sin embargo, se observó presencia de un proceso inflamatorio de intensidad y extensión variable dependiendo del órgano y del aislado de parásitos inoculados (Figuras 2 c, e, f).

Patrones isoenzimáticos: El análisis de los patrones electroforéticos de los ocho aislados de *T. cruzi* del estado Barinas y de la cepa Y, reveló que los aislados GBA, NP, LXE, Chipo, Perrote, DmI y Y, mostraron idénticos patrones electroforéticos en todos los loci estudiados. Mientras que YBM mostró diferencias en el locus 6PGDH, lo que permitió separarlo del resto de los aislados. DmD también presentó diferencias en cinco loci enzimáticos (PGM, IDH-NADP, MDH, MPI, 6PGDH) (Figura 3).

DISCUSIÓN

A través del tiempo muchos investigadores han coincidido en que el uso experimental de aislados de *T. cruzi* de diferentes orígenes, revelan diferencias significativas cuando se estudian problemas de

Tabla 3
Evidencias histopatológicas en ratas infectadas con diferentes aislados de *Trypanosoma cruzi*

Código de aislado	Parasitosis tisular/ reacción inflamatoria											
	C	ME	E	V	ID	IG	T	R	B	H	P	CE
M/HOM/VE/92/YBM	50/++++	3/+++	1/+	3/++	1/+	1/+	+	+	+	+	+	+
M/DID/VE/92/DmD	78/++++	24/++	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M/CAN/VE/94/perrote	47/++	1/+	+/-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M/HOM/VE/93/LXE	30/++	3/++	+/-	+	+	+	+	+	+/-	+	-	+
I/RHO/VE/93/chipo	13/++	1/+	1/+	+/-	+	+	+	+	+/-	+	-	+
M/HOM/VE/94/GBA	8/++	1/+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
M/HOM/VE/93/NP	356/++++	1/++	+	7/+	+	+	+	+	+	+	-	+
M/DID/VE/92/DmI	3/++	2/+	-	2/+	+	1/+	+	+	+	+	-	+
M/HOM/BR/50/Y*	6/++	3/+	1/+	1/+	+	+	+	+	+	+	-	+

C: corazón; ME: músculo esquelético; E: esófago; V; vejiga; ID: intestino delgado; IG: intestino grueso; T: testículo; R: riñón; B: bazo; P: páncreas; CE: cerebro; H: hígado.

++++ = Intenso infiltrado celular.

+++ = Moderado infiltrado celular.

++ = Discreto infiltrado celular.

+ = Infiltrado celular de variable intensidad.

*: Referencia internacional.

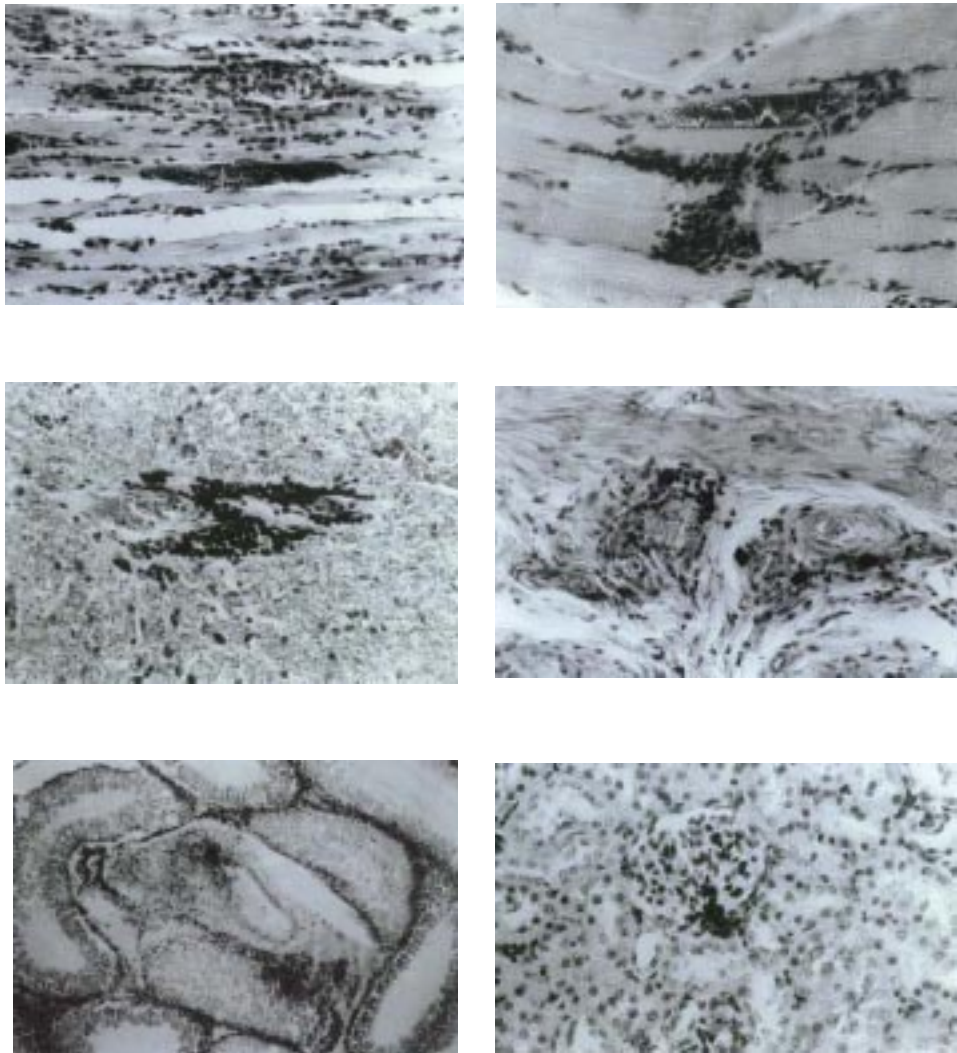


Figura 2.- Cortes de fragmentos de: Corazón (a), musculos esqueléticos (b), hígado (c), vejiga (d), testículo (e), y riñón (f) de ratas “Wistar” infectadas con diferentes aislados de *Trypanosoma cruzi*, con 18 y 30 días post-infección. (GIEMSA, 400X).

virulencia y patogenicidad en modelos vertebrados, habiéndose relacionado tales variaciones con las características genéticas tanto del parásito como las presentadas por el hospedador utilizado (Deane & Deane, 1963; Sogayar, 1981; Lauria-Pires & Teixeira, 1996). Por otra parte, diversos autores consideran que la rata albina, reproduce con gran semejanza el espectro patológico que predomina en la infección chagásica humana (Scorza, 1982; Gotberg *et al.*, 1988; Moreno *et al.*, 1996). Estas observaciones precisan corroborarse con los resultados discutidos en el presente trabajo utilizando el modelo rata Wistar y aislados de *T. cruzi* de

diferentes fuentes recientemente obtenidos de áreas endémicas para la enfermedad de Chagas en el Occidente de Venezuela.

Los aislados de *T. cruzi* obtenidos de casos agudos humanos, animales domésticos, vectores selváticos y reservorios, produjeron infecciones con parasitemias patentes entre los 12 y 45 días post-infección, mortalidad de hasta un 16,7 %, significativa linfocitosis y neutropenia en la fase aguda y subaguda de la infección, incremento en los títulos de anticuerpos e invasión temprana a tejidos con formación de

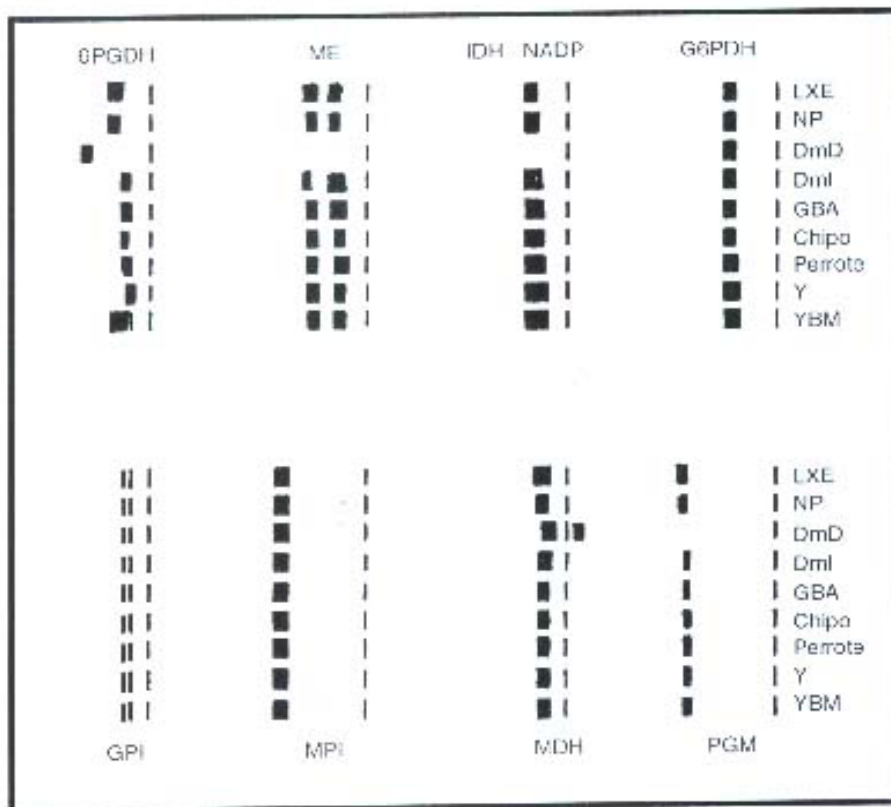


Figura 3.- Representación Diagramatica de los patrones isoenzimaticos de 8 enzimas de los aislados de *Trypanosoma cruzi* del estado Barinas, Venezuela.

numerosos nidos de amastigotos en la mayoría de los órganos estudiados y moderada patología en todos los animales experimentales. Por otro lado, los aislados de cánidos, félidos y triatomíneos fueron igual en virulencia y patogenicidad a los aislados obtenidos de casos agudos humanos. Esto confirma que la especie de *T. cruzi* puede estar compuesta de poblaciones genéticamente heterogéneas. Tal heterogeneidad, estudiada por Miles *et al.*, (1980) y Tybairenc *et al.*, (1986) por análisis isoenzimático de diferentes cepas de *T. cruzi*, puede ser debida, cuando menos en parte a la adaptación por selección natural a los diferentes ciclos de transmisión.

En relación con las alteraciones hematológicas observadas durante el curso de infecciones naturales con *T. cruzi*, (Rassi *et al.*, 2000) señalan alteraciones en el hemograma con discreta a moderada leucocitosis y eventualmente leucopenia. La linfocitosis, neutropenia, plasmocitosis y eosinofilia son los signos más comunes observados en la fase aguda de esta enfermedad. Efectivamente, nuestros resultados evidencian una significativa linfocitosis y neutropenia durante las fases

aguda y subaguda de la infección chagásica en el modelo experimental utilizado, mientras que el resto de las células blancas no se vieron alteradas significativamente respecto a los valores normales. Tal alteración hematológica parece estar relacionado con los mecanismos relevantes de la respuesta inmune (Kierszenbaum & Stein, 1994). Igualmente, Boneccini *et al.*, (1990) y Pung *et al.*, (1988) trabajando con monos infectados experimentalmente con *T. cruzi*, observaron durante la fase aguda de la infección chagásica una disminución en el número de eritrocitos y en los niveles de hemoglobina, y un aumento significativo de leucocitos y linfocitos desde la quinta semana hasta los tres meses post- infección. Por otro lado, ratones infectados con formas sanguíneas del parásito, mostraron cambios hematológicos consistentes relacionados con la disminución del número de células mononucleares incluyendo monocitos, linfocitos y células no diferenciadas, mientras que el nivel de granulocitos no mostró cambios significativos, pero sí, un aumento de los eosinófilos en los frotis de médula ósea (Cardoso & Brener, 1980).

Anticuerpos específicos anti-*T. cruzi* han sido

demostrados en casos humanos y en diferentes especies de animales infectados con *T. cruzi* (Brener, 1987; Scorza, 1982; Lana *et al.*, 1991). En este trabajo los anticuerpos humorales fueron detectados en todos los grupos experimentales a partir de los 12 y 18 días pi, los cuales aumentaron progresivamente en la medida en que se incrementó la parasitemia. Cuando la parasitemia pasó a ser subpatente los anticuerpos anti-*T. cruzi* permanecieron en títulos elevados en la sangre circulante, lo que facilitó que las reacciones serológicas continuaran detectándolos. En general, el comportamiento de la respuesta humoral fue similar en todos los grupos estudiados, sin embargo no fue esa respuesta suficiente para controlar la evolución de la histopatología miocárdica (Scorza, 1982, Moreno *et al.*, 1999).

La mayor parasitosis tisular fue evidenciada durante la infección chagásica aguda a nivel del tejido muscular cardíaco y esquelético y en menor grado en las capas musculares lisas del esófago, intestino delgado, colon y vejiga urinaria en los grupos de ratas inoculados con formas metacíclicas de los aislados YBM, DmD, Perrote y LXE, los cuales presentaron los más altos niveles de parasitemia y mortalidad. El aislado NP presentó discreta parasitemia y ninguna mortalidad durante el período agudo pero sí intensa parasitosis cardíaca y grandes nidos de amastigotos. Esta observación coincide con lo indicado por Cover *et al.*, (1978) quienes señalaron que la predilección por un tejido en particular varía durante la infección y que elevadas parasitemias en la sangre no siempre significan la presencia de alta infección tisular; los autores observaron en ratas que mostraron discretas parasitemias una intensa parasitosis en el corazón y músculo esquelético. Igualmente, los parásitos de la cepa Y de *T. cruzi* considerada como reticulotrópica en el ratón por Silva & Nussenzweig, (1953), mostraron igual predilección por el tejido muscular con moderado parasitismo en el corazón, discreto en el músculo esquelético y musculatura lisa del esófago y vejiga. Estos hallazgos coinciden con los resultados publicados por Scorza (1982), Sogayar (1981) y Moreno *et al.*, (1999).

Los hallazgos histopatológicos durante las fases aguda, subaguda y crónica, fueron similares en todas las ratas infectadas con los diferentes aislados de *T. cruzi*. Observamos invasión temprana de parásitos al corazón y establecimiento de una miocarditis y miositis aguda de intensidad variable a partir de los 18 días de infección, con abundantes nidos de amastigotos en algunos casos y un proceso inflamatorio linfomonohistiocitario focal y/o difuso. Después de los 60 días, el cuadro histopatológico mostró discretos focos inflamatorios y fibrosis focal. La coexistencia de nidos

de amastigotos con infiltrado inflamatorio fue considerada por Molina *et al.*, (1987) como un argumento que soporta el papel de los parásitos en la producción de la inflamación local; en nuestro caso estos dos tipos de procesos coexisten en el mismo período de tiempo y en la misma área muscular.

El estudio histopatológico de las secciones de esófago, intestinos y vejiga, mostraron moderado parasitismo acompañado de un infiltrado celular de intensidad y extensión variable así como destrucción de fibras musculares, plexos nerviosos y dilatación de estos órganos. Estas localizaciones son independientes de la virulencia y origen de los aislados utilizado. Las secciones de hígado, bazo, páncreas, riñón, testículo y cerebro, reveló ausencia de parasitismo tisular, presencia de infiltrado celular de intensidad y extensión variable, dependiendo del órgano y del aislado de parásitos utilizado. Estos resultados sugieren que los parásitos de los diferentes aislados invadieron transitoriamente estos órganos, pero fueron rápidamente eliminados por los mecanismos inmunológicos de la rata (Scorza, 1982; Moreno *et al.*, 1999).

La virulencia, el histotropismo y la patogenicidad como expresión del comportamiento biológico de los aislados de *T. cruzi* en el modelo rata Wistar fueron similares, mientras que los patrones isoenzimáticos se mostraron de manera diferente en los aislados YBM y DmD respecto a la enzima 6PGDH. El aislado DmD también mostró diferencias en los loci enzimáticos PGM, IDH-NADP, MDH, MPI y 6PGDH. Estas diferencias bioquímicas sugieren que los aislados de *T. cruzi* son marcadamente hetero-géneos, aún cuando provengan de la misma especie de hospedador y de la misma región geográfica. Esta heterogeneidad podría explicarse de acuerdo con la siguientes hipótesis propuesta por Tibayrenc *et al.*, (1986): la larga evolución clonal condujo a un grado de diferenciación tal que uno pudiera encontrar grupos de clones bioquímicamente similares, relacionados con sus propiedades biológicas. Tal sería el caso de los aislados LXE, GBA, NP, Perrote, Chipo, DmI y Y. Pero ¿Cuál es la explicación para el resto de los aislados?. Una segunda hipótesis plantea que por selección natural se ha promovido la adaptación de clones particulares al hombre y a los ciclos domésticos mientras que otros se adaptaron a otros ciclos silvestres. Por eso es que, según estas hipótesis, dos cepas isoenzimáticamente similares o idénticas, podrían manifestar dos comportamientos biológicos distintos, digamos un mismo zimodemo encontrado en el domicilio y peridomicilio y también encontrado en un ciclo silvestre; mientras que en el ciclo domiciliario, uno podría encontrar comportamientos bioquímicos diferentes

asociados con un mismo comportamiento biológico, como lo observado con los aislados YBM y DmD.

Finalmente, los resultados discutidos en el presente trabajo, contribuyen con importantes conocimientos y ayudan en parte a interpretar la epidemiología de la enfermedad de Chagas en áreas endémicas del piedemonte oriental de la Cordillera de los Andes y en áreas de sabana de donde provienen los aislados de *T. cruzi* estudiados. Por otro lado, reafirmamos que la asociación rata Wistar- *T. cruzi* es un modelo experimental adecuado para reproducir con gran semejanza el cuadro evolutivo de la infección chagásica humana.

SUMMARY

The behaviour of eight *T. cruzi* isolates from humans, opossums, dogs, and triatomine vectors was experimentally studied in male Wistar rats. Enzyme profiles using the PGM, GPI, IDH-NADP, ME, MDH, G6PDH, MPI, and 6PHDH system are presented. Male Wistar rats were inoculated intradermally with metacyclic trypomastigotes from each of the isolates. The study consisted of an estimation of the course of parasitemia, mortality rate, the humoral response, the hemogram, the tissue tropism, and the histopathology in infected rats. Rats not inoculated with parasites and the Y strain of *T. cruzi* were used as controls. Parasitemia was detected in all rats between 12 and 45 days post-inoculation, being the highest levels (44 and 468 trypomastigotes/mm³ of blood) observed between 18 and 24 days post-inoculation. Mortality rates as high as 13.3 and 16.7 % were observed in rats infected with the isolates (YBM, DmD and Chipó). Detectable anti-*T. cruzi* antibodies appeared between 12 and 18 days, and the highest titers (1:2048 and 1:4096) were measured between 30 and 90 days. These levels remained high during 180 days of observation. There was a significant increase in lymphocyte counts and a decrease in neutrophil counts ($P < 0.001$) during the acute and late acute phases of the infection, and these values returned to normal by 90 days after inoculation. Moderate to severe myocarditis and myositis were present in all animals at 18 days after inoculation, with variable intensities of tissue tropisms involving the heart, skeletal and smooth muscles, and focal cardiac fibrosis after 60 days. Isoenzyme analysis showed that the YBM and DmD isolates had different 6PGDH patterns. Five isoenzyme patterns were different in the DmD isolate (PGM, IDH-NADP, MDH, MPI, 6PGDH). These findings indicate that *T. cruzi* isolates are markedly heterogeneous, even when isolated from the same species of host and the same geographical

region.

KEY WORDS: *Trypanosoma cruzi*, biological behaviour, chagasic infection, Wistar rat, isoenzyme patterns, Wistar rat, Venezuela.

AGRADECIMIENTOS

Financiado por el CDCHT de la Universidad de Los Andes a través de los Proyectos C-733-95-03-C y C-909-98-03A. Investigaciones Parasitológicas "J.F.Torrealba", Departamento de Biología, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de los Andes, Mérida-5101-Venezuela.

REFERENCIAS

- Andrade S.G., Andrade V., Brodskin C., Magalhaes J.B. & Barral Neto M. (1985). Immunological response of Swiss mice infected with three different strains of *Trypanosoma cruzi*. *Ann. Trop. Med. & Parasitol.*, **79**: 397 - 407.
- Añez N., Carrasco H., Parada H., Crisante G., Rojas A., González N., Ramírez J.L., Guevara P., Rivero C., Borges R. & Scorza J.V. (1999). Acute Chagas' disease in western Venezuela: a clinical, seroparasitologic, and epidemiologic study. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **60**: 215 - 222.
- Bray R. & Garnham P.C.C. (1962). The Giemsa-cytophonium method for staining protozoa in tissue section. *Indian J. Malariol.*, **16**: 152 - 155.
- Bonecini A.M.G., Galvao-Castro B., Pessoa N.H.R., Pirmez C. & Laranja F. (1990). Experimental Chagas' disease in *Rhesus* monkey I. Clinical, parasitological, hematological and anoto-mopathological studies in the acute and indeterminate phase of the disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **85**: 163 - 171.
- Brener Z. (1962). Observacoes sobre a imunidade a superinfeccoes em camundongos experimentalmente inoculados con *Trypanosoma cruzi* e submetidos a tratamento. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, **4**: 119 - 123.
- Brener Z. (1987). Pathogenesis and Immunopathology of cronic Chagas' disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Suppl.*, **82**: 205 - 213.
- Camargo M.E. (1966). Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of american trypanosomiasis, technical

- modification employing preserved culture forms of *Trypanosoma cruzi*. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, **8**: 227 - 234.
- Cardoso J.E. & Brener Z. (1980). Hematological changes in mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, **75**: 97 - 104.
- Carneiro M., Romanha A.J. & Chiari E. (1991). Biological characterization of *Trypanosoma cruzi* strains from different zymodemes and schizodemes. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, **86**: 387 - 393.
- Chagas C. (1909). Nova trypanosomiase humana: estudo sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiologico de nova entidade morbida no homen. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, **1**: 159
- Cover B. & Gutteridge W.E. (1978). The course of infection of *Trypanosoma cruzi* in irradiated rats. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., **72**: 596 - 601.
- Cupolillo E., Grilamaldi G. & Momen H. (1994). A general classification of new world Leishmania using numerical zymotaxonomy. Am. J. Trop. Med. Hyg., **50**: 296 - 311.
- Cupolillo E., Grilamaldi G. & Momen H. (1995). Discrimination of Leishmania isolates using a limited set of enzymatic loci. Ann. Trop. Med. Parasitol., **89**: 17 - 23.
- Deane M. & Deane L. (1963). Pathogenicity to mice of some strains of *Trypanosoma cruzi* isolated from wild animals of Brazil. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, **5**: 225-235.
- Duarte Fernandes C., Fonseca M. S. M., Pena C.I., Percival K.L., Vidigal, P.G., Steindel M., Nardi N. & Romanha A.J. (1997). Characterization of *Trypanosoma cruzi* strains isolated from chronic chagasic patients, triatomines and opossums naturally infected from the State of Rio Grande do Sul, Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, **92**: 343 - 351.
- Gottberg C., Donis J.H., Torres A., Fuenmayor A.J. & Dávila D. (1988). Heart rate changes in rats with acute chagasic myocarditis. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., **82**: 851.
- Grimaldi G. & Momen H. (1989). Enzyme electrophoresis evidence for the importation of *L. infantum* into the new world. Hart Dt. de Leishmaniasis. New York: Plenum, 911 - 919.
- Kierszenbaum F., Mejia Lopez H. & Szein M.B. (1996). *Trypanosoma cruzi* Downregulates the production of interleukin-2, Interferon- γ , Interleukin-4 and interleukin - 5 by activated human lymphocytes. J. Parasitol., **82**: 652 - 656.
- Kleinbaum D., Kupper L., Muller K.E. & Nizam A. (1998). Applied regression analysis and other multivariable methods. Third Edition. Duxbury Press. An international Thomson Publishing Company, Boston.
- Lana M., Vieira L.M., Machado-Coelho L.L., Chiari E., Veloso V.M. & Tafuri W.M. (1991). Humoral immune response in dogs experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, **86**: 471 - 473.
- Lauria-Pires L. & Teixeira A.R. (1996). Virulence and pathogenicity associated with diversity of *Trypanosoma cruzi* stocks and clones derived from Chagas' disease patients. Am. J. Trop. Med. Hyg., **55**: 304 - 310.
- Miles M.A., Lanham S.M., De Souza A.A. & Pova M. (1980). Further enzymic characters of *Trypanosoma cruzi* and their evaluations for strains identification. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. & Hyg., **74**: 221 - 237.
- Molina H.A., Cardoni R.L. & Rimoldi M.T. (1987). The neuromuscular pathology of experimental Chagas' disease. J. neurol. Sci., **58**: 17 - 31.
- Moreno E.A., Añez N., Gottberg C., Scorza C., Lugo de Y.A. & Dávila D. (1996). Modificaciones electrocardiográficas en ratas infectadas con formas sanguíneas de *Trypanosoma cruzi*. Bol. Dir. Malaria. San Amb., **36**: 70 - 77.
- Moreno E.A., Añez N., Scorza C., Lugo de Y.A. & Borges R. (1999). Efecto de inóculos bajos en la infección experimental por *Trypanosoma cruzi*. Bol. Dir. Malaria. San Amb., **39**: 1 - 9.
- Parada H., Carrasco H.A., Añez N., Fuenmayor C., de Arriaga A., Palacios E. & Aguilera M. (1996). La enfermedad de Chagas aguda. Características clínicas, parasitológicas e histopatológicas. Avances Cardiol., **16**: 10 - 17.
- Pizzi T. (1957). Inmunología de la Enfermedad de Chagas. Universidad de Chile, Santiago, 183 pp..

- Pungo O.J., Hulsebos L.H. & Kuhn R.E.(1988). Experimental Chagas' disease (*Trypanosoma cruzi*) in the brazilian squirrel monkey (*Saimiri sciureus*): hamatology, cardiology, celular and humoral immune responses. *Int. J. Parasitol.*, **18**: 115 - 120.
- Rassi A., Rassi A.J. & Rassi G.G. (2000). Fase aguda. In Brener/Andrade/Barral-Neto. *Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas*. 2° Ed. Editorial Guanabara Koogan S.A, Río de Janeiro, 231 - 245.
- Silva L.H. & Nussenzweig V.(1953). Sobre una cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. *Fol. Clin. Biol.*, **20**: 191 - 207.
- Scorza C. (1982). La rata "Wistar" como modelo experimental para el estudio de la miocarditis chagásica: aspectos histopatológicos, histoquímicos, inmunológicos y electro-cardiográficos en diferentes etapas de la infección. Trabajo de Ascenso, Dpto. de Biología, Fac. de Ciencias, ULA,101 pp.
- Sogayar R. (1981). Infecao experimental de ratas albinos Wistar com diferentes cepas de *Trypanosoma cruzi* (Chagas,1909) .*Rev. Path. Trop.*, **10**: 119 - 180.
- Storni P.D., Bolsi F.L. & Yanovsky J.V. (1975). Reacción de aglutinación directa para diagnóstico de la enfermedad de Chagas. Utilización sistemática del 2-Mercapto-etanol para la eliminación de las aglutininas inespecíficas. *Medicina (B. Aires)*, **35** : 67 - 71.
- Tibayrenc M., Ward P., Moya A. & Ayala F. (1986). Natural populations of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease, have a complex multiclonal structure. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **83**: 115 - 119.
- WHO. (1991). Control of Chagas' disease. Technical Report Series 811.
-