

# Las poblaciones de *Trypanosoma cruzi* presentes en circulación difieren de aquellas encontradas en el corazón y en el músculo esquelético del mismo huésped durante la etapa aguda de la infección experimental

Moya Diego, Esteves Blanca, Bazán Carolina, Báez Alejandra, Strauss Mariana, Miler Noemí, Rivarola Walter, Paglini Patricia, Lo Presti Silvina. Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud (INICSA) – Cátedra de Física Biomédica, FCM-UNC/CONICET

## 1. Introducción

Diversos estudios han demostrado la alta incidencia de infecciones mixtas (con varias cepas o aislamientos de *Trypanosoma cruzi* en un mismo individuo) en humanos y vectores, parámetro que podría influir en la evolución de la enfermedad de Chagas.

Así, la amplia gama de signos clínicos que caracterizan a esta enfermedad puede explicarse en parte por la heterogeneidad genética del parásito y por la distribución de estos diferentes clones en un mismo individuo.

Una de las diferencias que presentan las distintas cepas del parásito es un marcado tropismo tisular diferencial a los órganos del huésped que puede variar en los distintos momentos de la infección

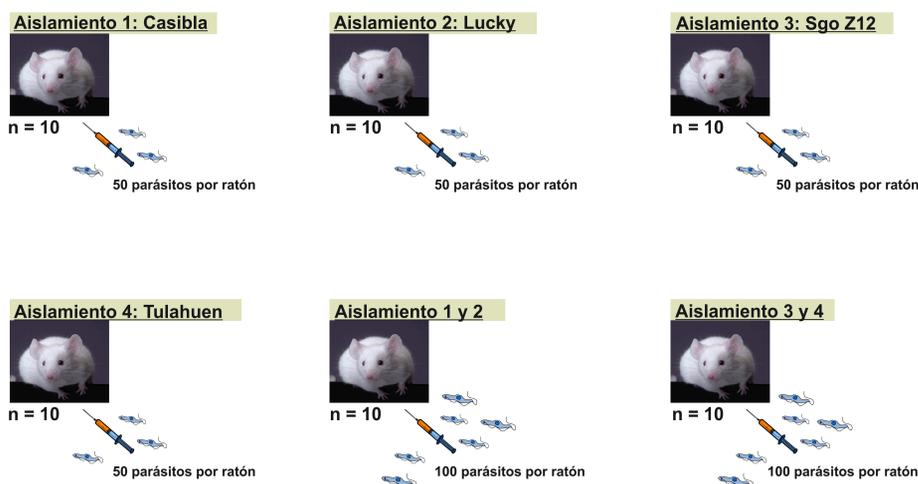
### Objetivos:

- Determinar la distribución y presencia de tres aislamientos de *T. cruzi* (Lucky, Casibla, SGO Z12) en sangre, corazón y músculo esquelético (ME) durante la etapa aguda de la infección experimental (35 días post infección). Se utilizó para comparar la infección una cepa control (Tulahuen).

- Determinar el linaje al que pertenecen los aislamientos por PCR.

- Caracterizar los aislamientos en cada tejido mediante la digestión con enzimas de restricción.

## 2. Materiales y métodos



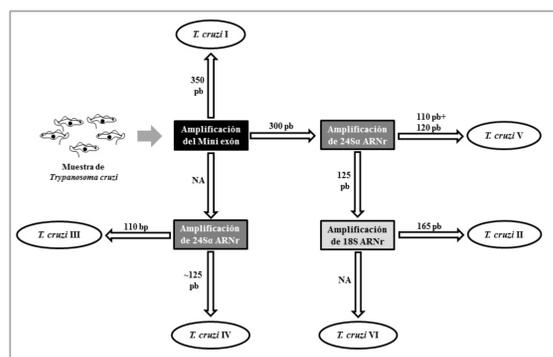
- Estudios histológicos: Las muestras de corazón y ME de los ratones infectados fueron fijadas en formol bufferado (10%) y embebidas en parafina. Los cortes de 5 µm de espesor fueron coloreados con hematoxilina-eosina. Un total de 50 cortes de cada órgano de cada grupo fueron analizados con objetivo de 10X, 20X y 40X.

- Cuantificación de infiltrados inflamatorios: para cuantificar el área cubierta por infiltrados inflamatorios en los cortes de corazón y músculo esquelético, se analizaron las fotografías tomadas a un aumento 4X con el programa AxioVision 4.0.

- Extracción del ADN de muestras de sangre y de tejido: las muestras de sangre de cada ratón se mezclaron con igual volumen de guanidina 6M/EDTA 0,2M y las muestras de tejido (corazón y ME) se procesaron mediante lisis con CTAB (bromuro de cetil-trimetilamonio).

- El ADN se extrajo por técnicas convencionales con fenol: cloroformo: alcohol isoamílico y luego se precipitó con etanol. Finalmente la solución se resuspendió en agua estéril libre de nucleasas.

- Caracterización del linaje de *T. cruzi* al que pertenece cada aislamiento mediante PCR: la presencia y caracterización del *T. cruzi* en las muestras de sangre y de tejido de cada ratón se determinará mediante la amplificación por PCR de tres fragmentos diferentes ( miniexon , 24S y 18S) que permiten, en conjunto, determinar el grupo de *T. cruzi* al que pertenecen dichos aislamientos.



Algoritmo utilizado para la clasificación el linaje de *T. cruzi* utilizando tres marcadores moleculares. NA: no amplifica; pb: pares de bases.

- Electroforesis en gel de agarosa: las bandas obtenidas se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa 1,2 % en buffer TAE (Tris 40 mM, acetato 40 mM, EDTA 1 mM) en presencia de bromuro de etidio (1 µg/mL). Los geles fueron examinados utilizando un transiluminador LabNet.

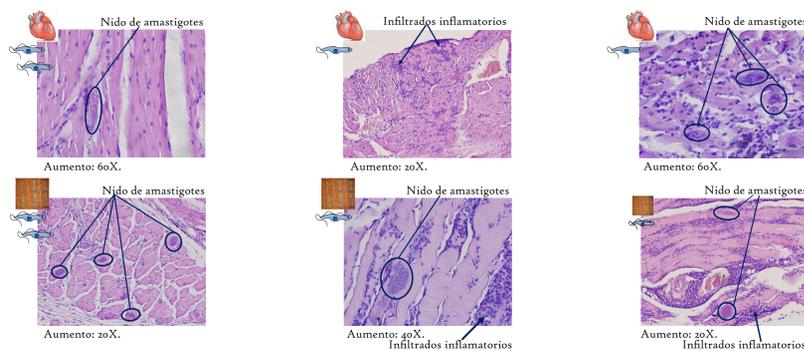
Digestión con enzimas de restricción: la caracterización de los parásitos de cada muestra se realizó mediante el análisis de los fragmentos producidos luego de la digestión con enzimas de restricción (RFLP). El amplificado producto de la distintas PCRs descriptas en el punto anterior se utilizó para la digestión con enzima de restricción Bce AI, y los fragmentos obtenidos separados por electroforesis en geles de agarosa al 3%, teñidos con bromuro de etidio.

## 3. Resultados

### Estudio histológicos y presencia de *T. cruzi*

Aislamiento	Corazon	Infiltrado inflamatorio			Nidos de amastigotes		
		1	2	3	1	2	3
Casibla	Corazon	+	+	+++	-	-	-
	ME	+	+	++	-	-	+
Lucky	Corazon	++	++	+++	-	+	+
	ME	+++	++	++	+	-	+
SGO Z12	Corazon	+	Sd	Sd	-	Sd	Sd
	ME	++	Sd	Sd	-	Sd	Sd
Tulahuen	Corazon	+	++	+	-	+	+
	ME	+++	++	++	+	++	++
Casibla y Lucky	Corazon	+	+	+	+	+	-
	ME	+++	+	++	++	++	Sd
SGO Z12	Corazon	+	+	++	-	+	+
	Tulahuen	+++	++	+++	+++	++	++

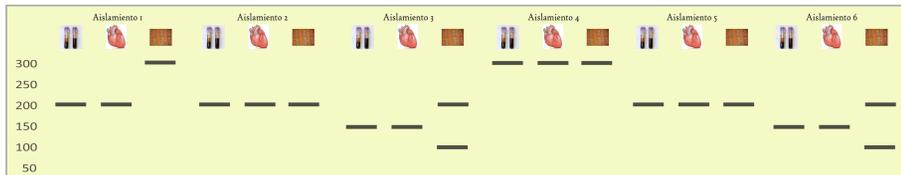
Se muestran los resultados de 3 ratones de cada grupo. Infiltrados inflamatorios: (+) leves; (++) moderados; (+++) severos. Nidos de amastigotes: (-) ausencia; (+) presencia de pocos nidos (1 ó 2 por campo); (++) presencia de muchos nidos (3 ó más por campo); (sd) sindatos.



### Detección de *T. cruzi* y caracterización molecular del linaje presente en cada órgano mediante PCR

Aislamiento	TCZ	Raton 1			Raton 2			Raton 3		
		Sangre	Corazon	M. E.	Sangre	Corazon	M. E.	Sangre	Corazon	M. E.
Casibla	TCZ	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Mini-exon	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	24 S	125	125	125	125	125	125	125	125	125
	18 s	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Linaje de <i>T. cruzi</i>		II	II	VI	II	II	II	II	Vo VI	II
Lucky	TCZ	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Mini-exon	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	24 S	125	130	125	125	125	125	125	125	130
	18 s	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Linaje de <i>T. cruzi</i>		II o VI	IV	II	II	II	II	II	II	IV
Tulahuen	TCZ	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Mini-exon	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	24 S	110	110	110	110	110	110	110	110	110
	18 s	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Linaje de <i>T. cruzi</i>		v	v	v	v	v	v	v	v	v
Sgo Z12	TCZ	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Mini-exon	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	24 S	125	125	125	125	125	125	125	125	125
	18 s	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Linaje de <i>T. cruzi</i>		II	II	VI	II	II	VI	II	II	-
Lucky-Casibla	TCZ	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Mini-exon	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	24 S	125	125	125	125	125	125	125	125	125
	18 s	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Linaje de <i>T. cruzi</i>		II	II	IV	II	II	II	Vo VI	II	II
Tulahuen Zimodena 12	TCZ	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Mini-exon	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	24 S	125	125	125	125	125	125	125	125	125
	18 s	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Linaje de <i>T. cruzi</i>		VI	VI	VI	VI	VI	VI	VI	VI	VI

### Caracterización mediante encima Bce AI



Perfil esquemático de bandas obtenidos luego de la digestión del gen del miniexón con la enzima de restricción Bce AI en los distintos grupos estudiados.

## 4. Conclusión

Los presentes resultados muestran una distribución tisular del parásito aún desde etapas tempranas de la infección.

La presencia de nidos de amastigotes en corazón confirma el cardiotropismo y nos permite postular que algunos aislamientos del parásito pueden evadir las defensas del tejido cardíaco, propuestas por algunos autores como protectoras de este órgano.

La presencia de parásitos en los cortes de ME por otro lado, confirma la importancia de este órgano como reservorio de parásitos.

El grupo infectado con una mezcla de ambos aislamientos, presentó infiltrados inflamatorios más intensos y nidos de amastigotes más frecuentes que los grupos infectados con sólo un aislamiento del parásito. Además los aislamientos utilizados demostraron presentar una mezcla de linajes, lo que resalta la importancia de los presentes resultados para aquellos pacientes de área endémica con alta probabilidad de tener infecciones mixtas.