

***Trypanosoma cruzi*: Especificidad de los Tripomastigotes Metacíclicos por las Células Endoteliales**

Trypanosoma cruzi: Specificity of the metacyclic trypomastigots
for the endothelial cells
(Nota científica)

Rodolfo Pérez-Reyes* †, Sebastián Castillo**, Angel Licón*,
Ernesto Ramos Martínez*

RESUMEN

Se presenta una investigación sobre la posibilidad de que los tripomastigotes metacíclicos de *Trypanosoma cruzi* tengan una especificidad por las células endoteliales. Aún no se han identificado definitivamente las células que invade el parásito para realizar su primer ciclo reproductor. En experimentos con cultivos celulares, se ha observado que tanto los tripomastigotes sanguíneos como los metacíclicos, pueden invadir una gran variedad de células. De las tres poblaciones de *T. cruzi* estudiadas, en dos de ellas, la primera generación de amastigotes se encuentran en células endoteliales. En ese caso, a los 5 días PI, se encontraron células endoteliales con grandes nidos conteniendo tripomastigotes metacíclicos. Si eso mismo sucede con otras poblaciones de *T. cruzi* se podría concluir que los metacíclicos tienen una especificidad mayor que los tripomastigotes sanguíneos. Si se pretende preparar una vacuna que impida el establecimiento del parásito, será necesario conocer previamente la afinidad de los metacíclicos en las poblaciones locales de *T. cruzi*.

Palabras clave: *Trypanosoma cruzi*, Tripomastigotes metacíclicos, células endoteliales.

ABSTRACT

Are done a research on the possibility that the metacyclic trypomastigots of *Trypanosoma cruzi* have a specificity for the endothelial cells. Until today is unknown the cells that use the parasite to do its first reproductive cycle. In experiments with cell cultures, it has been observed that both, blood and metacyclic trypomastigots are able to invade a great variety of cells. In two of the three populations of *T. cruzi* study, the first generation of amastigotes, are in endothelial cells. In the case, of 5 days PI, are found endothelial cells with big nests with metacyclic trypomastigots. If is also the case for other *T. cruzi* populations, is possible deduce that the metacyclic have a higher specificity that blood trypomastigots, and that when preparing a vaccine designed, not only to diminish the acute phase of the disease, but also to prevent the establishment of the parasite, it will be necessary to know previously which are the affinities of metacyclic in local populations of *T. cruzi*.

Key word: *Trypanosoma cruzi*, Metacyclic trypomastigots, Endothelial cells.

* Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Chihuahua.

† Falleció el 28 de mayo de 1996 (Ver este volumen).

** Departamento de Patología, Hospital de Oncología,
Instituto Mexicano del Seguro Social, México, D.F.

Introducción

Los parasitólogos que estudian la enfermedad de Chagas, están de acuerdo en que durante el ciclo normal, los tripomastigotes metacíclicos infectan al mamífero penetrando a través de abrasiones de la piel o mucosas intactas. Sin embargo no se han identificado definitivamente las células que invade el parásito para realizar su primer ciclo reproductor. Por ejemplo Nogueira y Rodríguez Coura (1984) dicen simplemente que: "invade cells", sin ninguna especificación. Otros autores señalan a las células del tejido conjuntivo (Pereira de Silva y Camargo, 1968) o a células del "tejido laxo" (Atias y Apt, 1991).

En experimentos con cultivos celulares, se ha observado que tanto los tripomastigotes sanguíneos como los metacíclicos, pueden invadir una gran variedad de células (Neva *et al.*, 1968; Nogueira y Cohn, 1972), incluso células endoteliales (Tanowitz *et al.* 1992). Se ha considerado que esto mismo ocurre en la naturaleza, pero las condiciones experimentales pueden alterar el comportamiento de los parásitos. Sin embargo algunos autores consideran que esto mismo puede ocurrir en condiciones naturales (Andrews y Colly, 1982, 1984).

Además, debe recordarse que el origen de los tripomastigotes sanguíneos y metacíclicos es totalmente diferente, pues los primeros se forman en células de tejidos de mamíferos y los segundos en el recto del invertebrado transmisor y por lo tanto es válido suponer que ambas fases pueden tener proteínas superficiales diferentes. Incluso hay observaciones que apoyan esta suposición. Así, Nogueira *et al.*, (1982) describen una proteína de 72kDa, que se encuentra en tripomastigotes metacíclicos, pero no en los sanguíneos.

En este contexto, se puede suponer que los tripomastigotes tengan preferencia por cierto tipo de células para efectuar su primer ciclo reproductor en el huésped vertebrado. Para aclarar este punto se realizaron las observaciones que se describen a continuación.

Material y Métodos

Se utilizaron ratones blancos BALB/C, machos de 30-35 días de edad, infectados subcutáneamente en la cara interna del muslo con 50,000 tripomastigotes metacíclicos del clon A -1, "aislado" 21 de *Trypanosoma cruzi*. Este "aislado" se obtuvo a partir

de *Triatoma barberi*; capturado en una población cercana a la ciudad de Chilpancingo, Guerrero, hace 18 años.

Los flagelados se cultivaron por 12 días en el medio BHI suplementado con hemina (1 mg/100ml) y 10% de suero fresco de conejo. Los metacíclicos se purificaron en una columna de DEAE celulosa (Al Abbasy *et al.* 1972) y se contaron en una cámara de Neubauer.

Posteriormente se obtuvieron muestras de los tejidos infectados a 1, 2, 4, 8, 12, 24, 48, 72 y 96 horas post-infección (PI). La mitad de las muestras se fijaron con formalina al 10% en solución salina y posteriormente se procesaron con la técnica habitual de hematoxilina-eosina. La otra mitad de las muestras se fijaron en glutaraldehído al 2.5% en buffer de cacodilato y se procesaron para observarlas en un microscopio electrónico de transmisión Philips EM300, después de tinción con tungstato.

Resultados

Los parásitos fueron escasos en todos los casos, aún en las secciones observadas con microscopio óptico, particularmente en las primeras horas PI. A partir de las 48h PI, cuando los parásitos comenzaron a reproducirse, se observaron con mayor frecuencia.

Los "nidos" de amastigotes siempre se encontraron entre los miocitos, asociados a los capilares sanguíneos (Figs. 1 y 2), aún cuando es difícil identificar a la célula huésped. Sin embargo, al revisar un material antiguo, preparado con otros propósitos, de tejidos de ratones inoculados con el "aislado" (Apatzingán), obtenido a partir de *Triatoma pallidipennis*, capturados en Apatzingán, Michoacán, en una muestra obtenida 72 h. PI, se identificaron las células parasitadas, como células endoteliales de los capilares sanguíneos (Fig.3). En este mismo material, pero obtenido a los 5 días PI, es decir probablemente ya en el segundo ciclo reproductor (Pérez-Reyes, 1954.) los "nidos" de amastigotes se encuentran tanto en miocitos, como en células endoteliales.

Por otra parte, en las secciones de tejido obtenidas 1h PI y observadas con microscopio electrónico, se encontraron parásitos próximos a las células endoteliales (Fig. 4) y a las 24h PI, en el interior de esas células (Fig. 5). En las muestras posteriores no se encontraron parásitos.



Figura 1. "Nidos" de amastigotes entre los miocitos.



Figura 2. Amastigotes (flecha delgada) asociado a capilares sanguíneos (flecha gruesa) y situados entre los miocitos.



Figura 3. Células endoteliales de los capilares sanguíneos, parasitadas (flechas).

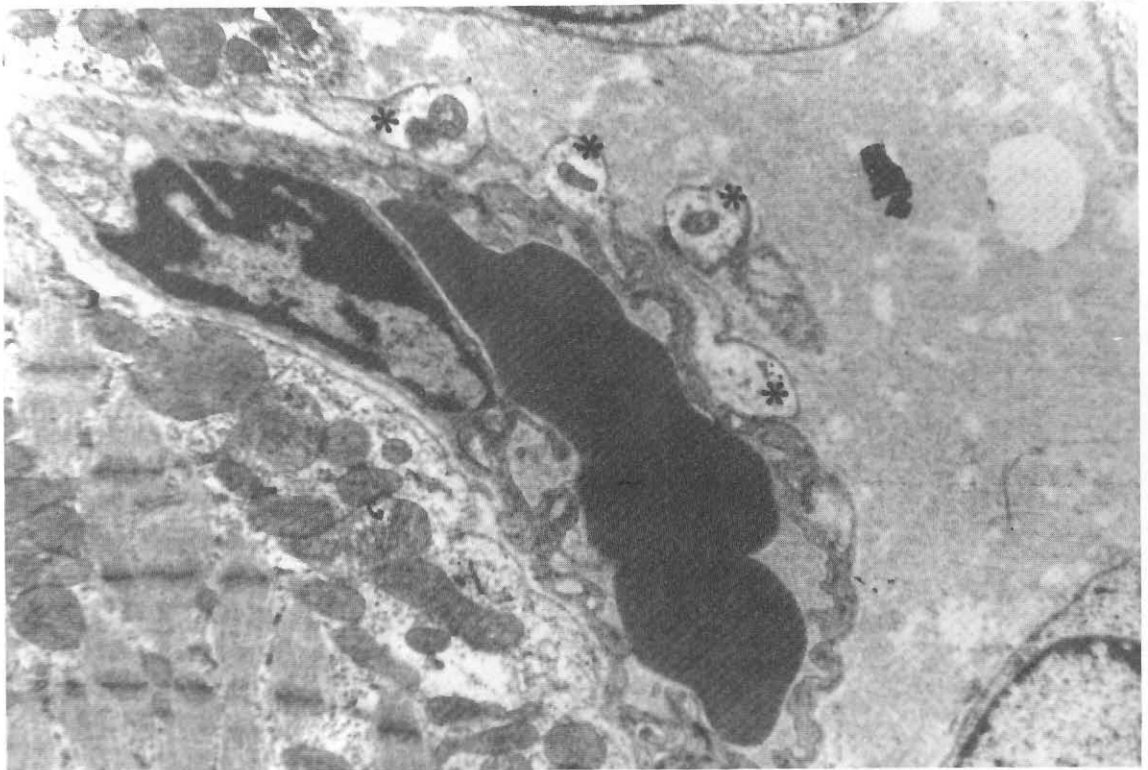


Figura 4. Parásitos próximos a las células endoteliales (estrellas).

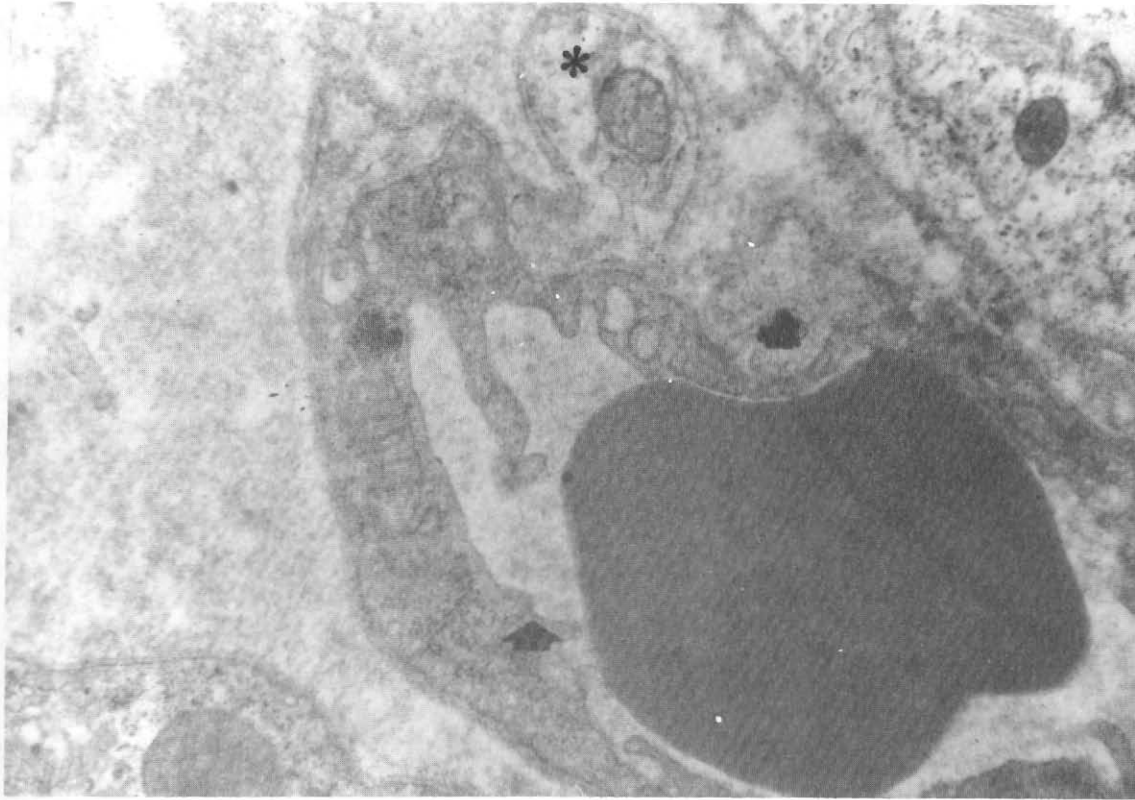


Figura 5. Párasitos en el interior de las células endoteliales (estrella).

En un material similar, obtenido de ratones inoculados con una población de *T. cruzi* obtenida de un caso humano de enfermedad de Chagas, localizado en el estado de Oaxaca, a las 72h PI, todos los parásitos se encontraron exclusivamente en miocitos.

Discusión

Una vez establecido en el vertebrado, *T. cruzi* se reproduce intracelularmente, principalmente en células del tejido muscular estriado (cardíaco y esquelético) aunque puede invadir otro tipo de células: músculo liso, sistema nervioso central, tejido hepático, entre otros. Esto parece depender del histotropismo de cada población del parásito (Hoare, 1972). Por tanto, los tripomastigotes sanguíneos deben tener capacidad para reconocer las células apropiadas para su desarrollo. Algo similar debe ocurrir con los tripomastigotes metacíclicos.

De las tres poblaciones de *T. cruzi* estudiadas, en dos de ellas, la primera generación de amastigotes

se encuentran en células endoteliales; en la tercera población, los parásitos derivados de los metacíclicos, se encuentran únicamente en células de músculo esquelético. Es importante insistir, en que esta especificidad se observa en la primera generación de parásitos, es decir, en los amastigotes que se encuentran en los primeros 4 días PI, según las observaciones "in vitro" realizadas por Dvorak (1977).

Los datos obtenidos coinciden en general con dicho autor, la primera generación de amastigotes completa su desarrollo en aproximadamente 4 días, quizá con la excepción de los parásitos procedentes de Apatzingán. En ese caso, a los 5 días PI, se encontraron células endoteliales con grandes "nidos" conteniendo tripomastigotes metacíclicos. Eso significa un día más para la maduración de la primera generación de amastigotes.

Si esto mismo sucede con otras poblaciones de *T. cruzi* se podría concluir que los metacíclicos tienen una especificidad mayor que los tripomastigotes sanguíneos y que si se pretende preparar una vacuna

que impida el establecimiento del parásito y no solamente disminuir la intensidad de la fase aguda del padecimiento, será necesario conocer previamente la afinidad de los metacíclicos en las poblaciones locales de *Trypanosoma cruzi*.

Literatura citada

- Al-Abbasy, S. N., T. M. Seed and J. P. Kraier. 1972.** Isolation of trypomastigotes from *Trypanosoma cruzi* from a mixture of the trypomastigote and epimastigote forms of the parasite by the use of a DEAE-cellulose column. *J. Parasitol.* 52:631-632.
- Andrews, N. W. and W. Colly. 1982.** Adhesion and interiorization of *Trypanosoma cruzi* in mammalian cell. *J. Protozool.* 29:264-269.
- Atias, A. and W. Apt. 1991.** Enfermedad de Chagas. In: Atias, A., Parasitología Clínica, 3a. ed. Publicaciones Técnicas Mediterraneo. Santiago, Chile.
- Dvorak, J. A. 1977.** Host-parasite relationships at cellular level in *Trypanosoma cruzi* infections. Chagas' disease. Pnam. Health Org. Scientific. Publ. No. 347. Washington, D. C., USA.
- Hoare, C. A. 1972.** The Trypanosomes of Mammals. Blackwell Scientific Publications. Oxford, U. K., pp. 327-380, Chapter X. The Stercoraria.
- Neva, F. A., M. F. Malone and B. R. Myers. 1968.** Factors influencing intracellular growth *Trypanosoma cruzi* in vitro. *Am. J. trop. Med. Hyg.* 10:140-154.
- Nogueira, N. and Z. Cohn. 1972.** *Trypanosoma cruzi*: mechanism of entry and intracellular fate in mammalian cells. *J. Exp. Med.* 142:1402-1420.
- Nogueira, N. and J. Rodríguez Coura (1984).** American Trypanosomiasis. Chagas' disease, pp. 253-269. In: Warren, K. S. and A. F. Tropical and Geographical Medicine. McGraw-Hill Book Company. New York, USA. 1984.
- Nogueira, N., J. Unkeless and Z. Cohn. 1982.** Specific glycoprotein antigens on surface of insect and mammalian stages of *Trypanosoma cruzi*. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA.* 79:1259-1263.
- Pereira de Silva L. H. and E. P. Camargo. 1968.** Ciclo evolutivo. In: Cancado, J. R. (Ed.) Doença de Chagas. Belo Horizonte, Brazil.
- Pérez Reyes, R. 1954.** La evolución de *Schizotrypanum cruzi* en ratones blancos. *Ciencia.* 13:218-226.
- Tanowitz, H. B., J. P. Gumprecht, D. Spurr, T. M. Calderón, M. C. Ventura, C. Reventos-Suarez, S. Kelli, S. M. Factor, V. B. Hatcher and M. Wittner. 1992.** Cytokine gene expression of endothelial cells infected with *Trypanosoma cruzi*. *J. Inf. Dis.* 166:598-603.