

## LA ENFERMEDAD DEL ADYUVANTE EN RATAS INFECTADAS EXPERIMENTALMENTE CON *TRYPANOSOMA CRUZI* (\*)

Silvia REVELLI (1), Oscar BOTTASSO (1), Hilda MORENO (2), José VALENTI (3), Analía NOCITO (3), Nelly AMERIO (1) & Julio MORINI (1)

### R E S U M E N

Se estudió la evolución de la artritis por adyuvante en ratas que habían sido infectadas previamente con *Trypanosoma cruzi*, con el objeto de evaluar su competencia inmunológica a través de la respuesta artrítica. La artritis por adyuvante se indujo en ratas adultas, endocriadas de ambos sexos, con 0.1 ml de adyuvante completo de Freund en la almohadilla plantar, en 2 lotes: a) inyectadas 90 días antes con  $1 \times 10^6$  *T. cruzi* y b) testigos normales simultáneos. Se midieron, la lesión artrítica macroscópicamente con una escala semicuantitativa, y con microscopía óptica la histopatología de la lesión local y la del corazón, a los 180 días post-infección. La magnitud de las lesiones artríticas en las ratas con *T. cruzi* fue significativamente menor ( $p < 0.001$ ) que la de los testigos, en todo el período. El infiltrado inflamatorio local, formado por linfocitos, plasmocitos y macrófagos fue significativamente menor ( $p < 0.001$ ) en las ratas chagásicas, con respecto al de los testigos. Se postula que en las ratas que recibieron *T. cruzi* la respuesta artrítica menor podría deberse a una competición antigénica con los determinantes del parásito o a mecanismos inmunosupresores que interfieren en la producción de la entidad experimental.

**UNITERMOS:** *Trypanosoma cruzi* — Infecção experimental em ratos Adyuvante de Freund

### I N T R O D U C C I Ó N

En 1956 PEARSON<sup>6</sup> demostró que la inyección intradérmica de adyuvante completo de Freund (ACF) en la pata producía artritis y periartrosis en ratas, fenómeno que denominó artritis por adyuvante (AA). Posteriormente se comprobó que se trataba de una enfermedad generalizada, ya que en algunos casos estaba acompañada de iridociclitis, lesiones nodulares en oreja y cola, rash cutáneo, lesiones genitourinarias y diarrea<sup>7</sup>. WAKSMAN & col.<sup>21</sup> postularon que este fenómeno podría deberse a una

reacción de hipersensibilidad retardada hacia la bacteria presente en el ACF o bien a algunos de sus constituyentes o sus metabolitos. En apoyo a esta teoría puede señalarse que la enfermedad se pudo transferir pasivamente con células de ganglio linfático, pero no con suero de animales sensibilizados. Además, se demostró que la misma puede inhibirse mediante la irradiación total (600 r) del animal de experimentación o con el empleo de corticoides antes de la inyección del adyuvante. También

(\*) Trabajo realizado en la División Inmunología, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Rosario Santa Fé 3100, Rosario (2000), Argentina

(1) Miembro de la Carrera del Investigador, UNR

(2) Miembro de la Carrera del Personal de Apoyo, CONICET

(3) Cátedra de Patología, Facultad de Ciencias Médicas, UNR

se verificó que si los animales se ponían en contacto con el bacilo de Koch o con la fracción Wax D del mismo, en los primeros días de vida o antes del desafío con ACF, se podía inducir un mecanismo semejante a la tolerancia inmunológica<sup>8,9,21</sup>.

En nuestro laboratorio se ha desarrollado en una línea de ratas altamente endocriada, un modelo experimental que reproduce algunas de las características de la enfermedad de Chagas crónica<sup>11</sup> con una parasitemia en la fase aguda que se extingue aproximadamente a los 40 días, curva de anticuerpos específica crónica y desde los 6 meses de la infección, lesiones histopatológicas de corazón en el 70% de los casos, compatibles en cierta medida con las observadas en la miocarditis chagásica<sup>11,20</sup>. En este modelo, se decidió inducir la AA en los animales luego del período agudo de la infección chagásica, con el propósito de estudiar si la infección con *Trypanosoma cruzi* modifica los mecanismos inmuno-competentes comprometidos en la producción de esta patología.

## MATERIAL Y MÉTODOS

**Animales** — Se trabajó con ratas endocriadas, hembras y machos, de línea "1", de 21-25 días de edad. Esta cepa deriva de ratas de línea e, IIM<sup>(1)</sup> que se crían en nuestro Bioterio desde 1963 y tiene actualmente 45 generaciones de endocria. Los animales permanecieron en las mismas condiciones experimentales durante el tiempo de la experiencia y fueron divididos en 2 grupos: I) Infectados con *T. cruzi* a los que se les indujo AA; II) Testigos con AA únicamente.

**Infección experimental** — Se utilizó la cepa Tulahuén de *Trypanosoma cruzi*, que se mantiene por pasajes subcutáneos en ratones de 21 días de edad. Las ratas fueron infectadas con  $1 \times 10^6$  tripomastigotes por vía subcutánea y en todos los casos se controló la presencia de parásitos en sangre el día 8° post-inóculo.

**Inducción y evaluación de la AA** — La enfermedad se indujo inoculando al día 90 post-infección con *T. cruzi*, una sola dosis (0.1 ml)

de una suspensión oleosa de *Mycobacterium tuberculosis* (Cepa H 37 Ra, 5 mg/ml Inmunoenfermedad) en la almohadilla plantar de la pata trasera derecha. Diez días más tarde, comenzaron los signos de AA que fueron evaluados por observación directa y estudios histológicos. En la observación directa se usó la siguiente escala semicuantitativa: tumefacción de las articulaciones pequeñas (interfalángicas, metacarpo y metatarsofalángicas) 1 punto; tumefacción de las articulaciones grandes (carpo, tarso y muñeca) 2 puntos; nódulos en cola 1, 2 y 3 según la extensión; conjuntivitis 1 punto; rash cutáneo y alteraciones crónicas de la piel 1 punto por lesión. Cuando la tumefacción fue el doble de lo observado habitualmente, se duplicó el puntaje. Los 2 grupos experimentales fueron controlados desde el día 10 hasta el 40 post-inyección de ACF, ya que a partir de esa fecha las lesiones tendieron a estabilizarse.

**Anticuerpos humorales** — Los anticuerpos anti-*T. cruzi* se titularon al día 90 post-infección con *T. cruzi* y 20 días después de la inducción de la AA. Se usó la reacción de hemaglutinación indirecta y la técnica de microtitulación (Polychaco SAIC, Técnica de Auerbach y Yanovsky). Los resultados se expresan como el log<sub>2</sub> de la inversa de la dilución.

**Estudio histológico de la AA** — Se realizó a los 180 días posteriores a la infección con *T. cruzi*. Los animales se sacrificaron en cámara de éter. Se analizaron las patas posteriores afectadas por la inyección de ACF. El material fue fijado con líquido de Bouin, decalcificado con ácido nítrico al 10%, se incluyó en parafina y se practicaron cortes de 6  $\mu$  que fueron coloreados con hematoxilina-eosina y tricrómica de Gomori. La lesión fue evaluada con microscopía óptica en base a la distribución y extensión del infiltrado inflamatorio. Se clasificó en leve, moderada e intensa. Se consideró leve, a la presencia de un infiltrado de linfocitos, macrófagos y plasmocitos dispersos en la dermis e hipodermis; moderado, cuando el infiltrado confluyente llegaba en profundidad hasta la fascia muscular superficial con presencia de granulomas de células epiteloides y células gigantes multinucleadas; intenso, cuando había infiltrado denso que invadía el plano muscular estriado y llegaba a la sino

(1) Supplement IV of the Int. Survey on the Supply, Quality and Use of Laboratory Animals, Int. Committee on Lab. Animals, Carshalton, England, 1964

vial y al plano óseo, con presencia de granulomas.

**Histopatología de miocardio** — En la autopsia se extrajo el corazón y se incluyó en parafina realizándose cortes transversales de  $5 \mu$  de espesor que se colorearon con hematoxilina-eosina. En la histopatología cardíaca se estudiaron: 1) **Miocarditis crónica focal (MCF)**, determinada por la presencia de acúmulos localizados de linfocitos con destrucción de las fibras miocárdicas. Según el grado de desarrollo de la lesión se clasificó en: a) **leve**: pequeño acúmulo de linfocitos con destrucción de 2-3 fibras miocárdicas; b) **moderada**: grupos de linfocitos con destrucción de pequeños grupos de fibras miocárdicas; c) **intensa**: acúmulos mayores de histiocitos y linfocitos con destrucción de grupos grandes de fibras miocárdicas. 2) **Pericarditis (Pc)**, determinada por la presencia de un infiltrado inflamatorio crónico en el epicardio, según el grado de desarrollo se la clasificó en a) **leve**: pequeños grupos de linfocitos e histiocitos dispersos; b) **moderada**: cuando el infiltrado formaba una masa nodular pequeña; c) **intensa**: cuando el infiltrado formaba una placa extensa. 3) **Fibrosis (Fi)**, determinada por la presencia de bandas de tejido conectivo en reemplazo de las fibras miocárdicas. Según el grado de desarrollo y la extensión en el miocardio se clasificó en leve, moderada o intensa. La presencia de MCF, Pc ó Fi se agrupó como lesión cardíaca (Lc).

**Análisis estadístico** — Los resultados obtenidos en la evaluación macroscópica se analizaron con la prueba U de Mann-Whitney y los correspondientes a la evaluación microscópica por la prueba G. Los títulos de Ac anti-Tc se estudiaron con la "t" de Student para datos apareados<sup>15,16</sup>.

## RESULTADOS

**Evolución de la AA** — Los primeros signos artríticos comenzaron a aparecer entre el 7.º y 10.º día posterior al inóculo del ACF, especialmente en las patas posteriores y de ellas con mayor intensidad en la inoculada con el ACF. Es necesario aclarar que en la línea de ratas utilizadas para este experimento la AA se visualiza principalmente con signos artríticos. Las

manifestaciones extraarticulares tales como conjuntivitis, rash cutáneo y lesiones costrosas de la piel se observaron con más frecuencia en los animales testigos

En la Fig. 1 se puede observar la evolución de la AA en los 2 grupos experimentales. Se muestra que los animales inoculados con Tc desarrollaron una patología significativamente menor ( $p < 0.001$ ) que los testigos, en todos los días estudiados.

Además, se puede ver que en los animales previamente infectados en los cuales se indujo la AA, desaparece la diferencia en el comportamiento entre macho y hembras, fenómeno que es evidente en los testigos (Ej. día 23 post-inducción AA,  $p < 0.02$ ).

A partir del día 30 post-inóculo del ACF las lesiones tienden a regresar lentamente y al día 90 del proceso artrítico, cuando los animales fueron sacrificados para el estudio histológico, se mantenían aún las diferencias entre los grupos experimentales.

**Anticuerpos humorales anti-T. cruzi** — El título de anticuerpos de los animales infectados con T. cruzi antes del inóculo con ACF fue de:  $\bar{x} \pm e.s. = 5.0 \pm 0.29$ ;  $n = 15$ ; 20 días después del adyuvante, aumentó significativamente:  $\bar{x} \pm e.s. = 6.64 \pm 0.23$ ;  $n = 14$  ( $p < 0.001$ ). En los testigos, si bien los títulos de Ac son inespecíficos:  $\bar{x} \pm e.s. = 2.12 \pm 0.20$ ;  $n = 16$ , la inducción de la AA produjo un leve ascenso:  $\bar{x} \pm e.s. = 3.0 \pm 0.25$ ;  $n = 13$  ( $p < 0.05$ ). Estos incrementos podrían deberse a un efecto inespecífico del ACF.

**Histopatología** — En el lugar del inóculo del ACF se encontró un infiltrado celular denso, compuesto por linfocitos, plasmocitos y macrófagos. Se observó con mucha frecuencia acúmulos de células epitelioides y células gigantes multinucleadas tipo Langhans, configurando granulomas sin caseosis. En algunos casos se constató arteritis en vasos pequeños con elementos linfoides en plena pared vascular. La cuantificación de las lesiones figura en la Tabla I. Se puede verificar que las ratas infectadas con T. cruzi desarrollaron un infiltrado inflamatorio significativamente menor que el de los testigos ( $p < 0.001$ ), en los que en todos los casos fue de tipo III.

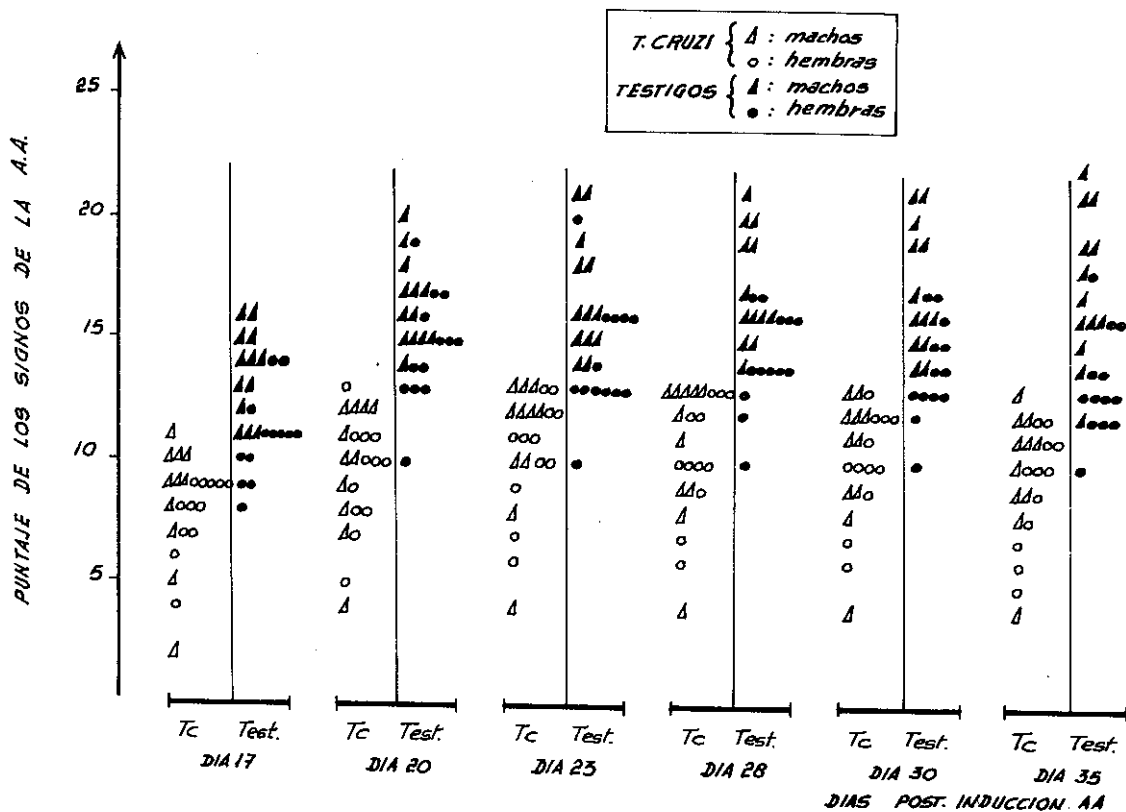


Fig. 1 — Evolución de la artritis por adyuvante (AA) en ratas infectadas con *T. cruzi* y testigos, mostrando los datos individuales. La diferencia en la magnitud de la lesión entre ambos grupos es altamente significativa en todo el período ( $p < 0.001$ ).

T A B L A I  
 Porcentaje de lesión artrítica en ratas chagásicas y testigos (Evaluación Microscópica)

Grupos Experimentales	Grado de lesión			P
	I	II	III	
Testigos de AA(*)	0 (0/21)	0 (0/21)	100 (21/21)	< 0.001
Chagásicos + AA(**)	47.4 (9/19)	42.1 (8/19)	10.5 (2/19)	

(\*) Artritis por adyuvante, inducida en la pata trasera con A.C.F.

(\*\*) Inoculadas 90 días antes de la inducción con *T. cruzi* Grado de lesión: I, leve; II, moderada; III, intensa. Ver descripción en el texto.

El estudio histopatológico del miocardio mostró que sólo el 25% de los animales infectados con Tc y a los que se les indujo AA, desarrollaron una miocarditis crónica focal, porcentaje que es muy inferior al que se obtiene en el modelo crónico<sup>11,20</sup>. Las ratas con AA so-

lamente, presentaron un 8% de miocarditis, similar al de los testigos sin ningún tratamiento.

## DISCUSIÓN

De acuerdo con nuestros resultados, en esta línea de ratas, la lesión es predominantemente granulomatosa crónica, lo cual constituye una típica expresión de la inmunidad mediada por células (IMC)<sup>22</sup>. Como ya fuera enunciado, WAKSMAN & col.<sup>21</sup> postularon que la AA se produce por un mecanismo de hipersensibilidad retardada. TAUROG & col.<sup>17</sup> señalaron que la artritis por el ACF está mediada por una subclase de linfocitos T productores de linfoquinas. Mas aun KAYASHIMA & col.<sup>4</sup> postulan que participan 2 subpoblaciones de linfocitos T en el desarrollo de la AA, una encargada de producirla (sensible al suero anti-timocito) y otra de linfocitos T de corta vida que ejerce efecto supresor en la inducción. PEAR-

SON & col.<sup>9</sup> señalaron que esta entidad podría ser un fenómeno autoinmune, lo cual refuerza lo anterior, puesto que la IMC es primordial para la producción de enfermedades autoalérgicas experimentales<sup>22</sup>.

En este experimento, se ha detectado que los machos desarrollan un proceso más intenso que las hembras, fenómeno que no se constata en los animales infectados con *T. cruzi*, probablemente debido a la escasa magnitud de la lesión. Estas diferencias hacen suponer que la capacidad para desarrollar el proceso artrítico sería un carácter influido por el sexo.

Los resultados expuestos evidencian que las ratas infectadas con *T. cruzi* desarrollan un proceso de menor intensidad en relación a los testigos, que lleva a postular la existencia de mecanismos posibles capaces de interferir con la respuesta inmune.

En primer término, podría tratarse de una competición antigénica secuencial<sup>18</sup>, donde los antígenos parasitarios (dominantes) actuarían inhibiendo la respuesta hacia constituyentes antigénicos de la micobacteria (suprimidos). Este proceso de competición entre antígenos, eventualmente, podría ser operativo en otro nivel. Así, WAKSMAN & col.<sup>21</sup> han observado que al tratar de inducir en un mismo animal la AA y la encefalomiелitis alérgica experimental (EAE), la artritis fue más frecuente en las ratas que no desarrollaban la EAE, postulándose una competición de antígenos en la sensibilización. Si tenemos en cuenta que estudios en ratones infectados con *T. cruzi* sugieren la participación de un fenómeno de autoinmunidad en la producción del daño tisular miocárdico<sup>2, 5, 19</sup>, en nuestro caso, podría suponerse también la presencia de un mecanismo de competición entre los antígenos inductores de la miocarditis y la artritis (similar a lo observado entre la AA y EAE), que podría explicar la baja incidencia de la lesión cardíaca en los animales con ambas patologías.

El segundo aspecto a considerar en la fisiopatología de la infección experimental con *T. cruzi* es el de la inmunosupresión. Diversos Autores han detectado la supresión tanto humoral como celular de la respuesta inmune específica e inespecífica en la fase aguda de la infección murina<sup>3, 10, 12, 13</sup>, y recientemente SCOTT<sup>14</sup>

ha observado una supresión específica de la IMC en un modelo crónico. Resultados preliminares demuestran que la menor respuesta artrítogénica puede transferirse a un receptor sinérgico normal con células de bazo de rata infectada con *T. cruzi* (datos no publicados). Asimismo, hemos comprobado que la respuesta de hipersensibilidad tardía hacia glóbulos rojos de carnero, se halla deprimida en esta misma línea de ratas que cursan la infección tripanosomiasica<sup>1</sup>. Por lo tanto cabría la posibilidad de que se produzcan mecanismos inmunosupresores que interfieran en la competencia inmunológica necesaria para producir esta entidad experimental.

## SUMMARY

### The adjuvant disease in rats experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*

The experimental arthritis produced in rats which had been infected at weaning with *Trypanosoma cruzi* was studied 90 days after inoculation. Focal arthritis was induced by injecting 0.1 ml of Freund complete adjuvant in one hind foot-paw of inbred previously treated animals and controls. To measure different degrees of foot-paw inflammation and swelling a semi quantitative scale was used. Furthermore, a histopathological study of heart and joints was performed 180 days after *T. cruzi* inoculation. The joint injury in the *T. cruzi* group was significantly smaller than in the controls, during the acute period ( $p < 0.001$ ).

Histopathologic observations showed local tissue inflammatory infiltration with lymphocytes, plasma cells and macrophages. These pathological changes observed in treated animals were also smaller than in the controls ( $p < 0.001$ ). It is postulated that in chagasic rats the less severe arthritis could be due to an antigenic competition or immunosuppressive mechanisms present in infected animals.

## AGRADECIMIENTOS

Trabajo apoyado con subsidio de SECYT, Argentina y Consejo de Investigaciones de la UNR. Los Autores agradecen a la estadística C.

Tarés su asesoramiento, al Sr. H. Poli y Srta. B. Scelfo su esmerada colaboración técnica y a Lab. Polychaco por la provisión de reactivos.

#### REFERENCIAS

1. BOTTASSO, O. A.; REVELLI, S.; MORENO, H.; SCELEFO, B.; POLI, H. & MORINI, J. C. — Respuesta inmune a glóbulos rojos de carnero (GRC) en ratas infectadas con *Trypanosoma cruzi* (Tc). Actas XXIX Reunión Científica de la SAIC, 1984.
2. COSSIO, P. M.; DIEZ, C.; LAGUNES, R. P. & ARANA, R. M. — Inmunopatología de la Enfermedad de Chagas. Hechos y perspectivas. Medicina (B. Aires), 40: 222-230, 1980.
3. CUNNINGHAM, D. S.; KUHN, R. E. & ROWLAND, E. C. — Suppression of humoral responses during *Trypanosoma cruzi* infections in mice. Infect. Immun., 22: 155-160, 1978.
4. KAYASHIMA, K.; KOGA, T. & ONOUE, K. — Role of T lymphocytes in adjuvant Arthritis. II. Different subpopulations of T lymphocytes functioning in the development of the disease. J. Immunol., 120: 1127-1131, 1978.
5. LAGUENS, R. P.; CABEZA MECKERT, P.; CHAMBO, G. & GELPI, R. J. — Chronic Chagas disease in the mouse. II. Transfer of the heart disease by means of immunocompetent cells. Medicina (B Aires), 41: 40-43, 1981.
6. PEARSON, C. M. — Development of arthritis, peri-arthritis, and periostitis in rats given adjuvants. Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.), 91: 95-101, 1956.
7. PEARSON, C. M.; WAKSMAN, B. H. & SHARP, J. T. — Studies of arthritis and other lesions induced in rats by injection of mycobacterial adjuvant. V. Changes affecting the skin and mucous membranes. Comparison of the experimental process with human disease. J. exp. Med., 113: 485-509, 1961.
8. PEARSON, C. M. & WOOD, F. D. — Factors which modify adjuvant-induced arthritis. Arthr. and Rheum., 5: 654, 1962.
9. PEARSON, C. M. & WOOD, F. D. — Passive transfer of adjuvant arthritis by lymph node cells. J. exp. Med., 120: 547-560, 1964.
10. RAMOS, C.; LAMOYI, E.; FEOLI, M.; RODRIGUEZ, M.; PEREZ, M. & ORTIZ-ORTIZ, L. — *Trypanosoma cruzi*: immunosuppressed response to different antigens in the infected mouse. Exp. Parasit., 45: 190-199, 1978.
11. REVELLI, S. S.; AMERIO, N.; MORENO, H. S.; VALENTI, J. L.; BALBARREY, H. & MORINI, J. C. — Enfermedad de Chagas crónica en la rata. Características serológicas, electrocardiográficas e histopatológicas. Medicina (B. Aires), 40: 69-76, 1980.
12. REED, S. G.; LARSON, C. L. & SPEER, C. A. — Contact sensitivity responses in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. Infect. Immun., 22: 548-554, 1978.
13. ROWLAND, E. C. & KUHN, R. E. — Suppression of cellular responses in mice during *Trypanosoma cruzi* infections. Infect. Immun., 22: 393-397, 1978.
14. SCOTT, M. T. — Delayed hypersensitivity to *Trypanosoma cruzi* in mice: specific suppressor cells in chronic infections. Immunology, 44: 409-417, 1981.
15. SIEGEL, S. — Estadística no paramétrica. 2da. Edición española. México, Edit. Trillas, 1979. p. 143-155.
16. SOKAL, R. R. & ROHLF, F. J. — Biometría. Madrid, H. Blume Ediciones, 1979. p. 186-192, 611-613.
17. TAUROG, J. D.; SANDBERG, G. P. & MAHOWALD, M. L. — The cellular basis on adjuvant Arthritis. II. Characterization of the cells mediating passive transfer. Cell. Immunol., 80: 198-204, 1983.
18. TAUSSIG, M. J. — Antigenic competition. In: SELA, M., ed. — The antigens. New York, Academic Press, 1977. v. 4, p. 333-368.
19. TEIXEIRA, A. R. L. — Chagas' disease: trends in immunological research and prospects for immunoprophylaxis. Bull. Wld. Hlth. Org., 57: 697-710, 1979.
20. VALENTI, J. L.; REVELLI, S. S.; MORINI, J. C. & BURGOS, M. — Evolución de las alteraciones cardíacas en un modelo de Enfermedad de Chagas crónica en la rata. Medicina (B. Aires), 40: 810, 1980.
21. WAKSMAN, B. H.; PEARSON, C. M. & SHARP, J. T. — Studies of arthritis and other lesions induced in rats by injection of mycobacterial adjuvant. II. Evidence that the disease is a disseminated immunologic response to exogenous antigen. J. Immunol., 8 5: 403-417, 1960.
22. WAKSMAN, B. H. — Cellular hypersensitivity and immunity: conceptual changes in last decade. Cell. Immunol., 42: 155-169, 1979.

Recebido para publicação em 29/5/1985.