

Determinación de dosis infectiva vía oral de la cepa neolonesa de formas de *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909) a nivel experimental en modelo murino

¹J. A. Delgado-Garduño, ¹Z. J. Molina-Garza,
¹L. Galaviz-Silva, ²A. Espinoza-Mata y ³J. C. Ibarra Gámez.

¹Departamento de Zoología de Invertebrados, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León.

²Departamento de Microbiología e Inmunología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León.

jorgea.delgadog96@gmail.com

Resumen

Trypanosoma cruzi es el agente causal de la enfermedad de Chagas, la cual se descubrió por primera vez en Brasil en 1909. El protozooario puede infectar al humano mediante diferentes tipos de transmisión, tales como vectorial, de transfusión sanguínea, congénita y oral, ésta última es el enfoque del estudio. Para comprobar esto, se realizó la preparación de jugos naturales de naranja y se inocularon las muestras con formas epimastigotes de *T. cruzi*, los cuales sobrevivieron después de 21 h, confirmando así, la sobrevivencia del parásito. Posteriormente, se suministraron los jugos contaminados a los roedores con diferentes concentraciones; debido a que no se observaron los tripomastigotes en sangre de ratón en fase aguda se extrajo el ADN del parásito para después confirmar la infección molecularmente por PCR. Asimismo, se realizaron cortes histológicos a partir de tejido infectado de los ratones que murieron y los que fueron sacrificados y se observaron nidos de amastigotes de *T. cruzi* en el tratamiento de mayor concentración (1.5 millones de células/mL), por lo que se logró confirmar la infección vía oral, por las dos técnicas mencionadas. Mediante un análisis de varianza con la prueba de Tukey se determinó que no existe diferencia significativa en los tratamientos.

Palabras clave: Naranja, sobrevivencia, *Trypanosoma*.

Abstract

Trypanosoma cruzi is the causative agent of Chagas disease, which was first discovered in Brazil in 1909. The protozoan can infect humans through different types of transmission, such as vector, blood transfusion, congenital and orally, the latter is the focus of this study. To verify this, preparation of natural orange juices was carried out and samples were inoculated with epimastigote forms of *T. cruzi*, which survived after 21 h, confirming the survival of the parasite. Subsequently, contaminated juices were supplied to rodents with different concentrations; due to trypomastigotes were not observed in mouse blood in the acute phase, DNA was extracted from the parasite and the infection was confirmed molecularly by PCR. Likewise, histological sections were made from infected tissue of mice that died and those that were sacrificed and nests of amastigotes of *T. cruzi* were observed in the treatment with the highest concentration (1.5 million cells/mL), therefore managed to confirm the infection orally by both mentioned techniques. An analysis of variance with the Tukey test determined that there is no significant difference in the treatments.

Keywords: Orange, survival, *Trypanosoma*.

Área: Microbiología y Biotecnología

Introducción.

La enfermedad de Chagas o tripanosomiasis es una enfermedad cuyo agente etiológico es *Trypanosoma cruzi* y su incidencia es estimada en 200,000 casos por año; la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha indicado que 8 millones de personas están infectadas en América central (Pereira *et al.*, 2009). Se estima que 1.1 millones de personas se encuentran infectadas en México (Rojo *et al.*, 2018). Los modos predominantes de transmisión de la enfermedad de Chagas son: a través de las deyecciones contaminadas de insectos triatomíneos que se alimentan de sangre, mediante transfusión de sangre, ingestión de alimentos y líquidos contaminados con parásitos, transmisión congénita, además, de los mecanismos menos frecuentes como: los accidentes de laboratorio, el manejo de animales infectados y los trasplantes de órganos de donantes afectados por la enfermedad de Chagas (Coura, 2015). A partir de 1990 se encontraron dos casos de personas infectadas con *T. cruzi* por transmisión oral en Colombia y reaparecieron 10 nuevos casos en 2002 (Filigheddu *et al.*, 2017). Los pocos estudios que han investigado las vías de infección orales e intraperitoneales, se han realizado principalmente en ratones, en donde se mencionó que el biotopo de *T. cruzi* influye en la infección murina por estas vías, por lo que se observó, que tanto la forma infecciosa del parásito como el volumen del inóculo influyen diferencialmente en la tasa de infectividad en base a diferentes rutas de inoculación y se demostró que el sitio inicial de entrada del parásito afecta de manera crítica la respuesta inmune del huésped y el resultado de la enfermedad (Barreto *et al.*, 2015). Debido a la importancia de la transmisión oral (por alimentos) de la enfermedad de Chagas en algunos países de América Latina, se propuso en este estudio, medir la sobrevivencia de *T. cruzi* de la cepa neolonesa inoculada artificialmente en jugos de naranja que es un fruto regional.

Materiales y métodos.

Preparación de jugos naturales

Se prepararon tubos que contenían 9 mL de las soluciones de jugo de naranja. Tres tubos contenían jugo natural directamente extraído de la naranja, otros tres tenían jugo filtrado con papel filtro Whatman #1 y otros tres con jugo filtrado diluido 1:1 con agua bidestilada estéril a un pH de 7. Se midió el pH y los grados Brix a cada solución con un Potenciómetro HANNA HI3220 y un Refractómetro Leica Abbe Mark II Plus respectivamente (Titta *et al.*, 2011).

Inoculación de muestras con formas epimastigotes de *T. cruzi*.

Se agregó 1 mL del cultivo de formas epimastigotes de *T. cruzi* previamente ajustado a 5×10^5 parásitos/mL en cada tubo con las diferentes soluciones de jugo de naranja. Posteriormente se incubaron los tubos a 28 °C y en refrigeración (4 °C) durante 24 h. Se midió la sobrevivencia del parásito con un microscopio óptico LEICA CME Modelo 1349521x cada hora con una cámara de Neubauer (Titta *et al.*, 2011).

Suministro de jugo contaminado a roedores

Se suministraron alícuotas de 250 µL de jugos naturales de naranja inoculadas con formas epimastigotes de *T. cruzi* a roedores (libres de algún tratamiento y bajo los lineamientos de la NOM-062-ZOO-1999) por vía oral (Tabla I) (Camandaroba *et al.*, 2002). Una vez inoculados, los roedores se colocaron en jaulas para su alojamiento en el bioterio proporcionándoles su mantenimiento durante 36 días hasta que presentaron síntomas de

la enfermedad como piel erizada, decaimiento, apatía etc. Finalmente fueron sacrificados en la fase crónica de cada grupo experimental (Barreto *et al.*, 2015).

Tabla I. Nomenclatura de tratamientos en los ratones.

Tratamiento	Tratamiento	Células/mL
1	Control positivo (Cepa internacional Brener)	1.5×10^6
2	Control positivo (Jugo con cepa internacional Brener)	1.5×10^6
3	Control positivo (Cepa de Nuevo León)	1.5×10^6
4	Jugo con cepa de Nuevo León	5×10^4
5	Jugo con cepa de Nuevo León	5×10^5
6	Jugo con cepa de Nuevo León	1.5×10^6
7	Control negativo (Jugo sin inocular)	N.A.
8	Control negativo (sin tratamiento)	N.A.

Observación de tripomastigotes en sangre de ratones infectados en fase aguda

A los 7-15 días PI, se cortó la cola de los ratones experimentales de cada grupo 0.5 a 1.0 cm para obtener la sangre, la cual se colocó en un tubo Ependorff de 1 mL de donde se tomaron 10 μ L para observar la parasitemia con un microscopio óptico LEICA CME Modelo 1349521x (Espinoza *et al.*, 2011).

Extracción de ADN de *T. cruzi* a partir de ratones infectados

Debido a que no se logró a observar los parásitos en microscopía de luz se realizó la extracción de ADN en ratones para luego realizar la amplificación del producto obtenido. Se realizó técnica del DNazol para lograr extraer en material genético del parásito (Galaviz-Silva *et al.*, 2013). Se resuspendió el ADN extraído para después almacenarse a -4°C hasta su análisis. En cuanto al control positivo se utilizó ADN de forma de epimastigote de *T. cruzi* obtenido del medio de cultivo LIT. Esto se realizó en ambos casos (Pérez-Treviño, 2013).

Confirmación molecular por técnica de PCR

Para la amplificación del gen del mini exón se utilizaron dos oligonucleótidos, uno para upstream y otro para downstream, los cuales fueron TC1: 5'-GTGTCCGCCACCTCCTTCGGGCC-3' y TCC: 5'-CCCCCTCCCAGGCCACACTG-3' respectivamente. La amplificación se realizó con un termociclador (Labnet, MA, USA). La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 20 μ L, los cuales contenían 5 μ L de Buffer MyTaq 5X, 1.2 μ L de cada primer (10 μ M), 0.2 μ L del Taq Polimerasa (QIAGEN, MA) y 2 μ L del ADN (80-100 ng). El programa del perfil térmico consistió en una desnaturalización a 94°C durante 3 min, 40-45 ciclos de amplificación a 94°C durante 30 s, 58°C durante 30 s y 72°C durante 30 s, además de una extensión terminal a 72°C durante 10 min. Se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % y como solución tampón TAE (Tris 40 mM, acetato 40 mM, EDTA 1 mM) en presencia de 0.5 g/mL de bromuro de etidio (Montes *et al.*, 2016).

Confirmación histopatológica

Para una segunda confirmación de la infección, los ratones infectados (30 días PI) fueron sacrificados y se colectó 1 cm^3 aproximadamente de órganos presuntamente infectados

como esófago, estómago, intestino delgado, colon, corazón y cerebro de los ratones sacrificados. Éstos fueron fijados en un tubo con 9 mL con solución formaldehído al 10 %. Los tejidos ya fijados se enviaron al Laboratorio de Análisis en Sanidad Acuícola del Instituto Tecnológico de Sonora (ITSON) para su procesamiento (Espinoza *et al.*, 2011; Montes *et al.*, 2016).

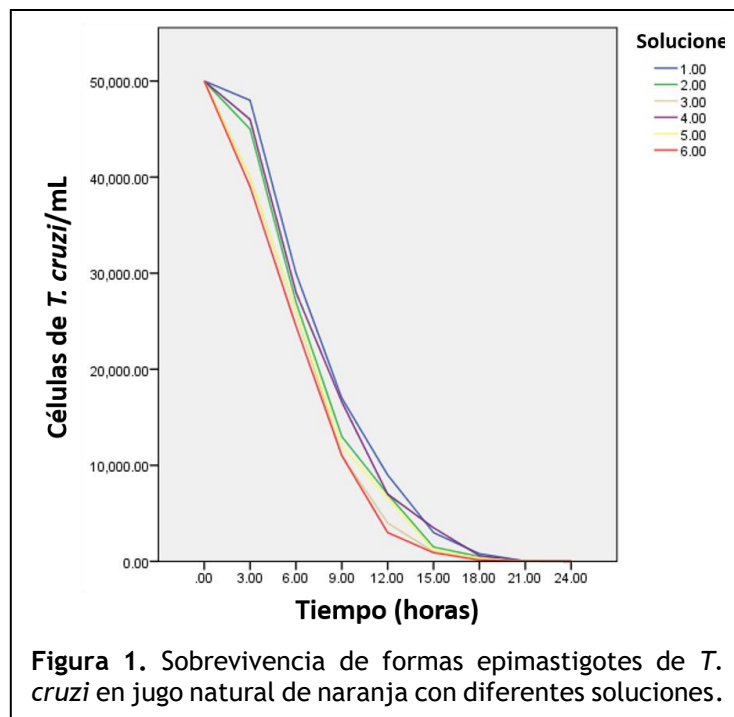
Análisis estadístico

Los datos que se obtuvieron fueron analizados estadísticamente con el programa SPSS 18.0. Se realizó un análisis de varianza mediante la prueba de Tukey para determinar si hubo diferencia significativa entre los tratamientos con los jugos y con los grupos (Titta *et al.*, 2010).

Resultados.

Preparación de jugos naturales

Se obtuvo un pH de 4.35 en las soluciones de jugo de naranja y diferentes valores en los grados Brix: 13.37 para el jugo normal, 13.43 para el jugo filtrado y 6.9 para el jugo filtrado diluido.



Inoculación de muestras con formas epimastigotes de *T. cruzi*.

Trypanosoma cruzi logró sobrevivir después de 21 h a la exposición de jugo natural de naranja sin filtrar, filtrado y filtrado diluido (Figura 1).

Suministró a roedores con jugo contaminado

Al suministrar los jugos contaminados a los roedores, el ratón del tratamiento 1 murió a los 12 días PI, mientras que el del tratamiento 6 murió al día 18, los demás ratones murieron cuando se sacrificaron en el 36 (Figura 2).

Confirmación molecular por PCR

Se obtuvo una amplificación de 300 pb para el control positivo, así como de 300 y 350 pb para la cepa Brener y alrededor de 200 pb para la cepa de Nuevo León como control y del tratamiento 6. De igual manera no hubo amplificación para los tratamientos 4, 5 y el control negativo (Figura 3).

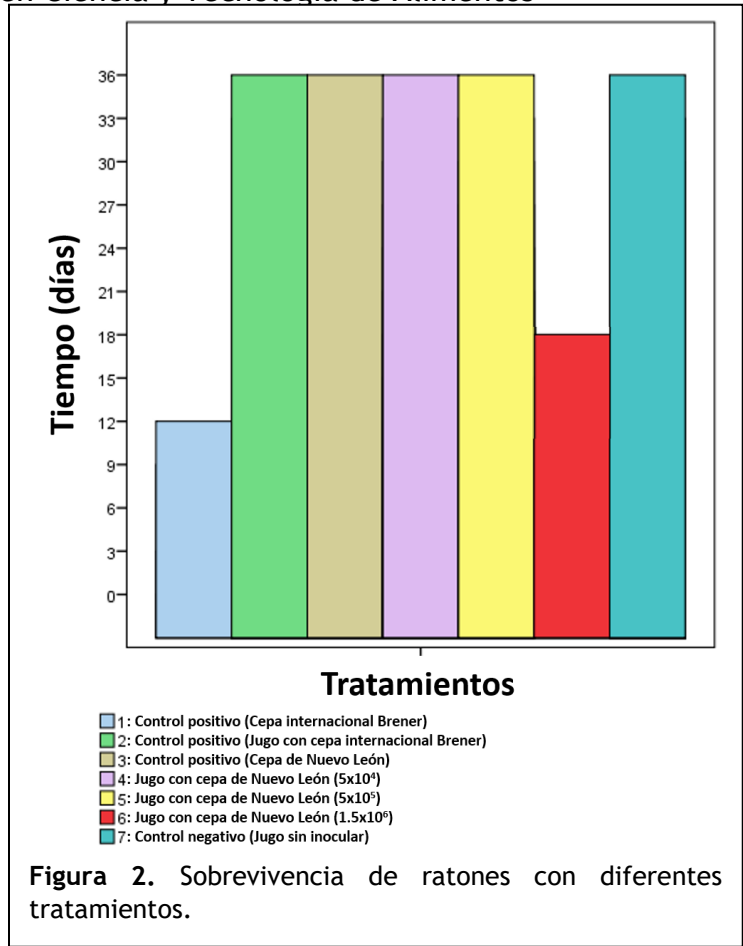


Figura 2. Supervivencia de ratones con diferentes tratamientos.

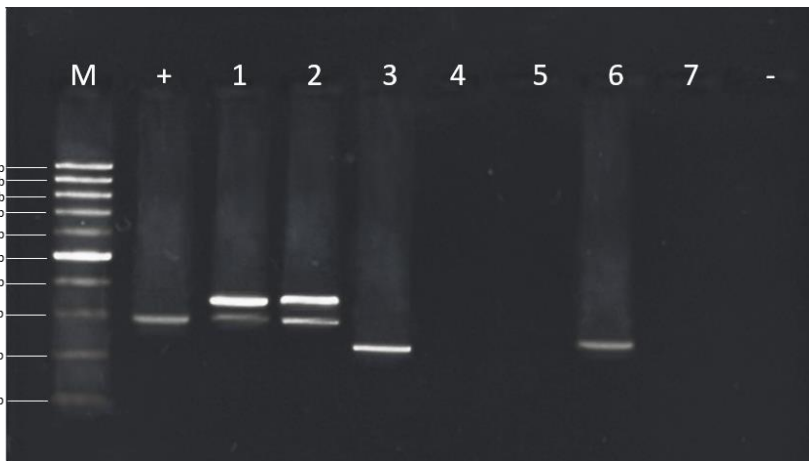


Figura 3. Amplificación de gen mini exón de *T. cruzi* en los tratamientos realizados.

- M: Marcador
- +: Control positivo
- 1: Cepa internacional Brener
- 2: Jugo con cepa internacional Brener
- 3: Cepa de Nuevo León
- 4: Jugo con cepa de Nuevo León (Cxn baja)
- 5: Jugo con cepa de Nuevo León (Cxn media)
- 6: Jugo con cepa de Nuevo León (Cxn alta)
- 7: Jugo sin inocular
- : Control negativo

Confirmación histopatológica

Una vez realizados los cortes histológicos se lograron observar nidos de amastigotes de *T. cruzi* en sistema digestivo (Figura 4), por lo que se logró confirmar la infección vía oral.

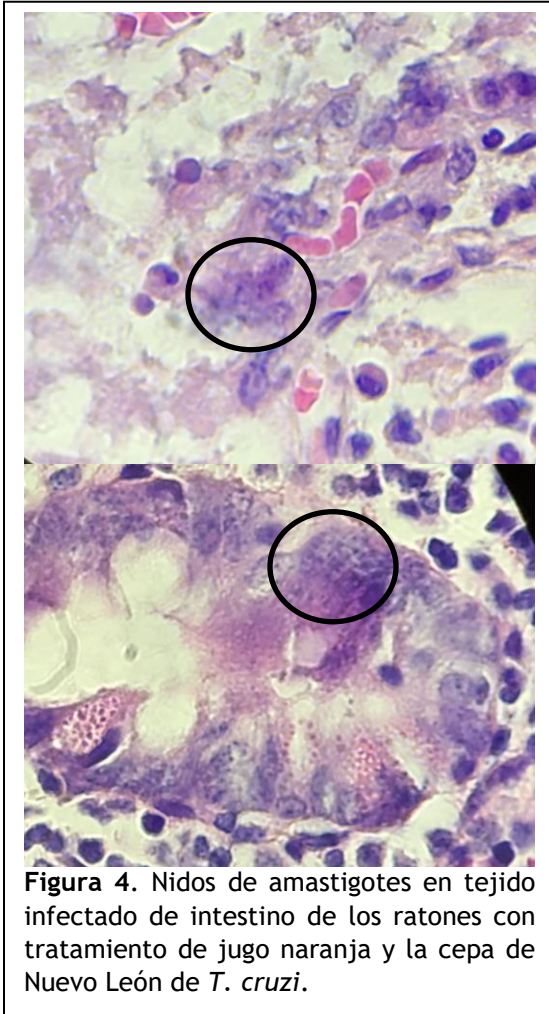


Figura 4. Nidos de amastigotes en tejido infectado de intestino de los ratones con tratamiento de jugo naranja y la cepa de Nuevo León de *T. cruzi*.

Análisis estadístico

Después de realizar un análisis de varianzas de los valores obtenidos en la sobrevivencia de *T. cruzi* en las diferentes soluciones de jugo de naranja se obtuvo una $F_{cat}=0.038$, por lo que se puede decir que no hay diferencia significativa entre los tratamientos.

Discusión.

Los jugos utilizados en el ensayo de sobrevivencia de las formas epimastigotes de *T. cruzi* procedían de naranjas en estado de madurez, ya que los valores de pH de las soluciones tenían un promedio de 4.35, los cuales entran en el rango de valores normales que va de 2.9 hasta 4.5 tal como lo menciona Bai *et al.*, (2016); Asimismo, los grados Brix de las soluciones de jugo de naranja utilizados tuvieron en promedio 13.37 en el jugo normal, 13.43 en el filtrado y 6.9 en el diluido 1:1, como los reportados por Timmermans *et al.*, (2011).

Las formas epimastigotes de *T. cruzi* lograron sobrevivir a un pH ácido (4.35 en promedio) durante 21 horas de exposición en las diferentes soluciones de jugos naturales, si se compara el pH intracelular de *T. cruzi*, este es más neutro: 7.33-7.35 (Van Der Heyden y Docampo, 2000), de igual forma, en otra investigación colombiana y la cepa Y, lograron

sobrevivir en condiciones de un pH de 5 (Tomlinson, 1995), por lo tanto, la cepa neolonesa resistió a la acidez de los jugos y fue capaz de infectar a los roedores en el bioensayo. Se ha descrito la transmisión de este parásito por jugos naturales de diferentes frutas, entre ellos, el de naranja con una sobrevivencia de *T. cruzi* de hasta 12 horas (Thomas *et al.*, 2007; Shikanai y Barbosa, 2012). Las formas epimastigotes de *T. cruzi* de la cepa de Nuevo León en las soluciones de jugo de naranja sobrevivieron a una temperatura de 4 °C, lo cual demuestra que el parásito resiste temperaturas bajas, diferentes a las de su rango óptimo. Esto puede ser debido a que, aunque *T. cruzi* no es un parásito fitófago, la transmisión generalmente coincide con el clima cálido, el momento más activo para los triatomíneos debido a las temperaturas altas de hasta 40 °C y humedad de 60 %, el protozoario puede sobrevivir durante algunas horas o días a bajas temperaturas y su viabilidad puede durar hasta semanas (Rueda *et al.*, 2014; González-Rete *et al.*, 2019).

Todos los roedores utilizados en esta investigación lograron sobrevivir después de la inoculación de la cepa de Nuevo León con jugo de naranja, a excepción del tratamiento 6, el cual murió a los 18 días PI ya que se utilizó una concentración mayor de parásitos (1.5×10^6). Comparado con otras cepas como la Ninoa y la Querétaro, la inoculación intraperitoneal de los roedores fue de 1×10^4 - 1×10^5 células/mL, la cual es una concentración menor que la del ensayo realizado, y la sobrevivencia de los ratones fue de 40 y 60 días respectivamente (Espinoza *et al.*, 2010). Cortez *et al.*, (2006) reportan que

la vía de administración oral tiene una tasa de mortalidad menor a la peritoneal, esto explica la sobrevivencia de los ratones utilizados en el bioensayo.

No se observó la parasitemia por microscopía de luz en la fase aguda (10-14 días PI), ya que *T. cruzi* puede llegar a infectar tejido de esófago, intestino, células adiposas etc., a partir del día 15 PI según lo reportado por Espinoza *et al.*, (2011), sin embargo, en la PCR se obtuvo una muestra positiva, la cual es de 1.5×10^6 células/mL (concentración mayor), además de los controles positivos de la cepa Brener al observarse amplificación en las bandas de 200 y 300-350 pb respectivamente. Se ha reportado la cepa Brener como híbrida, por lo que presenta bandas de 300 y 350 pb (Machado y Ayala, 2001), así como 200-250 pb para la cepa de Nuevo León (Pérez, 2013), lo cual coincide con los resultados obtenidos en la PCR.

Por histología se observaron los nidos de amastigotes en esófago, intestino y colon de los ratones infectados que murieron a los 12 y 18 días PI, así como los sacrificados a los 30 días (Figura 4) tal como mencionan Camandaroba *et al.*, (2002), quienes observaron al parásito en tejido del tubo gástrico de ratones infectados.

Bibliografía.

- Bai, J., Baldwin, E. A., McCollum, G., Plotto, A., Manthey, J. A., Widmer, W. W., Luzio, G. y Cameron, R. 2016. Changes in Volatile and Non-Volatile Flavor Chemicals of "Valencia" Orange Juice over the Harvest Seasons. *Foods*; 5(1):4.
- Barreto, H., Silva, D., Pérez, A. R., Berbert, L. R., de Santana, E., Farias, D. A., Moreira, O. C., Roggero, E., de Carvalho, C. E., Jurberg, J., Cotta, V., Bottaso, O., Savino, W. y de Meis, J. 2015. *Trypanosoma cruzi* Infection through the Oral Route Promotes a Severe Infection in Mice: New Disease Form from an Old Infection? *PLOS Neglected Tropical Diseases*.
- Camandaroba, E. L., Pinheiro, C., Andrade, S. 2002. Oral Transmission of Chagas Disease: Importance of *Trypanosoma cruzi* Biodeme in the Intragastic Experimental Infection. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*. 44(2):97-103.
- Cortez, M., Silva, M. R., Neira, I., Ferreira, D., Sasso, G. R. S., Luquetti, A., Rassi, A. y Yoshida, N. 2006. *Trypanosoma cruzi* surface molecule gp90 downregulates invasion of gastric mucosal epithelium in orally infected mice. *Microbes and Infection* 8:36-44.
- Coura, J.R. 2015. The main sceneries of Chagas disease transmission. The vectors: blood and oral transmissions – a comprehensive review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 110, 277-282.
- Espinoza, B., Rico, T., Sosa, S., Oaxaca, E., Vizcaino-Castillo, A., Caballero, M. L. y Martínez, I. 2010. Mexican *Trypanosoma cruzi* TCI Strains with Different Degrees of Virulence Induce Diverse Humoral and Cellular Immune Responses in a Murine Experimental Infection Model. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. Vol 2010 ID 890672. pp. 1-10.
- Espinoza, B., Solorzano, N., Vizcaino, A., Martínez, I., Elias, A. L. y Rodríguez, J. A. 2011. Gastrointestinal Infection with Mexican TCI *Trypanosoma cruzi* strains: Different Degrees of Colonization and Diverse Immune Responses. *Int. J. Biol. Sci.*; 7(9):1357-1370.
- Filigheddu, M. T., Górgolas, M. y Ramos, J. M. 2017. Orally-transmitted Chagas disease. *Med Clin*. Vol. 148(3):125-131.
- Galaviz-Silva, L., Mercado-Hernández, R., Zárate-Ramos, J. J. y Molina-Garza, Z. J. 2017. Prevalence of *Trypanosoma cruzi* infection in dogs and small mammals in Nuevo León, Mexico. *Rev Argent Microbiol*. 49(3):216-223.
- González-Rete, B., Salazar-Schettino, P. M., Bucio-Torres, M. I., Córdoba-Aguilar, A. y Cabrera-Bravo, M. 2019. Activity of the prophenoloxidase system and survival of triatomines infected with different *Trypanosoma cruzi* strains under different temperatures: understanding Chagas disease in the face of climate change. *Parasit Vectors*. 12: 219.

- Machado, C. A. y Ayala, F. J. 2001. Nucleotide sequence provide evidence of genetic exchange among distantly related lineages of *Trypanosoma cruzi*. Proceedings of the National Academy of Science. 98 (13): 7396-7401.
- Montes, L. M., Galaviz, L., González, F. E. y Molina, Z. J. 2016. *Trypanosoma cruzi* seroprevalence in pregnant women and screening by PCR and microhaematocrit in newborns from Guanajuato, Mexico. Acta Tropica 164; 100-106.
- NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.
- Pereira, K. S., Schmidt, F. L., Guaraldo, A. M., Franco, R., Días, V., Passos, L. 2009. Chaga's Disease as a Foodborne Illness. Journal of Food Protection, Vol. 72, No. 2, Pages 441-446.
- Pérez-Treviño, K. C. 2013. Obtención de la cepa de *Trypanosoma cruzi* a partir de roedores y triatominos infectados y su cultivo en condiciones de laboratorio (Tesis de maestría). Facultad de Ciencias Biológicas, UANL.
- Rojo, J., Ruiz, C., Salazar P. M. y González, J. F. 2018. Enfermedad de Chagas en México. Gac Med Mex.; 154:605-612
- Rueda, K., Trujillo, J. E., Carranza, J. C. y Vallejo, G. A. 2014. Oral transmission of *Trypanosoma cruzi*: a new epidemiological scenario for Chagas' disease in Colombia and other South American countries. Biomédica. Vol. 34:631-41.
- Shikanai, M. A. y Barbosa, N. C. 2012. Oral transmission of Chagas disease. Clin Infect Dis; 54: 845-852.
- Thomas, M. E., Rasweiler, J. J D'Alessandro, A. 2007. Experimental transmission of the parasitic flagellates *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* between triatomine bugs or mice and captive Neotropical bats. Mem Inst Oswaldo Cruz 102: 559-565.
- Timmermans, R. A. H., Mastwijk, H. C., Kno, J. J., Quataert, M. C. J., Vervoort, L., Van der Plancken, I., Hendrickx, M. E. y Matser, A. M. 2011. Comparing equivalent thermal, high pressure and pulsed electric field processes for mild pasteurization of orange juice. Part I: Impact on overall quality attributes. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 12(3), 235-243
- Titta, L., Tritnei, M., Stendardo, M., Berniakovich, I., Petroni, K., Tonelli, C., Riso, P., Porrini, M., Minucci, S., Pelicci, P. G., Rapisarda, P., Reforgiato, G. y Giorgio, M. 2010. Blood orange juice inhibits fat accumulation in mice. International Journal of Obesity. Vol 34, 578-588.
- Tomlinson, S., Vandekerckhove, F., Frevert, U. y Nussenzweig, V. 1995. The induction of *Trypanosoma cruzi* trypomastigote to amastigote transformation by low pH. Parasitology; 5:547-554.
- Van Der Heyden, N. y Docampo, R. 2000. Intracellular pH in mammalian stages of *Trypanosoma cruzi* is K⁺-dependent and regulated by H⁺-ATPases. Mol Biochem Parasitol; 105(2):237-251.