

# ANORMALIDADES ULTRAESTRUCTURALES DE LA MUSCULATURA ESQUELÉTICA EN RATONES INFECTADOS CON *Toxoplasma gondii* Y TRATADOS CON CICLOFOSFAMIDA

## Skeletal Muscle Ultrastructural Abnormalities in Mice Infected with *Toxoplasma gondii* and Treated with Cyclophosphamide

Elizabeth Bruzual<sup>1</sup>, Héctor J. Finol<sup>2</sup> y Lucila Arcay<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Escuela "J.M.Vargas", Facultad de Medicina. <sup>2</sup> Centro de Microscopía Electrónica, Facultad de Ciencias.

<sup>3</sup> Instituto de Zoología Tropical, Facultad de Ciencias. Universidad Central de Venezuela.

Fax: (02) 6930694, Apartado 47114, Caracas 1041A.

### RESUMEN

En el músculo fásico rápido *gastrocnemius* de ratones parasitados experimentalmente con la cepa considerada no patógena JKF de *Toxoplasma gondii* y tratados con Ciclofosfamida se observaron alteraciones en las fibras musculares, su inervación motora y en la microvasculatura. En relación a las fibras musculares, la atrofia varió de ligera a severa, mientras que las placas motoras exhibieron daños en su terminal axónico y modificaciones en la región potsináptica. Los capilares mostraron engrosamiento del citoplasma endotelial con formación de prolongaciones hacia la luz. El infiltrado celular mononuclear estuvo representado por linfocitos, macrófagos y mastocitos. La existencia de las diversas alteraciones encontradas conlleva a considerar que la ultraestructura del músculo exhibió cambios no acordes con un efecto aditivo del tratamiento con ciclofosfamida sobre los ya descritos de la cepa JKF de *Toxoplasma gondii* en la musculatura esquelética.

**Palabras clave:** Ratones, *Toxoplasma gondii*, Ciclofosfamida, músculo esquelético, ultraestructura.

### ABSTRACT

In twitch fast skeletal muscle *gastrocnemius* of mice experimentally parasitized with the non pathogenic JKF strain of *Toxoplasma gondii* and treated with Cyclophosphamide ultrastructural alterations were observed in muscle fibers; its innervation and microvasculature. Muscle fibers atrophy varied from slight to severe and endplates showed terminal axons damaged and modified post-synaptic regions. Intramuscular capillaries exhibited widened endothelial cytoplasm and surface in-

foldings into the lumen. The mononuclear cell infiltrate consisted of lymphocytes, macrophages and mastocytes.

**Key words:** Mice, *Toxoplasma gondii*, Cyclophosphamide, skeletal muscle, ultrastructure.

### INTRODUCCIÓN

En la actualidad se cuenta con una amplia literatura sobre los efectos de diferentes parásitos sobre los tejidos de varios mamíferos. Así, en el músculo esquelético del caballo fueron descritos diversos daños provocados por el *Trypanosoma evansi* [10], en tanto que en el modelo murino se han reportado alteraciones producidas por *Plasmodium berghei* en glándulas adrenales y hepatocitos [9, 11], y *Toxoplasma gondii* en el músculo esquelético [13] y *Trypanosoma evansi* en la corteza adrenal [12]. Adicionalmente al trabajo de Tonino y col. [13] con la cepa virulenta RH, Bruzual y col. [3] describieron las alteraciones ultraestructurales que sufrieron las fibras musculares, la microvasculatura y la inervación motora del músculo gastrocnemio de ratones albinos infectados con la cepa considerada no patógena JKF de *Toxoplasma gondii*. Con el presente estudio se pretende determinar los daños experimentados por la musculatura esquelética de ratones infectados por la cepa JKF de *Toxoplasma gondii* y tratados con el inmunosupresor Ciclofosfamida.

### MATERIALES Y MÉTODOS

En la realización de este estudio se utilizaron dos grupos de ratones machos pertenecientes a la cepa NMRI convenientemente identificados y con un peso promedio de 36,5 g.

El primer grupo (n=10) fue infectado por vía intraperitoneal con un volumen de 0,5 mL de inóculo contenido de  $2 \times 10^3$  parásitos y tratados por vía endovenosa con 0,2 mL de Ciclofosfamida a una concentración de 100 mg / kg de peso corporal.

El segundo grupo (n=10) utilizado como control sin tratamiento, fue igualmente infectado por vía intraperitoneal con similar volumen y contenido de parásitos.

En ambos casos, el inóculo se preparó a partir del macerado de cerebro proveniente de ratones con un mes de infección.

Los animales pertenecientes a ambos grupos fueron sacrificados a partir del primer día y hasta el día 29 postinfección, para realizar el estudio ultraestructural, las muestras del músculo *gastrocnemius* eran fijadas en glutaraldehído al 3% en buffer fosfato (pH 7,4 y 320 mOsm), postfijadas en tetróxido de osmio, deshidratadas en concentraciones crecientes de etanol e incluidas en resina LX – 112 (Ladd Reseach Inc., Burlington). Las secciones se tiñeron con acetato de uranilo y citrato de plomo y observadas en un microscopio electrónico de transmisión Hitachi H – 500, operado a un voltaje de aceleración de 100 kV.

## RESULTADOS

Las alteraciones de las fibras musculares en los animales infectados y no tratados con la ciclofosfamida, así como los tratados no presentaron diferencias significativas que pudieran justificar su descripción por separado, por lo que la misma se presentará conjuntamente.

Las fibras musculares de los ratones infectados y tratados con Ciclofosfamida presentaron atrofia variable de ligera a severa con pérdida de algunos de los componentes de la estríación sarcomérica. Concomitantemente con las alteraciones del sistema contráctil apareció un hinchamiento y vacuolización del sistema sarcotubular, FIG. 1. En relación al sistema contráctil, se pudo observar inicialmente líneas Z de trazado zigzagueante, pérdida de la línea M y de la banda H. Como puede verse en la, FIG. 1, aparecen hinchadas las cisternas terminales de las tríadas y algunos túbulos del retículo sarcoplasmático. Así mismo, la distribución de las tríadas fue en forma tanto longitudinal como perpendicular al eje principal de la fibra.

Transcurrida las 24 h. de la infección, a medida que se incrementó la desorganización de los sistemas contráctil y sarcotubular, aumentó la atrofia y la aparición de vacuolas autofágicas, FIGS. 1, 2 y 3, hasta que en las fibras totalmente atróficas el contenido de éstas consistió básicamente de vacuolas autofágicas y del núcleo, FIG. 4. El contenido de las vacuolas autofágicas estuvo representado por restos mitocondriales, FIGS. 1, 3 y 4, figuras mielínicas FIGS. 2 y 4 y glucogenosomas. Tales vacuolas se localizaron tanto en áreas intermiofibrilares FIG. 1, como subsarcoplémicas FIGS. 2, 3 y 4. También se apreciaron anomalías en la inervación motora y en los

capilares. En el caso de la primera, FIG. 5, el terminal axónico se observó muy electrón denso, con mitocondrias hinchadas y un número variable de vesículas de diferente tamaño y densidad electrónica. Por su parte, las hendiduras sinápticas disminuyeron en complejidad y profundidad. En relación a la microvasculatura, FIG. 6, los capilares presentaron un endotelio con diferente espesor, así como prolongaciones del citoplasma hacia la luz y mitocondrias que presentaron alteraciones tales como figuras mielínicas. En los capilares se observaron frecuentemente numerosos parásitos, FIG.7.

El infiltrado celular mononuclear estuvo representado por macrófagos, FIG. 8, linfocitos y mastocitos.

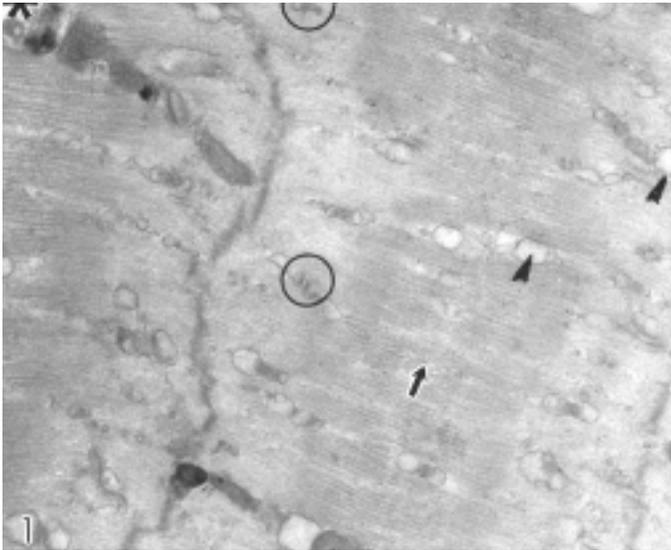
## DISCUSIÓN

Investigaciones previas realizadas por Tonino y col. [13] utilizando la cepa RH de elevada patogenicidad en el músculo *gastrocnemius* no invadido de ratones parasitados, demostraron diferentes grados de severidad en los componentes de las fibras musculares esqueléticas. No obstante, el nivel de vacuolización sarcoplasmática observada en la presente investigación no fue descrita en la investigación mencionada, así como tampoco en el caso de otros investigadores que han trabajado con *T. evansi* [10] y *P. cathemerium* [4].

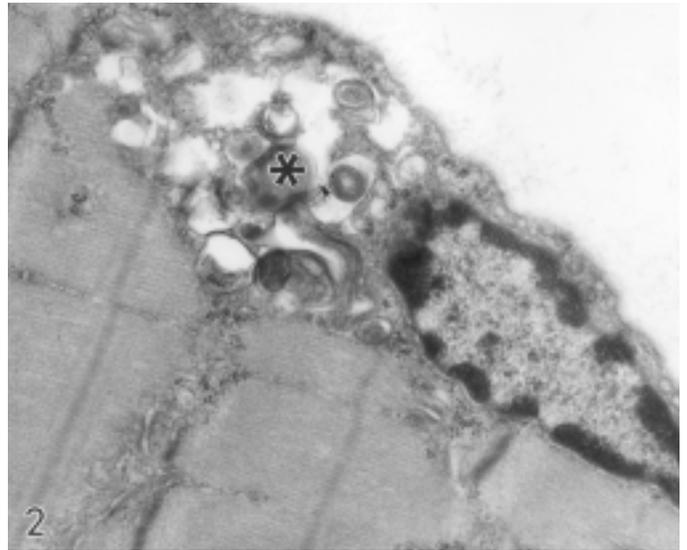
En oposición a los resultados reportados en caballos criollos infectados por *T. evansi* [10], y el canario infectado por *P. cathemerium* [4], la infección experimental de ratones por dos cepas de diferentes virulencia de *Toxoplasma gondii* y la RH [13] y la JKF [1, 2, 3], no exhibió necrosis segmentaria.

La ausencia de quistes contentivos de bradizoitos en los músculos *gastrocnemius* y sóleo de animales inmunocompetentes parasitados por la cepa RH de *T. gondii*, de acuerdo a Tonino y col. [13] es debido a autólisis, migración a otros tejidos o a un número no detectable de quistes. La aparición de alteraciones en la fibra muscular se evidenciaron a las 24 horas de la infección, de allí que la etiología de las mismas no podría ser atribuida a procesos autoinmunes como fue sugerido para la infección equina a distancia con *T. evansi* [10]. Al igual que en el caso de la infección producida por la cepa RH reportada por Tonino y col. [13], podría deberse a la liberación de algún factor injurioso por parte del parásito [7].

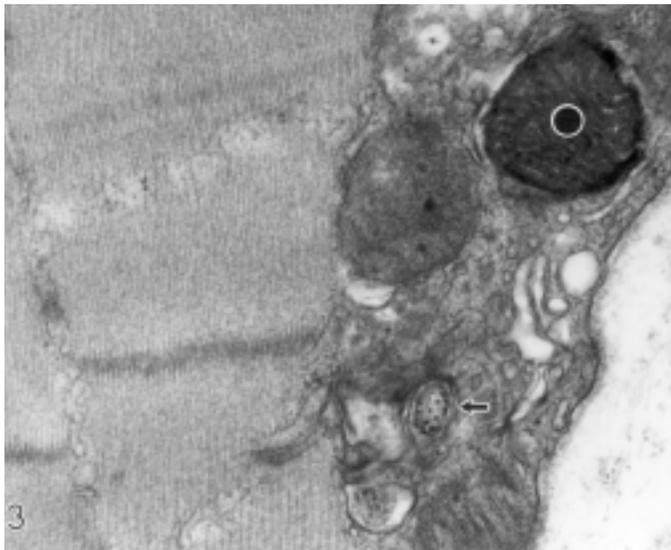
Las alteraciones observadas en los capilares, incluyendo la formación de prolongaciones endoteliales dirigidas hacia la luz del vaso, el engrosamiento de la pared endotelial al igual que el hinchamiento de las mitocondrias han sido relacionadas con diversas patologías [5, 6, 11]. Con respecto a las anomalías encontradas a nivel de la placa motora y el nervio motor en la toxoplasmosis experimental producida por la cepa JKF, son similares a las observadas por Tonino y col. [13] para la cepa RH de *T. gondii* y para el caso de la atrofia neurogénica [8].



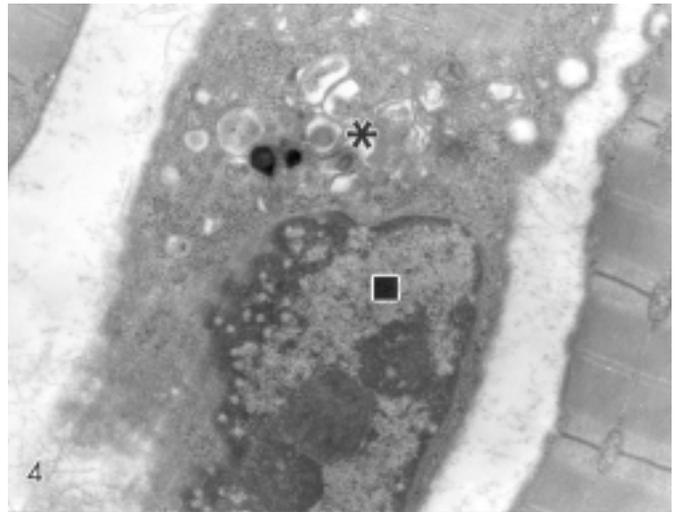
**FIGURA 1. EN ESTA MICROGRAFÍA ELECTRÓNICA SE OBSERVAN ELEMENTOS HINCHADOS DEL SISTEMA SARCOTUBULAR (CABEZAS DE FLECHAS); ESPACIO CORRESPONDIENTE A LA LÍNEA M Y BANDA H PERDIDAS (FLECHA); TRIADAS (CÍRCULOS); VACUOLA AUTO-FÁGICA (ASTERISCO). X 24.000.**



**FIGURA 2. EN ESTA MICROGRAFÍA ELECTRÓNICA NÓTESE LA PRESENCIA EN LA REGIÓN SUBSARCOLÉMICA Y PRÓXIMA AL NÚCLEO, DE UN COMPLEJO DE VACUOLAS AUTOFÁGICAS (ASTERISCO). X 30.000.**



**FIGURA 3. LAS VACUOLAS AUTOFÁGICAS ESTÁN REPRESENTADAS EN LA REGIÓN SUBSARCOLÉMICA POR GLUCOGENOSOMAS (FLECHA) Y VACUOLAS CON RESTOS MITOCONDRIALES (CÍRCULO). X 45.000.**

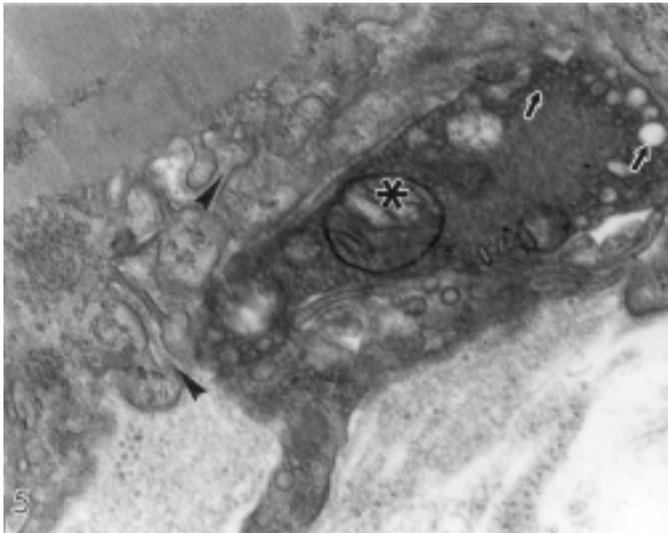


**FIGURA 4. MICROGRAFÍA ELECTRÓNICA DONDE SE OBSERVA LA FIBRA MUSCULAR TOTALMENTE ATRÓFICA. NÓTESE LA PRESENCIA DE FIGURAS MIELÍNICAS Y VACUOLAS AUTOFÁGICAS CON RESTOS MITOCONDRIALES (ASTERISCO) PRÓXIMAS AL MIONÚCLEO (CUADRADO). X 18.000.**

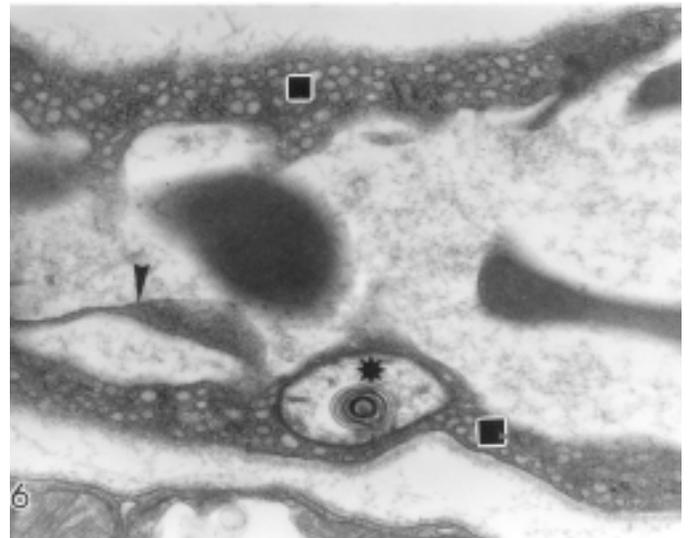
Los resultados mostrados sugieren que los cambios descritos en la ultraestructura de la fibra muscular pueden ser originados por las anomalías de la microvasculatura y los efectos provocados por una atrofia neurogénica que conllevan a diferentes grados de severidad en la agresión al músculo. Asimismo, las observaciones sugieren un efecto no aditivo de la ciclofosfamida sobre los cambios del músculo esquelético en la toxoplasmosis experimental ocasionada por la cepa JKF.

## CONCLUSIONES

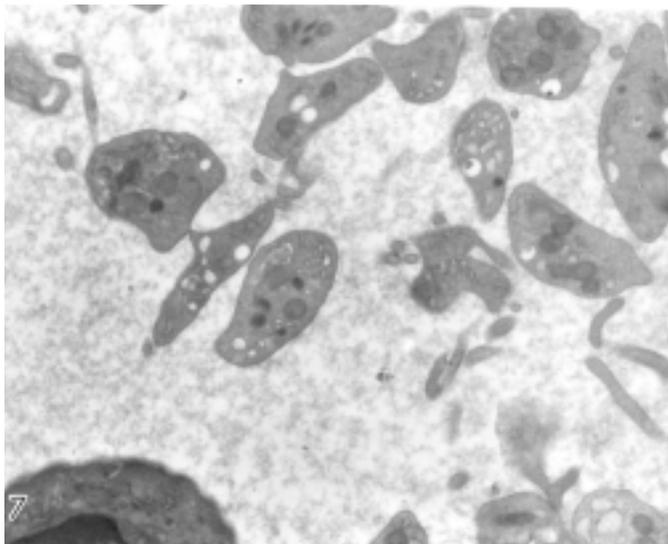
En relación a los ratones inmunosuprimidos por la aplicación del tratamiento con Ciclofosfamida, el análisis de los resultados muestra un cuadro histopatológico esencialmente similar al presentado por los hospedadores inmunocompetentes, distinguiéndose por la presencia en la microvasculatura muscular de abundantes parásitos y de un infiltrado mononuclear



**FIGURA 5. EN EL TERMINAL AXÓNICO, SE APRECIAN MITOCONDRIAS HINCHADAS (ASTERISCO) Y VESÍCULAS DE DIFERENTES DIÁMETROS (FLECHAS). NÓTESE LA DIFERENTE PROFUNDIDAD DE LAS HENDIDURAS SINÁPTICAS (CABEZAS DE FLECHAS). X 42.000.**



**FIGURA 6. EN ESTA MICROGRAFÍA ELECTRÓNICA SE OBSERVAN DIFERENTES GROSORES DEL CITOPLASMA ENDOTELIAL (CUADRADOS); UNA PROLONGACIÓN DEL CITOPLASMA ENDOTELIAL HACIA LA LUZ (CABEZA DE FLECHA); Y UNA MITOCONDRIA ALTERADA (ESTRELLA). X 36.000**

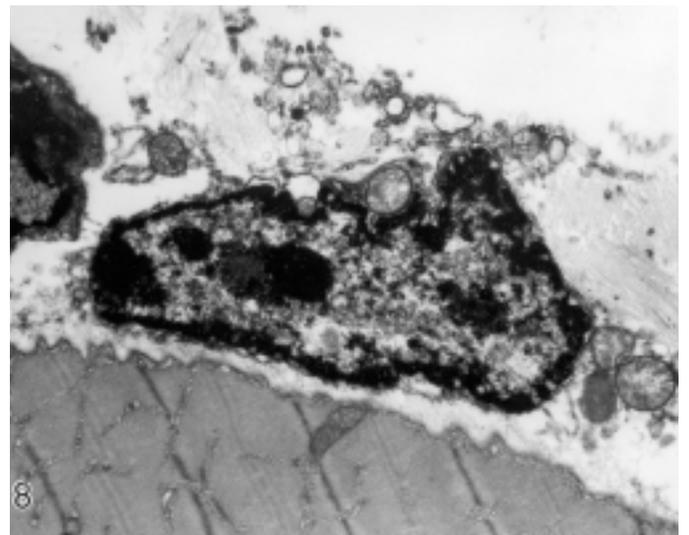


**FIGURA 7. NÓTESE LA PRESENCIA DE NUMEROSOS PARÁSITOS EN EL CAPILAR. X 15.000.**

más abundante. Aún cuando la cepa utilizada en el presente estudio ha sido caracterizada como no patógena por el tiempo de sobrevivencia de los ratones, los resultados descritos sugieren que, al menos, desde el punto de vista de la ultraestructura del músculo esquelético, las alteraciones observadas son diversas.

#### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] BRUZUAL, E.; FINOL, H.J.; ARCAY, L. Alteraciones neuromusculares en el ratón infectado con *Toxoplasma gondii*. **XII Congreso Latinoamericano de Parasitología**, Santiago de Chile, **Parasitología al Día**. 19: 405. 1995.



**FIGURA 8. EN ESTA MICROGRAFÍA ELECTRÓNICA SE OBSERVA QUE EL MACRÓFAGO SE LOCALIZA MUY PRÓXIMO A LA FIBRA MUSCULAR. X 12.000.**

[2] BRUZUAL, E.; FINOL, H.J.; ARCAY, L. Daños en la ultraestructura del músculo esquelético de ratones infectados con *Toxoplasma gondii*, **XLVIII Convención Anual de AsoVAC**, Maracaibo, Estado Zulia. **Acta Cient. Venez.** 49 (Supl. 2): 334. 1998.

[3] BRUZUAL, E.; FINOL, H.J.; ARCAY, L. Alteraciones ultraestructurales del músculo esquelético de ratones parasitados con una cepa considerada no patógena de *Toxoplasma gondii*. **Acta Biol. Venez.** 19: 11-16. 1999.

- [4] CARMONA, M.; FINOL, H.J.; MARQUEZ, A.; NOYA, O. Skeletal muscle ultrastructural pathology in *Serinus canarius* infected with *Plasmodium cathemerium*. **J. Submicrosc. Cytol. Pathol.** 28: 87-91. 1996.
- [5] FINOL, H.J.; TONINO, P.; MARQUEZ, A.; CORREA, M.; MÜLLER, B.; SOSA, L. Microvascular pathology in the skeletal muscle paraneoplastic phenomenon. **J. Submicrosc. Cytol. Pathol.** 29: 329-334. 1997.
- [6] HERNANDEZ, N.; TORRES, S.H.; FINOL, H.J.; VERA, O. Capillary changes in skeletal muscle of patients with essential hypertension. **Anat. Rec.** 256: 425-432. 1999.
- [7] KARASAWA, T.; TAKISAWA, I. MORITA, K.; ISHIBASHI, H.; KANAYAMA, S.; SHIKATA, T. Polymyositis and toxoplasmosis. **Acta Pathol. Jpn.** 31: 675-680. 1981.
- [8] MARQUEZ, A.; FINOL, H.J. Effects of neurotomy on human skeletal muscle ultrastructure. **Acta Cient. Venez.** 42: 219-225. 1991.
- [9] PULIDO-MENDEZ, M.; FINOL, H.J.; MARQUEZ, A.; AGUILAR, I.; GIRON, M.E.; GONZALEZ, N.; RODRIGUEZ-ZACOSTA, A. Adrenal cortex alterations in mice infected with *Plasmodium berghei*. **J. Submicrosc. Cytol. Pathol.** 29: 99-104. 1997.
- [10] QUIÑONES-MATEU, M.E.; FINOL, H.J.; SUCRE, L.E.; TORRES, S.H. Muscular changes in Venezuelan wild horses naturally infected with *Trypanosoma evansi*. **J. Comp. Path.** 110: 79-89. 1994.
- [11] RODRIGUEZ-ACOSTA, A.; FINOL, H.J.; PULIDO-MENDEZ, M.; MARQUEZ, A.; ANDRADE, G.; GONZALEZ, N.; AGUILAR, I.; GIRON, M.E.; PINTO, A. Liver ultrastructural pathology in mice infected with *Plasmodium berghei*. **J. Submicrosc. Cytol. Pathol.** 30: 299-307. 1998.
- [12] ROSSI, M.; BOADA-SUCRE, A.; FINOL, H.J.; TEJERO, F.; BELLO, B.; ASO, P.M.; HERNANDEZ, G. Ultrastructural alterations in the adrenal gland cortex of mice experimentally infected with a venezuelan isolate of *Trypanosoma evansi*. **J. Submicrosc. Cytol. Pathol.** 31: 509-513. 1999.
- [13] TONINO, P.; FINOL, H.J.; MARQUEZ, A. Skeletal muscle pathology in mice experimentally infected with *Toxoplasma gondii*. **J. Submicrosc. Cytol. Pathol.** 28: 521-526. 1996.