

Transmisión congénita de *Trypanosoma cruzi* en ratas Wistar de segunda generación

Elio A. Moreno¹, Martha Ramírez A¹, Maritza E. Alarcón¹, Ana Lugo de Yarbuh¹, Juana Villarreal¹, Sonia Araujo¹, Nora Mogollón¹, Anajulia González² & Gloria Premoli²

Se presentan los resultados de un estudio experimental sobre la transmisión congénita de *Trypanosoma cruzi* en crías de ratas albinas (*Rattus norvegicus*), cepa Wistar de segunda generación. El curso de la infección chagásica fue evaluado en las ratas infectadas inicialmente (R1I) inyectadas con las formas metacíclicas del parásito, en las crías de la primera (C1^aG) y segunda generación (C2^aG), mediante pruebas de diagnóstico seroparasitológicas y molecular (PCR). En las R1I se demostró infección aguda caracterizada por parasitemias patentes entre los 12 y 45 días post-inoculación (pi), e incremento en la respuesta inmune humoral con títulos desde 1:64 y 1:2048; en la fase crónica se evidenció ausencia de parasitemias y mantenimiento de una moderada respuesta humoral en el 100% de las madres. Las C1^aG no presentaron tripomastigotes en la sangre circulante, la prueba de IFI, reveló seropositividad apreciable en el 75% de los sueros. En las C2^aG, los exámenes directos de sangre y el hemocultivo, resultaron negativos; los xenodiagnósticos mostraron un 18,2% de positividad. Las pruebas serológicas empleadas (IFI y ELISA) detectaron un 31,8% y 34,1% anticuerpos circulantes anti-*T. cruzi*. La PCR aplicada a los sueros, presentó un bajo porcentaje de muestras positivas (6,8%) y en los tejidos (corazón y músculo esquelético) se observó una alta positividad de 54,5% y 45,4%, respectivamente. La presencia de formas flageladas en la sangre, la persistencia de la serología positiva por anticuerpos humorales transferidos vía materna y la permanencia de restos de ADN de *T. cruzi* en sueros y tejidos en un número importante de crías, confirma la infección congénita a su progenie, en segunda generación. Estos resultados son de gran importancia para una mejor comprensión de la epidemiología de la enfermedad de Chagas congénita.

Palabras clave: *Trypanosoma cruzi*, Transmisión congénita, ratas Wistar, segunda generación.

INTRODUCCIÓN

La transmisión vertical de *Trypanosoma cruzi* de la madre al hijo ha sido reportada en diferentes países de Latinoamérica. En Venezuela se describe el primer caso de transmisión transplacentaria en un niño de dos días de nacido, hijo de una madre con xenodiagnóstico positivo (Dao, 1949). Posteriormente, otros investigadores refieren nuevos casos de transmisión congénita con descripción de los aspectos clínicos y patológicos de fetos, neonatos y de lesiones placentarias (Gavaller, 1953; Pifano, 1960; Figallo,

1962). Recientemente, Feliciangeli *et al.* (2007) estudiando los factores de riesgo de la infección humana por *T. cruzi* en el estado Barinas, encontraron 4 (0,12%) niños seropositivos en una población de 3.296 examinados. La madre de uno de ellos también resultó seropositiva, lo que sugiere la transmisión congénita como factor de riesgo de la enfermedad de Chagas en esta área endémica.

En Sudamérica, los índices de transmisión congénita de la infección chagásica varían desde 0,1% en regiones de Brasil y Argentina hasta 7% o más en algunas áreas de Bolivia, Chile y Paraguay (WHO, 2002). Hoy día la transmisión congénita significa una importante vía de transmisión generadora de morbilidad y mortalidad a través de las formas aguda (Freilij & Biancardi, 2007) y crónica de la infección (Rassi *et al.* 2004). Por otro lado, en áreas libres de

¹ Laboratorio de Parasitología Experimental LAPEX), Facultad de Ciencia. Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela.

² Centro de Investigaciones Odontológicas, Facultad de Odontología: Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela.

*Autor de correspondencia: emorenob@ula.ve

transmisión vectorial de *T. cruzi*, se han detectado casos de transmisión congénita en segunda generación, como una nueva forma de transmisión (Schenone *et al.*, 1987; 2001; Sánchez *et al.*, 2005).

La transmisión congénita de *T. cruzi* puede ocurrir en cualquier fase de la infección materna, aunque el riesgo es mayor en la fase aguda debido a la presencia de parásitos circulantes (Bittencourt, 1992). La fisiopatología de la infección congénita no es muy bien conocida, sin embargo, se ha sugerido que madres infectadas transmiten las formas sanguíneas del parásito al feto por vía hematogena luego de su pasaje por mecanismos activos a través de la placenta. En las células de Hofbauer los tripomastigotes se transformarían en amastigotes, los cuales se multiplicarían activamente hasta romper las células y liberar los tripomastigotes, estas formas flageladas pueden atravesar el trofoblásto produciendo la infección del feto. Este pasaje probablemente se debe a una placentitis provocada por la multiplicación del parásito y/o por penetración activa de los parásitos hacia la circulación fetal (Bittencourt, 1992). En estos casos, las placentas infectadas muestran un importante aumento de peso, de aspecto amarillentas y edematosas, similar al observado en los casos de sífilis, toxoplasmosis y eritroblastosis fetal (Muñoz, 1998).

La transmisión congénita de *T. cruzi* ha sido demostrada en animales infectados natural y experimentalmente con diferentes cepas del parásito, tales como roedores (ratones, ratas y cobayos) (Mayer & Rocha-Lima, 1914; Carlier *et al.*, 1992; Davila *et al.*, 1994; Carrarão-Abrahão, 2000; Abdelkarim *et al.*, 2002; Moreno *et al.*, 2003; 2006;), caninos (Souza-Campos, 1932), monos (Sullivan *et al.*, 1994) y murciélagos (Añez *et al.* 2009). Moreno *et al.* (2005; 2006) estudiando ratas Wistar crónicamente infectadas con *T. cruzi* gestantes, encontraron nidos de amastigotes a nivel de la musculatura cardíaca, esquelética, útero y en las células del estroma placentario, asociados a una discreta miocarditis, miositis y vellositis con características de cronicidad. Señalan los autores que la persistencia de parásitos a nivel del miometrio y de la placenta, sugiere la posibilidad de infección al feto durante su desarrollo intrauterino.

Investigaciones recientes han mostrado el valor de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) como herramienta molecular para la detección de restos de ADN de *T. cruzi*, en casos humanos con infección

chagásica congénita (Winker *et al.*, 1994; Virreira *et al.*, 2003; 2006; 2007; Burgos *et al.*, 2007; Brutus *et al.*, 2008; Diez *et al.*, 2008; Corrales *et al.*, 2009). En este trabajo, utilizando métodos seroparasitológicos tradicionales y la nueva tecnología molecular (PCR), nos proponemos a investigar si la transmisión congénita de *T. cruzi* ocurre en crías de ratas Wistar de segunda generación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Parásitos

Utilizamos parásitos del aislado de *T. cruzi* I/PAN/Ve/00/Planalto, obtenidos a partir de un triatomino (*Panstrongylus geniculatus*), capturado en la ciudad de Caracas y caracterizado molecularmente como perteneciente al linaje I. Los parásitos fueron mantenidos mediante pasajes sucesivos en el medio cultivo NNN, ratones NMRI y triatominos (*Rhodnius prolixus*) criados en el laboratorio.

Inoculación de las ratas

Un total de 10 ratas hembras de 2 meses de nacidas obtenidas del Bioterio de Cría de la Universidad de Los Andes (BIOULA), ligeramente anestesiadas, fueron inicialmente inyectadas por vía intradérmica (ID) en la cara interna del miembro posterior derecho con un inóculo aproximado de 1×10^4 tripomastigotes metacíclicos de *T. cruzi*. Las ratas infectadas fueron mantenidas en el Bioterio experimental con alimento comercial ratarina® y agua *ad libitum*. El curso de la infección, fue seguido en cada animal a través de las muestras de sangre obtenidas del plexo ocular a los 12, 17, 24, 30, 45 y 60 días postinoculación (pi). Una parte fue utilizada para investigar parasitemias patentes, siguiendo el procedimiento de Brener (1962) y la otra, fue centrifugada a 3000 rpm y los sueros obtenidos se emplearon en la detección de anticuerpos específicos anti-*T. cruzi*, mediante la técnica de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) utilizando como conjugado anti-rata IgG producido en cabra (FITC-isotiosanato de fluoresceína (Sigma, Co) (Camargo, 1966).

En 8 RII, el curso de la infección fue evaluado a los 120 días pi. Las ratas chagásica en estado estacional de estrus y/o proestrus de su ciclo estral (Marcondes *et al.*, 2002), fueron apareadas con machos en una relación 2/1 por jaula. Un vez que las ratas mostraron signos de preñez, se colocaron

individualmente en jaulas con alimento comercial (ratarina[®], Protinal) y agua *ad libitum*, hasta el término de su gestación. Después del parto, las crías fueron amamantadas por sus madres hasta el destete, a los 30 días de nacidas.

Del total de crías de la primera generación (C1^aG), se separaron aleatoriamente 8 ratas juveniles hembras, las cuales fueron mantenidas en jaulas separadas en el Bioterio experimental con alimento comercial y agua *ad libitum*. Antes del apareamiento con machos sanos, la infección chagásica fue evaluada mediante pruebas seroparasitológicas tradicionales. Al término de la gestación, las ratas parieron normalmente y las crías de segunda generación (C2^aG) fueron mantenidas con sus madres hasta el destete.

Evaluación de la transmisión congénita de T. cruzi en las C2^aG

Se investigó la presencia de parasitemias patentes a los 15, 30 y 45 días de nacidas, mediante el examen directo de 5 µL de sangre recién extraída de la cola de cada una de las crías. Después de los 45 días, las parasitemias ocultas o subpatentes fueron evaluadas por métodos parasitológicos indirectos tales como el hemocultivo y el xenodiagnóstico. En la preparación de los hemocultivos se utilizaron 0,3 mL de sangre orbital obtenida estérilmente que fue agregada a los tubos con el medio de cultivo NNN, adicionados con solución salina como fase líquida y suplementados con penicilina y estreptomycin. Los tubos se colocaron en estufa a 27°C y fueron revisados a los 20 y 30 días de incubación, a fin de constatar la presencia de formas flageladas del parásito.

Los xenodiagnósticos fueron realizados utilizando 5 ninfas de IV estadio de *R. prolixus* obtenidas del Insectario de cría "Dr. Herman Lent" del Departamento de Biología, Facultad de Ciencias de la Universidad de Los Andes. Los triatomíneos fueron alimentados durante 30 minutos sobre cada una de las crías juveniles. Después de la ingesta sanguínea, las ninfas fueron colocadas en frascos de compota con trozos de papel previamente acondicionados para su desplazamiento y mantenidas bajo condiciones controladas de temperatura y humedad relativa en el insectario experimental. A los 30 días post-ingestión, las ninfas nuevamente se alimentaron sobre ratones sanos y 30 días después de la última ingesta sanguínea, el contenido intestinal de cada uno de los triatomíneos

fue recolectado, mezclado y homogenizado con solución fisiológica para examinarlas al microscopio de luz con mediano aumento (400X), a fin de constatar la presencia del protozoario dentro del vector.

Obtención y procesamiento de la sangre y tejidos

De cada una de las crías, se obtuvo aproximadamente 2 mL de sangre por ruptura con capilares heparinizados del plexo retro-orbital del ojo derecho. La sangre recogida en tubos eppendorf se dejó reposar a temperatura ambiente por 1 hora (h) y el suero fue separado por centrifugación a 2500 rpm durante 20 minutos (min). El suero obtenido, fue repartido en 3 viales estériles y almacenados a -20 °C, hasta su uso.

Todas las crías fueron sacrificadas para extraer el corazón completo que fue cortado frontalmente en dos partes y fragmentos de músculo esquelético poplíteo del miembro posterior derecho. Los órganos se fijaron en formalina neutra al 10% durante 48 h e incluidos en Paraplast (Monoject, St. Louis, MO, USA). Los cortes de corazón y músculo esquelético de 6 µm de espesor, fueron realizados en un microtomo American Optical spencer "820".

Estimación de anticuerpos (Ac) específicos anti-T. cruzi

La presencia de Ac anti-*T. cruzi* fue evidenciada cuantitativamente por las técnicas de IFI y por el Ensayo Inmunoenzimático (ELISA), utilizando como anticuerpo secundario anti- rata (IgG y IgM) conjugado con peroxidasa producida en conejo (Sigma) (Voller *et al.*, 1975).

Extracción de ADN de T. cruzi en sueros

Los sueros obtenidos de cada una de las crías, fue centrifugado a 3000 rpm durante 10 min a 5 °C, para su concentración. De los concentrados proteicos, se tomaron 10 µL de cada uno, se mezclaron con 8 µL de agua megapura y 2 µL de proteinasa K (20mg/mL). El sedimento final fue incubado durante 3 h a 37 °C y posteriormente se le añadieron 5 µL de Quelex 100 (20% en agua pura ajustado a pH 8,5 con NaOH); fue tratada a 95°C durante 10 min y centrifugada a 3000 rpm por 5 min. El sobrenadante obtenido fue utilizado en la ejecución de la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) (Rolfs *et al.* 1992).

Extracción de ADN de *T. cruzi* en tejidos

Las secciones de corazón y músculo esquelético fueron desparafinadas, utilizando xilol durante 20 min a 52 °C por 2 veces; 2 lavados con etanol al 100% y tratadas con sodium dodecyl sulfate (SDS) a 0,5% y proteinasa K (20 mg/mL), se incubaron a 56 °C durante toda la noche. Después de la inactivación de la proteinasa K, el ADN fue extraído usando la técnica de extracción con fenol:cloroformo y precipitación con etanol absoluto (González *et al.* 1994).

Detección del parásito por PCR

Durante la ejecución de la técnica se amplificó un producto de 126pb de la región del espaciador intergénico del ARN ribosomal del parásito: TCPM2: 5'-GGG AGA GGT TCC AGA TGT-3' y TCPM4: 5'-GTC GGA GCA GGG ACA GCA-3' (Bio-Synthesis. Inc. USA). La prueba fue realizada en un volumen de 25 µL que contenía 250-300 ng de ADN de las muestras, 0,2 µM de cada primer, 0,2 mM de cada dNTP (Promega, Madison, WI, USA), 1U de Go Taq DNA polimerasa, 1X de buffer de PCR y 2,5 mM MgCl₂. Se utilizó un termociclador (MJ Research, BioRad, USA), llevando a cabo los siguientes parámetros: 5 min a 94 °C seguido de 10 ciclos de 1 min a 94 °C, 1 min a 53 °C, 1 min a 72 °C y otros 25 ciclos de 1 min a 94 °C, 1 min a 53 °C y 1 min a 72 °C. Los productos amplificados fueron analizados en un gel de agarosa al 2%, teñidos con bromuro de etidio y visualizados en un analizador digital de geles (UVP, USA).

RESULTADOS.

Evaluación de la infección en las RII

Durante el curso de la infección chagásica, se observó la presencia de parasitemias patentes en el 100% de las RII, entre los 12 y 45 días pi, registrándose los máximos niveles parasitémicos a los 24 y 30 días pi, con promedios de $17,5 \pm 3$ y 9 ± 2 trip/mm³ de sangre. La mortalidad registrada durante la fase aguda de la infección, fue del 20% (2/10).

La presencia de anticuerpos polivalentes anti-*T. cruzi* detectados con la reacción de IFI, fue evidente a partir de los 12 días pi, observándose un aumento progresivo de los títulos que oscilaron entre 1:64 y 1:2048 respectivamente.

Evaluación de la infección en la C1^aG

Los exámenes parasicológicos directos efectuados a las C1^aG, no mostraron parasitemias patentes ni mortalidad. Los exámenes inmunológicos realizados con la técnica de IFI, reveló seropositividad en el 75% de las crías, con títulos de anticuerpos anti-*T. cruzi* que oscilaron entre 1:32 y 1:128.

Estimación parasitológica y serológica en la C2^aG

Los exámenes parasitológicos realizados en las muestras de sangre de cada una de las 44 crías juveniles, no mostraron parasitemias patentes. En los hemocultivos examinados a los 20 y 30 días, no se observaron formas flageladas de *T. cruzi*. Los xenodiagnósticos efectuados con ninfas de *R. prolixus*, revelaron una positividad en 8/44 (18,2%) crías. Las 8 crías que resultaron positivas, provenían de dos madres de la primera generación (Tabla I).

La reacción de la IFI, reveló reactividad positiva en el 31,8% (14/44) de los sueros de crías, con títulos de Ac anti-*T. cruzi* que oscilaron entre 1:32 y 1:128. Los sueros tratados con la técnica de ELISA, mostraron una seropositividad del 34,1% (15/44), con un cut-off de 0,140 de DO (Tabla I).

Detección de restos de ADN

La técnica de PCR aplicada a los 44 sueros obtenidos de las crías juveniles, determinó amplificados de restos de ADN de *T. cruzi* en 6,8% (3/44) de los sueros tratados (Tabla I). La PCR aplicada en las muestras de corazones y músculo esquelético de las crías, mostró porcentajes variables de amplificados de ADN del parásito de 54,5% (24/44) y 45,4% (20/44) respectivamente (Tabla I) (Fig. 1).

DISCUSIÓN

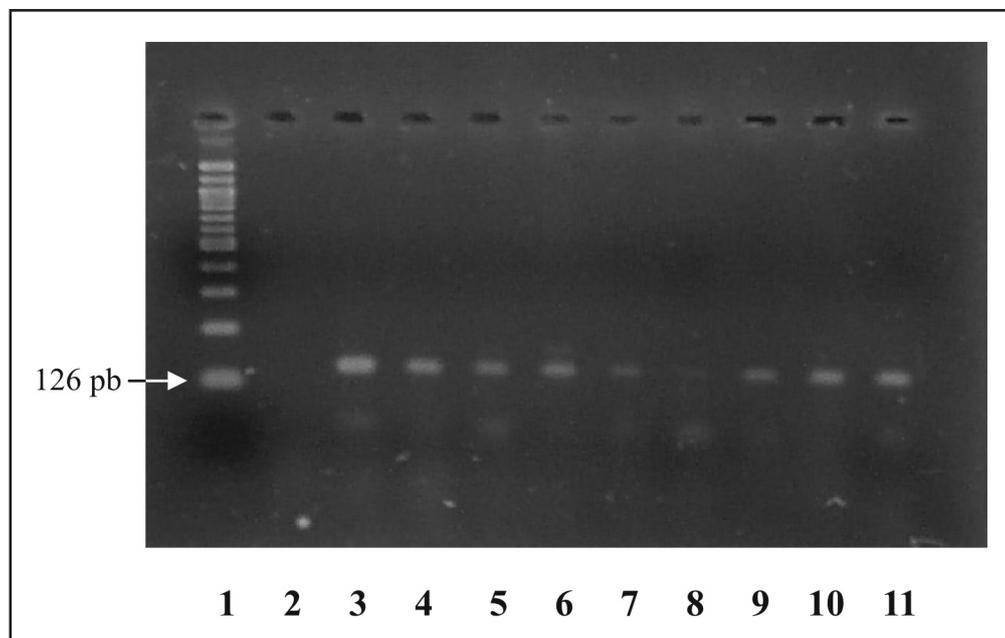
La transmisión vectorial sigue siendo en algunos países de América Latina el principal mecanismo de transmisión de *T. cruzi*, pero en los países donde se ha interrumpido esta forma de transmisión, la transmisión congénita adquiere más importancia, ya que este sería el principal factor, conjuntamente con la transmisión sanguínea de nuevas infecciones por *T. cruzi* (OPS, 2004). Este mecanismo de transmisión congénita de *T. cruzi* ha sido evidenciado en el modelo experimental rata Wistar, a un número reducido

Tabla I. Resultados de la pruebas diagnósticas aplicadas a las crías de ratas Wistar de segunda generación.

Rata N°	N° de crías	Pruebas diagnósticas aplicadas								
		Ex. Directo	Parasitológicas			Serológicas		molecular (PCR)		
			Hemocultivo	Xendiagnósticos	IFI	ELISA	sueros	C	ME	
1	3	-	-	-	1c+	1c+	-	3c+	3c+	
2	2	-	-	-	1c+	1c+	-	2c+	2c+	
3	2	-	-	-	1c+	2c+	-	2c+	2c+	
4	3	-	-	-	-	-	-	3c+	1c+	
5	8	-	-	3c+	3c+	3c+	1c+	5c+	3c+	
6	8	-	-	5c+	8c+	8c+	2c+	7c+	7c+	
7	10	-	-	-	-	-	-	-	-	
8	8	-	-	-	-	-	-	2c+	2c+	
Total	8	44	0	0	8/44	14/44	15/44	3/44	24/44	20/44
%					18,2	31,8	34,1	6,8	54,5	45,4

IFI: Inmunofluorescencia indirecta; ELISA: Ensayo inmunoenzimático; PCR: Reacción en cadena de la polimerasa; c: cría; ME: Músculo esquelético; C: Corazón

Fig. 1. Detección de restos de ADN de *T. cruzi* por PCR en muestras de tejidos de crías de ratas Wistar de segunda generación. Electroforesis en gel de agarosa al 2% con amplificados de 126 pb. Descripción: 1. Marcador de peso molecular; 2. Control negativo; 3. Control positivo; 4. Corazón de la cría 1; 5. Corazón de la cría 3; 6. Músculo esquelético de la cría 3; 7. Músculo esquelético de la cría 1; 8. Músculo esquelético de la cría 2; 9. Corazón de la cría 2; 10. Músculo esquelético de la cría 4; 11. Corazón de la cría 4.



de crías de la 1ªG (Moreno *et al.*, 2003). En este trabajo, utilizando el mismo modelo experimental, comprobamos por el método parasitológico tradicional como el xenodiagnóstico, la presencia del parásito dentro del vector; y por la PCR en sueros y tejidos, la persistencia de resto de ADN de *T. cruzi*, en las crías de segunda generación. Los xenodiagnósticos aplicados a las C2ªG, permitieron amplificar el número de parásitos que se encontraban presentes en la sangre, debido a la fácil multiplicación del parásito en el tubo digestivo del vector natural. La sensibilidad del método permitió detectar un moderado porcentaje de positividad (18,2 %) en las C2ªG. Las crías que desarrollaron formas flageladas de *T. cruzi*, provenían de dos madres de la 1ªG que no habían sido infectadas artificialmente, lo que sugiere que su infección chagásica fue adquirida por vía congénita. Este hallazgo es similar a los publicados en casos humanos por Schenone *et al.* (1987) en Chile, quienes describieron un primer caso de enfermedad de Chagas congénita de segunda generación; posteriormente, describieron dos nuevos casos de transmisión congénita en hijos de mujeres con xenodiagnósticos positivos, nacidos en la ciudad de Santiago y sin antecedentes de haber vivido en áreas endémicas para la enfermedad de Chagas (Schenone *et al.*, 2001). En Salta, Argentina, Sánchez *et al.* (2005) reportaron nuevos casos de transmisión congénita en segunda generación en 13 niños infectados con *T. cruzi* de un total de 26 niños estudiados, provenientes de 4 de 6 madres con infección chagásica. Por otro lado, Freilij & Biancardi (2007), señalaron haber asistido niños en el Hospital Ricardo Gutiérrez de Buenos Aires, cuyas madres también habían adquirido la infección por vía transplacentaria, conocido como Chagas congénito de segunda generación.

La respuesta humoral en ratas Wistar, experimentalmente infectadas con *T. cruzi*, ha sido evidenciada por diferentes investigadores (Kolodny, 1939; Moreno *et al.*, 2003; 2005; 2006). La presencia de Ac anti-*T. cruzi* en los sueros de las crías, fue confirmada utilizando dos técnicas serológicas de principios diferentes (IFI y ELISA), como es recomendado por la WHO (1991). Estos Ac anti-*T. cruzi*, así como los Ac de origen materno son transmitidos vía transplacentaria y/o a través del amamantamiento a una gran parte de las crías (Medina-Lopes & Macedo, 1983), los cuales, son los responsables en la instauración de un estado de resistencia, confiriéndole a las crías una cierta inmunidad contra nuevas infecciones por *T. cruzi*

(Kolodny, 1939; Miles, 1972; Marques de Araujo & Chiari, 1996; Mogollón, 2008).

Se ha señalado que la PCR es una técnica de gran sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de la infección por *T. cruzi*, en tejidos y en sangre total de pacientes chagásicos (Junqueira *et al.* 1996). Esta prueba diagnóstica ha sido exitosa durante la fase aguda de infección chagásica debido a las altas parasitemias. Mientras que en la fase crónica de la enfermedad la técnica ha funcionado con un 100 % de especificidad. Sin embargo, la sensibilidad ha presentado resultados variables y se requieren elevados volúmenes de sangre, debido a los niveles subpatentes de parasitemias presentes en los pacientes (Burgos *et al.*, 1994). Avila *et al.* (1993) al comparar la PCR con las técnicas parasitológicas convencionales, demostraron que la amplificación del ADN del kinetoplasto de *T. cruzi*, podría remplazar al xenodiagnóstico y a las pruebas serológicas para la evaluación de pacientes en la fase crónica de la enfermedad de Chagas. Mediante la aplicación de la PCR en un área rural de transmisión activa para la enfermedad de Chagas en Bolivia, Wincker *et al.* (1994) demostraron que 92,9% de los niños serológicamente positivos, presentaban parásitos en la sangre circulante, y dos niños con serología negativa, fueron confirmados con la PCR como casos positivos. Recientemente, Diez *et al.* (2008) en un estudio comparativo entre la PCR y el microhematocrito como método de concentración, basado en la identificación de formas sanguícolas y/o seroconversión después de 9 meses de edad, mostraron un 2,5% (3/121) de neonatos que fueron diagnosticados como infectados cuando utilizaron el microhematocrito, mientras 9,9% (12/121) de ellos fueron positivos con la PCR. Al comparar el análisis entre ambos métodos parasitológicos, la prueba de PCR mostró una mayor sensibilidad respecto al microhematocrito ($P < 0,0008$).

Estudios experimentales sobre la transmisión congénita de *T. cruzi*, efectuados en ratas Wistar, demostraron por medio de la PCR la presencia de restos de ADN del parásito en muestras de sueros de las crías nacidas de madres chagásicas (Ruiz, 2007). En este trabajo, aplicando esta técnica molecular a los sueros obtenidos de las C2ªG, se detectaron amplificados de ADN de *T. cruzi* en un bajo porcentaje de los sueros tratados (6,8 %), resultados que confirman la presencia del parásito en un número reducido de crías. No obstante, a pesar de que la PCR es una prueba más sensible que el xenodiagnóstico, la positividad

obtenida con esta técnica en los sueros fue mucho menor. Una explicación por el bajo número de reacciones positivas, podría ser atribuida a la presencia de muy pocos parásitos en la sangre de las crías y estos fueron escasamente detectados por la PCR, y la otra explicación estaría relacionada con la composición del suero sanguíneo, el cual es una solución acuosa de composición compleja que contiene un 91% de agua, proteínas y algunos rastros de otros materiales como electrolitos y hormonas, donde la porción de ADN esta reducida a trazas procedentes de células sanguíneas y parásitos que han sido destruidos (Brito *et al.*, 2001; Abbas & Lichtman, 2004).

La PCR aplicada a los tejidos fue más efectiva, demostrando la presencia de restos de ADN de *T. cruzi* en el músculo cardíaco (54,5%) y en la musculatura esquelética (45,4%). Estos altos porcentajes de positividad confirman la presencia del parásito en estos tejidos. Estos hallazgos concuerdan con los resultados publicados por Mejía & Triana (2005) quienes estudiando por LSSP-PCR la variabilidad genética de *T. cruzi* en sangre y órganos de ratones, encontraron en el corazón el mayor número de resultados positivos lo que indicaba la presencia de parásitos en este órgano. Ambos resultados apoyan el uso de pruebas de diagnóstico molecular para el estudio de la epidemiología de la enfermedad de Chagas.

En la literatura se ha señalado que esta metodología de alto impacto no permite discriminar la fase de la infección en la que se encuentra el individuo enfermo, por esta razón, siempre es recomendable utilizar otros métodos de diagnóstico convencionales que permitan diferenciar entre una infección reciente y otra tardía.

Finalmente, es importante seguir investigando los factores que pueden incidir en las variaciones observadas en la transmisión congénita del parásito en generaciones sucesivas, tales como: el hospedador vertebrado, el linaje genético del aislado de *T. cruzi*, la patogenicidad de los parásitos empleados, la forma y número de parásito inoculado así como la vía de inoculación; conociendo estos factores vamos a tener un mayor conocimiento sobre el mecanismos de transmisión congénita de *T. cruzi*.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo de Desarrollo Científico, Humanístico y Tecnológico por el financiamiento del Proyecto C-1368-06-03-B.

Congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* in second generation Wistar rats.

SUMMARY

The results of the experimental study concerning the congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* in second generation strain Wistar albino rats are presented. The course of the Chagas infection was evaluated in rats initially infected with the metacyclic forms of the parasite (RII) in first (C1stG) and second (C2ndG) generation offspring using parasitological, serological and molecular (PCR) diagnostic tests. In the RII, an acute infection characterized by patent parasitemias between 12 and 45 days post-inoculation and an increase in the humoral immune response with titers of 1:64 and 1:2048 in the chronic phase demonstrated the absence of parasitemia and maintenance of a moderate humoral response in 100% of the mothers. The C1stG did not show tripomastigotes in the blood circulation and the IIF test showed considerable seropositive in 75% of the sera. In C2ndG, direct blood and hemoculture exams performed were negative, while 18.2% of the xenodiagnosis were positive. The serological tests used (IIF and ELISA) detected 31.8% and 34.1% anti-*T. cruzi* circulating antibodies. The PCR applied to the serum presented a low percentage of positive (6.8%) samples and in tissues (heart and skeletal muscle) high positives of 54.5% and 45.4% respectively were observed. The presence of flagellated forms in the blood, the persistence of serological positive for humoral antibodies transferred by the mother and the permanence of remaining DNA of the *T. cruzi* in serum and tissues in a significant number of offspring confirm the congenital infection to their offspring in the second generation. These results are of great importance for the better understanding of the epidemiology of Chagas disease.

Key Words: *Trypanosoma cruzi*, congenital transmission, Wistar rats, second generation, polymerase chain reaction.

REFERENCIAS

- Abbas A. & Lichtman A. (2004). *Inmunología celular y molecular*. Saunder- Elsevier. 5ta Ed. España.
- Abdelkarim M., Lambot M. A., Stewart I. J., Detournary J. C. N., Carlier Y. & Truyens C.

- (2002). Acute *Trypanosoma cruzi* infection in mouse induces infertility or placental parasite invasion and eschismic necrosis associated with massive fetal loss. *Am. J. Pathol.* **161**: 673 - 680.
- Añez N., Crisante G. & Soriano P. (2009). *Trypanosoma cruzi* congenital transmisión in wild bats. *Acta Tropica.* **109**: 78 - 80.
- Avila H. A., Pereira J. V., Thiemann O., De Paiva E., De Grave W., Morel C. M. & Simpson L. (1993). Detection of *Trypanosoma cruzi* in blood specimens of chronic chagasic patients by polymerase chain reaction amplification of kinetoplast minicircle DNA: comparison with serology and xenodiagnosis. *J. Clin. Microbiol.* **31**: 2421- 2426.
- Bittencourt A. L. (1992). Possible risk factors for vertical transmission of Chagas' disease. *Rev. Inst. Méd. Trop. São Paulo.* **34**: 403 - 408.
- Burgos J. M., Altcheh J., Bisio M., Duffy T., Valadares H. M., Seidenstein M. E., et al. (2007). Direct molecular profiling of minicircle signatures and lineages of *Trypanosoma cruzi* bloodstream populations causing congenital Chagas' disease. *Int. J. Parasitol.* **37**: 1319-27.
- Brener Z. (1962). Observações sobre a imunidade a superinfecções em camundongos experimentalmente inoculados con *Trypanosoma cruzi* e submetidos a tratamento. *Ver. Inst. Méd. Trop. São Paulo.* **4**: 119 - 123.
- Britto C., Silveira C., Cardoso M.A., Marques P., Luquetti A., Macedo V. & Fernandes O. (2001). Parasite Persistence in Treated Chagasic Patients Revealed by Xenodiagnosis and Polymerase Chain Reaction. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **96**: 1 - 4.
- Brutus L., Schneider D., Postigo J., Romero M., Santalla J. & Chippaux J. P. (2008). Congenital Chagas' disease: diagnostic and clinical aspects in an area without vectorial transmission, Bermejo, Bolivia. *Acta Tropica.* **106**: 195 - 199.
- Camargo M. E. (1966). Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of american trypanosomiasis, technical modification employing preserved culture forms of *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.* **8**: 227 - 234.
- Carlier Y., Rivera M., Truyens C., Ontivero M., Flament J., Van Marck E., et al. (1992). Chagas' disease: decreased resistance to *Trypanosoma cruzi* acquired infection in offspring of infected mice. *Am. J. Trop. Méd. Hyg.* **46**: 116 - 122.
- Carrarão-Abrahão A. A., Lopes R. A., Salas M. A., Ribeiro R. D., Prado Jr. J. C., Albuquerque S. & Garcia T. A. R. (2000). Placental alterations of swiss mice infected with RAL strain of *Trypanosoma cruzi*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **95(Suppl. II)**: 122.
- Corrales R. M., Mora M. C., Negrette O. S., Diosque P., Lacunza D., Virreira M., et al. (2009). Congenital Chagas' disease involves *Trypanosoma cruzi* sub-lineage IId in the northwestern province of Salta, Argentina. *Infect. Genet. Evol.* **9**: 278 - 282.
- Dao L. (1949). Otros casos de enfermedad de Chagas en el Estado Guárico (Venezuela), formas agudas y crónicas; observaciones sobre enfermedad de Chagas congénita. *Rev. Policlin. Caracas.* **17**: 17-32.
- Davila H. O., Revelli S. S., Moreno H. S., Valenti J. L., Musso O. C., Poli H. O., et al. (1994). Infection with *Trypanosoma cruzi* during pregnancy in rats and a decrease in chronic myocardial lesions in their infected offspring. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **50**: 506 - 511.
- Diez C., Manattini S., Imaz M. S., Zanuttini J. C. & Marcipart A. (2008). PCR (polymerase chain reaction) in neonatal Chagas' disease. An alternative for its early diagnosis?. *Medicina (B. Aires).* **58**: 436 - 437.
- Feliciangeli M. D., Sanchez-Martin M. J., Suarez B., Marrero R., Torrealba A., Bravo A., et al. (2007). Risk factors for *Trypanosoma cruzi* human infection in Barinas state, Venezuela. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **76**: 915-992.
- Figallo E. L. (1962). La enfermedad de Chagas congénita. *Arch. Venez. Med. Trop. Parasitol. Méd.* **2**: 43 - 263.
- Freilij H. & Biancardi M. (2007). Enfermedad de Chagas Congénito. Mesa Redonda "Formas de transmisión

- congénita"; 1-12. Disponible en: URL: <http://www.fac.org.ar/fec/chagas2/llave/md3/md301/freilij.htm> (Consultado: Diciembre 12, 2009).
- Gavaller B. (1953). Enfermedad de Chagas congénita. *Bol. Mat. Concepción Palacios*. **4**: 167 - 173.
- González N., Galindo I., Guevara P., Novak E., Scorza J. V., Añez N., et al. (1994). Identification and detection of *Trypanosoma cruzi* by using a DNA amplification fingerprint obtained from the ribosomal intergenic spacer. *J. Clin. Microbiol.* **32**: 153 - 158.
- Junqueira A. C., Chiari E. & Wincker P. (1996). Comparison of the polymerase chain reaction with classical parasitological methods for the diagnosis of Chagas' disease in an endemic two region of north-eastern Brazil. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* **90**: 129 - 132.
- Kolodny M. (1939). The transmission of immunity in experimental trypanosomiasis (*Trypanosoma cruzi*) from mother rats to their offspring. *Am. J. Hyg.* **30**: 19 - 39.
- Marcondes F. K., Bianchi F. J. & Tanno A. P. (2002). Determination of the estrous cycle phases of rats: *Braz. J. Biol.* **62**: 609-614.
- Marques de Araujo S. & Chiari E. (1996). *Trypanosoma cruzi* infection in offspring born to chagasic C3H/He mice mothers. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **91**: 211-216.
- Mayer M. & Rocha-Lima H. (1914). Zum Verhalten von Schizotrypanum cruzi in warm blutern und Arthropoden. *Arch. F. U. Schiffs -u Tropenhyg.* **18**: 257 - 292.
- Medina-Lopes M. D. & Macedo V. (1983). *Trypanosoma cruzi* no calostro humanos. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **16**: 170.
- Mejía A.M. & Triana O. (2005). Análisis por LSSP-PCR de la variabilidad genética de *Trypanosoma cruzi* en sangre y órganos de ratones. *Biomédica.* **25**: 76 - 86.
- Miles M. A. (1972). *Trypanosoma cruzi*-milk. transmission of infection and immunity from mother to young. *Parasitol.* **65**: 11-21.
- Mogollón N. E. (2008). *Influencia de las reinoculaciones homólogas y heterólogas con Trypanosoma cruzi sobre las crías nacidas de ratas Wistar con infección chagásica crónica*. Trabajo Especial de Grado, Univ. de Los Andes, Mérida - Venezuela.
- Moreno E. A., Rivera I., Moreno S. C., Alarcón M. & Lugo de Yarbuh A. (2003). Transmisión vertical de *Trypanosoma cruzi* en ratas Wistar durante la fase aguda de la infección. *Invest. Clin.* **44**: 241-254.
- Moreno E. A., Araujo M. A., Alarcón M. E., Lugo de Yarbuh A., Araujo S. & Borges R. (2006). Efectos de la infección chagásica aguda en ratas Wistar gestantes. *Rev. Cientif. FCV-LUZ.* **16**: 506 - 516.
- Moreno E. A., Méndez M. J., Alarcón M. E., Araujo S., Lugo de Yarbuh A. & Moreno S. C. (2005). Reactivación de la infección chagásica en ratas Wistar gestantes. *Kasmera.* **33**: 51 -63.
- Moreno E. A., Quintero A. C., Alarcón M. E., Lugo de Yarbuh A., Moreno S. C, Araujo S. & Borges R. (2006). Investigaciones sobre la transmisión vertical de *Trypanosoma cruzi* en ratas Wistar crónicamente infectadas. *Bol. Mal. Salud Amb.* **46**: 149 - 160.
- Muñoz C. P. (1998). Transmisión congénita de parásitos. pp.: 509 - 522. En: *Parasitología Clínica*. Eds.: Attias-Negheme. Publicaciones Técnicas Mediterráneo. Santiago, Chile.
- OPS (2004). *Informe de la XIII Reunión para la Comisión Intergubernamental del Cono Sur para la eliminación del Triatoma infestans y la interrupción de la tripanosomiasis americana por transfusión*. Marzo 29-31, Buenos Aires, Argentina.
- Pifano F. (1960). Algunos aspectos de la enfermedad de Chagas en Venezuela. *Arch. Venez. Med. Trop. Parasit. Méd.* **3**: 73 - 99.
- Rassi A., Amato Neto V., Rassi G. G., Amato V. S., Rassi A. J., Luquetti A. & Rassi S. G. (2004). Busca retrospectiva da transmissão materna da infecção chagásica em pacientes na fase crônica. *Soc. Bras. Med. Trop.* **37**: 1 -12.
- Rolfs A., Schuller I., Finckh U. & Weber-Rolfs. (1992). PCR clinical diagnostic and research. Germany: Springer-Verlag, P 271.

- Ruiz G. (2007). Estudio de la modulación materna de la respuesta inmunológica de crías nacidas de ratas Wistar infectadas experimentalmente con *Trypanosoma cruzi*. Trabajo Especial de Grado, Univ. de Los Andes, Mérida, Venezuela.
- Sánchez O. N., Mora M. C. & Basombrio M. A. (2005). High prevalence of congenital *Trypanosoma cruzi* infection and family clustering in Salta, Argentina. *Pediatrics*. **115**: e668 - 672.
- Schenone H., Iglesias J., Schenone S. & Contreras M. C. (1987). Infección chagásica congénita de segunda generación. *Bol. Chil. Parasit.* **42**: 71 - 73.
- Schenone H., Gaggero M., Sapunar J., Contreras M. C. & Rojas A. (2001). Congenital Chagas' disease of second generation in Santiago, Chile. Report of two cases. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*. **43**: 231 - 232.
- Souza-Campos E. (1932). Tripanosome amaricana congénita do cao. *Méd. Prat.* **2**: 57 - 70.
- Sullivan J. J., Bishop H. S., Klippel-Means L., Rock L. & Ware D. (1994). Congenitally transmitted *Trypanosoma cruzi* among laboratory-reared offspring of naturally infected squirrel monkeys. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **51**: 170.
- Virreira M., Torrico F., Truyens C., Alonso-Veja C., Solano M. & Carlier Y. (2003). Comparison of polymerase chain reaction methods for reliable and easy detection of congenital *Trypanosoma cruzi* infection. *Am. J. Trop. Méd. Hyg.* **68**: 574 - 82.
- Virreira M., Alonso-Veja C., Solano M., Jijena J., Brutus L., Bustamante Z., et al. (2006). Congenital Chagas' disease in Bolivia is not associated with DNA polymorphism of *Trypanosoma cruzi*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **75**: 871-879.
- Virreira M., Truyens C., Alonso-Veja C., Brutus L., Jijena J., Torrico F., et al. (2007). Comparison of *Trypanosoma cruzi* lineages and levels of parasitic DNA in infected mothers and their newborns. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **77**: 102-106.
- Voller A., Draper C., Bidwell D., Brtleti A. (1975). Microplate enzyme-linked-immunosorbent assay for Chagas' disease. *The Lancet*. **1**: 426 - 428.
- Winker P., Bosseno M. F., Britto C., Yaksic N., Cardoso M. A., Medicis M. C. & Brenière S. F. (1994). High correlations between Chagas' disease serology and PCR-based detection of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast DNA in Bolivian children living in an endemic area. *FEMS Microbiol Letters*. **124**: 419 - 423.
- WHO (1991). *Control of Chagas' disease*. Tech. Rep. Ser. No. 811. Geneva, Switzerland.
- WHO (2002). *Control of Chagas' disease*. Tech. Rep. Ser. No. 905. Geneva, Switzerland.

Recibido el 07/07/2009
Aceptado el 10/04/2010