

Anomalías morfológicas y estructurales en fetos de ratones con infección aguda experimental por *Trypanosoma cruzi*

Mary Carmen Pérez¹, Maritza Alarcón^{1*}, Loredana Goncalves², Ana Lugo de Yarbuh¹, Elio Moreno¹, Sonia Araujo¹ & Juana Villarreal³

El presente estudio muestra el desarrollo de fetos de ratones hembras NMRI inoculadas con la cepa M/HOM/BRA/53/Y de *Trypanosoma cruzi* y preñadas durante la fase aguda de la infección. Altos niveles de parasitemias fueron observados en las ratones con 30 días post-infección y 20 días de gestación, en comparación con las detectadas en los ratones vírgenes e infectadas con *T. cruzi*. En 3 de los fetos (15%) provenientes de dos madres infectadas/gestantes con altas parasitemias, se observaron signos de anomalías congénitas morfológicas y estructurales músculo-esqueléticas. Presentándose en uno de los fetos la formación de dos protuberancias, una sobre el lado dorsal del cuerpo y la otra en la base de la pata inferior izquierda, en otro de los fetos, la pata derecha se desarrolló sobre el lado derecho de la cara y en un tercer feto se formó una protuberancia en la pata anterior izquierda a nivel de la región subescapular. El estudio histopatológico con hematoxilina y eosina de los tejidos muscular esquelético y cardíaco, mostró en el 10% (2/20) de los tejidos fetales, intenso infiltrado celular mononuclear con predominio de linfocitos, macrófagos o histiocitos y monocitos entre las fibras musculares y cardíacas, con discreta miositis y miocarditis. Con la técnica de peroxidada anti peroxidada se observaron abundantes depósitos antigénicos, tanto en placenta como en músculo esquelético de los fetos con alteraciones morfológicas. En los ratones infectadas/gestantes los fetos presentaron reducción del peso corporal y retardo en el crecimiento fetal, así como reducción en el número de fetos de 10 en comparación con 14 fetos de mayor tamaño y aspecto normal desarrollados en las ratonas sanas preñadas.

Palabras clave: *Trypanosoma cruzi*, preñez, ratón, anomalía morfológica fetal.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana se adquiere en las zonas rurales endémicas mediante la transmisión vectorial del *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* (Chagas, 1909), a través de contaminación con las excretas postprandiales de numerosas especies de triatominos hematófagos (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) contentivas de tripomastigotes metacíclicos (Kollien & Schaub, 2000). Además de esta vía de transmisión mediada por el vector, otras vías alternas han sido consideradas tales como, las transfusiones sanguíneas y transplantes

de órganos, infecciones accidentales en laboratorios, transmisión sexual, vía oral y por la vía congénita o transplacentaria (Días & Brener, 1984; Becker, 1975; Amato Neto *et al.*, 2000; Cardoso *et al.*, 2005; Bittencourt, 1992; Nilo *et al.*, 2005).

La infección congénita con *T. cruzi* ocurre tanto en humanos como en animales experimentales, con mayor riesgo de transmisión durante la fase aguda por la gran cantidad de tripomastigotes circulantes en la sangre periférica. Sin embargo, a pesar de las altas tasas de prevalencia de *T. cruzi* en mujeres gestantes en América del Sur, solo una pequeña proporción de los niños nacidos de estas madres infectadas desarrollan la infección con signos clínicos y síntomas compatibles con la fase aguda (Carlier & Torrico, 2003).

Los estudios en animales experimentales han reforzado el conocimiento sobre la interacción

¹ Laboratorio de Parasitología Experimental (LAPEX).

² Laboratorio de Inmunología de Parasitosis (LABINPAR), Depto. de Biología, Facultad de Ciencias.

³ Centro de Investigaciones Odontológicas, Facultad de Odontología, Universidad de los Andes. Mérida 5101, Venezuela.

*Autor de correspondencia: amaritza@ula.ve

materno-fetal, por *T. cruzi*, un efecto es el retardo en el crecimiento fetal (peso/talla), que puede ser asociado o no a la infección congénita, aun con evidentes parasitemias en las madres gestantes (Andrade, 1982). Durante el embarazo la madre desarrolla una respuesta inmune supresora, por lo que la transferencia de antígenos de *T. cruzi* al feto, podría influir en la capacidad de la progenie de responder a la infección, por modular su sistema inmunológico (Carlier & Truyens, 1999).

La anatomía patológica de la infección congénita ha sido verificada por numerosas investigaciones tanto en la placenta como en el producto de la gestación, en este sentido la patología de la infección fetal se ha relacionado con mortinato, abortos, lesiones reticuloendoteliales y del músculo esquelético, corazón, piel, esófago e intestino (Bittencourt, 1976; Freilij & Altcheh, 1994) y asociada a manifestaciones clínicas específicas y no específicas (Zaidenberg, 1998). En este sentido, es de particular interés reconocer la virulencia, patogenicidad y procedencia de los parásitos que producen infecciones intrauterinas con consecuencias patológicas importantes, por cuanto la infección fetal puede producirse en etapas tempranas de la gestación (Alarcón *et al.*, 2006). Algunos autores han sugerido que las lesiones causadas en la placenta y en los fetos depende de la heterogeneidad de las cepas de *T. cruzi*, lo cual juega un papel muy importante en la transmisión congénita (Sala *et al.*, 2006). Los niños recién nacidos que sufrieron infección intrauterina presentaron diferentes grados de morbilidad y compromiso del estado general, relacionado con hipotonía muscular, fiebre y hepatoesplenomegalia. En otros casos la patología reveló cuadros de insuficiencia cardíaca, meningoencefalitis con crisis convulsivas, microcefalia y en niños con infección congénita, las manifestaciones clínicas tardías fueron, principalmente, hepatoesplenomegalia e insuficiencia cardíaca, sin embargo luego de diez años de seguimiento no se observaron secuelas cardiovasculares (Feilij & Altchet, 1994; Pehrson *et al.*, 1982).

El objetivo del presente trabajo consistió en estudiar los fetos de ratones de la cepa NMRI con infección chagásica aguda desde el punto de vista morfométrico, histopatológico e inmunocitoquímico para conocer potenciales anomalías causadas por el parásito, en la etapa fetal.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepa de Trypanosoma cruzi

Se utilizaron tripomastigotes metacíclicos de la cepa M/HOM/Bra/53/Y de *T. cruzi* (Pereira da Silva & Nussenzweig 1953), mantenidos mediante pasajes sucesivos en medio de cultivo NNN, en ratones NMRI isogénicos y en ninfas de *Rhodnius prolixus* criadas en laboratorio y comprobadamente sanas.

Infección experimental de las ninfas de R. prolixus

Preparación del inóculo de *T. cruzi*. ninfas de V estadio de *R. prolixus*, criadas en laboratorio y comprobadamente sanas, fueron alimentadas hasta la repleción sobre ratones con altas parasitemias.

A los 30 días post-ingesta sanguínea, las ninfas fueron alimentadas nuevamente sobre ratones sanos, las deyecciones fueron revisadas para la cuantificación de los parásitos (Brenner, 1962). El inóculo fue ajustado a 22×10^3 tripomastigotes metacíclicos en 5 μ L de suspensión.

Infección experimental y apareamiento

Un total de 24 ratones hembras NMRI (*Mus musculus*) de un mes de nacidas y con un peso promedio de 20 g, fueron separadas en 4 grupos de 6 ratones cada uno: infectadas y preñadas en fase aguda de la infección (IP), vírgenes e infectadas (VI) (control infectado), sanas vírgenes (SV) (control sano) y sanas preñadas (SP) (control gestante). 12 ratones fueron infectados con 22×10^3 tripomastigotes metacíclicos de *T. cruzi* por vía intraperitoneal (ip). La parasitemia fue estimada a partir de los 5 días post-inoculación (pi) en 5 μ L de sangre extraída de la cola de cada ratón (Brenner, 1962). Los 12 ratones restantes fueron inyectados con 0,05 mL de solución salina por la vía ip. El contenido vaginal de 6 de los ratones infectados con *T. cruzi* (IP) y de 6 ratones sanas (SP) fue revisado y la presencia de células nucleadas y epiteliales cornificadas en el moco vaginal, comprobó que se encontraban en proestro o estro del ciclo estral (Waynforth & Flecknell, 1992), luego fueron colocadas en jaulas individuales en una relación 2 hembras:1 macho durante 3 días y una vez comprobada la presencia de espermatozoides en el frotis del contenido vaginal, fueron separadas de los machos y mantenidas con Ratarina® y agua ad libitum.

Extracción de los fetos

Los ratones infectados (IP) y los sanas preñadas (SP) a término de su gestación fueron sacrificados con éter dietílico y después de la necropsia los fetos fueron extraídos de cada uno de los sacos uterinos, a través de una incisión longitudinal del saco uterino, luego se lavaron con solución fisiológica y el corazón y fragmentos de músculo esquelético fueron extraídos a cada feto, fijados en formalina neutra al 10%, deshidratados en alcohol isopropílico, alcohol-acetona 1:1, acetona-xilol 1:1 y xilol, xilol-paraplast 1:1 a 60°C durante 12 hr, impregnados con Paraplast (Monoject Scientific, St. Louis, MO. USA) a 56°C por 12 hr, cortados en secciones de 7 µm de espesor con un microtomo Spencer y coloreados con Hematoxilina y Eosina (HE) (Sigma, St. Louis. USA). La detección de restos antigénicos de *T. cruzi* fue realizada mediante la utilización de la técnica de peroxidasa anti-peroxidasa (PAP). Los cortes de tejidos fetales desparafinados se incubaron con peróxido de hidrógeno al 3% en metanol por 30 minutos y con suero normal de cabra al 30% en PBS. Las muestras se incubaron 1 hora con suero anti-*T. cruzi* producido en conejo diluido 1:300 en PBS a pH 7,2, 45 minutos con anti-IgG de conejo producido en cabra conjugado a peroxidasa (HRP) diluido 1:500 en PBS, 45 minutos con solución reveladora (una pastilla de 3,3- diaminobenzidina (DAB) y una de urea en 5 mL de agua deionizada) y contracoloradas con Hematoxilina de Mayer durante 1 hora. Finalmente se cubrieron con glicerina tamponada y fueron observadas al microscopio óptico con objetivo de 40X.

El manejo de los animales experimentales se llevó a cabo siguiendo el protocolo para el manejo de animales de experimentación del Comité de Bioética y Seguridad de FONACIT (www.fonacit.gob.ve) en su capítulo 2.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías y un Test de Tukey con un nivel de significancia del 95% para estudiar diferencias significativas en las parasitemias registradas para los ratones infectados/gestantes y vírgenes/infectados según Box *et al.* (2005).

RESULTADOS

Evaluación de la parasitemia. Los valores más altos de parasitemia $58,94 \pm 26,5$ trips/mm³ de

sangre, fueron observados en los ratones infectados/gestantes (IP) a los 14 días pi y 4 días de gestación, con disminución a $25,62 \pm 7,71$ trips/mm³ de sangre a los 30 días pi y 20 días de gestación, tiempo en el cual se sacrificaron los ratones para la extracción de los fetos. En el grupo de ratones vírgenes/infectados (VI) el valor más alto de parasitemia de $52,30 \pm 21,14$ trips/mm³ de sangre fue observado a los 30 días pi (Fig. 1). La comparación entre las parasitemias de los ratones infectados/gestantes y los ratones vírgenes infectados con *T. cruzi* reveló diferencias estadísticamente significativas ($P=0,023$).

Características morfológicas específicas de los fetos. De 20 fetos a término de su desarrollo intrauterino en los ratones (IP) con *T. cruzi*, 3 (15%) de ellos desarrollaron alteraciones morfológicas corporales. En dos de estos fetos provenientes de una misma madre IP, uno de ellos presentó la formación de dos protuberancias, una sobre la porción dorsal posterior del cuerpo a nivel de la columna vertebral y la otra en la base de la pata inferior izquierda (Fig. 2A), en el otro feto se desarrolló la pata superior derecha sobre el lado derecho de la cara (Fig. 2B). En un feto proveniente de otra madre del mismo grupo IP, se observó el desarrollo de una protuberancia de la pata superior izquierda a nivel de la región subescapular (Fig. 2C).

En estas madres IP se observó una reducción tanto en el tamaño corporal como en el número de fetos, registrándose en el útero de las 6 madres infectadas (14, 6, 12, 12, 9 y 10 fetos) un promedio de 10 fetos/

Fig. 1. Cinética de los niveles de parasitemias ± D.E. detectadas en los ratones gestantes infectados y en ratones vírgenes infectados, ambas en fase aguda producida por *Trypanosoma cruzi*, cepa Y.

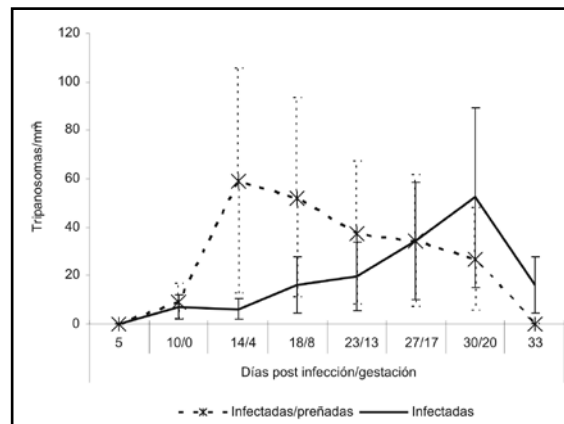
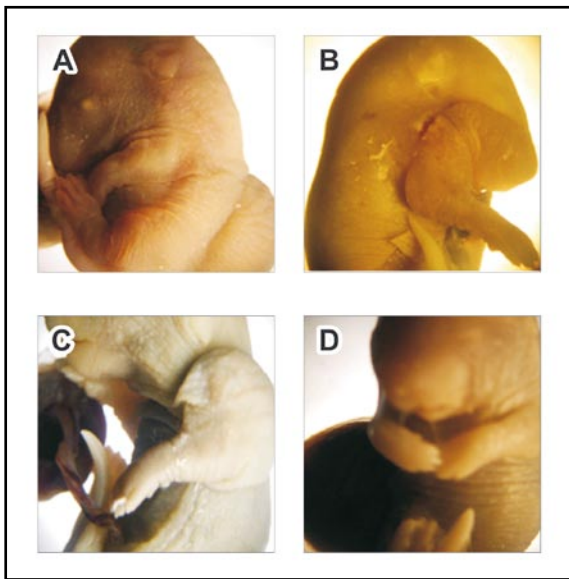


Fig. 2. Fetos de ratones NMRI con 30 días de infección con *Trypanosoma cruzi* y 20 días de desarrollo intrauterino que muestran: A) Feto con formación de dos protuberancias: una sobre la porción dorsal posterior del cuerpo a nivel de la columna vertebral y la otra en la base de la pata superior izquierda, B) desarrollo de la pata superior derecha sobre el lado derecho de la cara (→); C) desarrollo de una protuberancia de la pata superior izquierda en la región subescapular; D) feto de ratón sano gestantes con crecimiento y desarrollo intrauterino de aspecto normal (400X).



madre, mientras que en las madres sanas se observó un promedio de 14 fetos/madre con crecimiento y desarrollo intrauterino de aspecto normal. (Fig. 2D). Las malformaciones fueron observadas en uno de 6 fetos de una madre IP y en dos fetos de otra madre IP de la cual obtuvimos 10 fetos, cabe destacar que ambas madres presentaron los mayores valores de parasitemias a los 14/4 y 18/8 días pi/gestación. (Tabla I).

Estudio Histopatológico. En los tejidos cardíaco y muscular esquelético del 10% (2/20) de los fetos provenientes de las madres con infección chagásica aguda, se observó infiltrados celulares linfocitarios, macrófagos y monocitos entre las fibras musculares cardíacas y esqueléticas respectivamente, todo ello sin parasitismo tisular evidente a microscopia de luz (Fig. 3).

Estudio Inmunocitoquímico mediante la técnica PAP: En las secciones de placenta y músculo esquelético de los fetos de madres infectadas,

Fig. 3. A) Corte histológico de corazón de feto de ratón con infección chagásica aguda y 20 días de desarrollo intrauterino que muestran infiltrado linfocitario focalizados entre las fibras cardíacas y próximos a los vasos sanguíneos con destrucción del tejido cardíaco (sin presencia de parásitos a la microscopia de luz). B y C) Cortes de tejido muscular esquelético fetal que muestran intenso infiltrado de células inflamatorias constituidas por macrófagos, linfocitos y monocitos, sin presencia de parásitos (→) (H-E. 400X, 1000X).

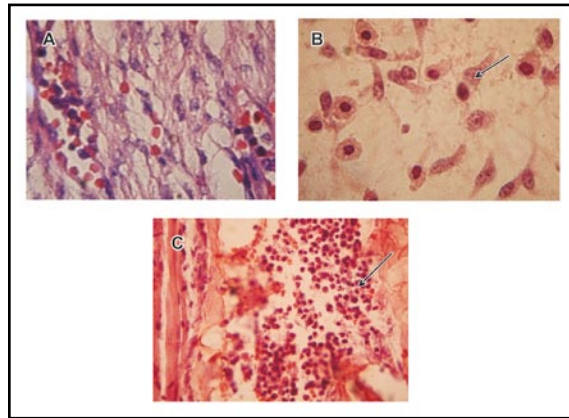


Fig. 4. Secciones histológicas de músculo esquelético de fetos de madres infectadas con la cepa Y de *Trypanozoma cruzi*, en las que se observan intensos depósitos antigénicos e infiltrado linfocitario entre las fibras musculares acompañado de daño tisular (A, B y C), sección de placenta de ratón infectada con depósitos antigénicos focalizados en el estroma (D) (PAP, 400X) (todo en ausencia de parásitos a la microscopia de luz).

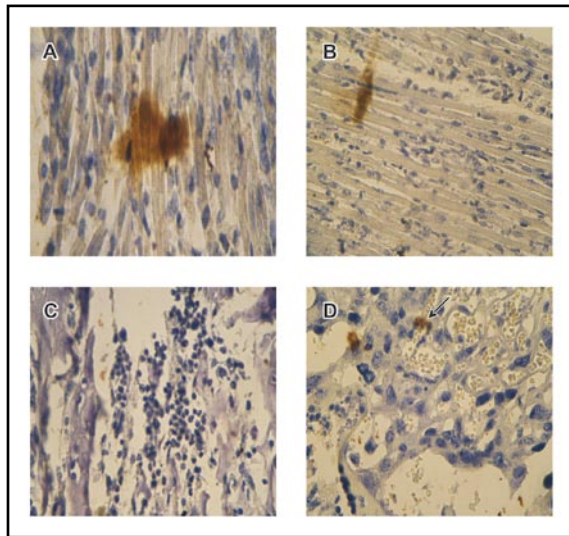


Tabla I. Número de fetos nacidos de madres sanas y de madres infectadas.

Madre N°	Número de fetos de madres sanas	Número de fetos de madres infectadas	
		Sin malformaciones aparentes	Con malformaciones
1	14	14	0
2	14	5*	1
3	13	12	0
4	14	12	0
5	14	9	0
6	14	8*	2

* Madres con altas parasitemias

con alteraciones morfológicas, fueron observados apreciables depósitos antigénicos de *T. cruzi* focalizados entre y sobre las fibras musculares, así como a nivel del estroma (Fig. 4).

DISCUSIÓN

En este estudio, empleando ratones hembras NMRI infectadas con la cepa Y de *T. cruzi*, observamos por medio de la técnica PAP depósitos antigénicos de *T. cruzi* en las secciones de placenta y de músculo esquelético de los fetos que presentaron alteraciones morfológicas y estructurales, confirmando de esta manera la liberación de proteínas y el paso del parásito por los tejidos fetales, aún cuando no se detectaron parásitos en las secciones tisulares estudiadas. Los resultados también revelaron la existencia de una relación directa entre el compromiso inflamatorio de la placenta y la infección fetal; resultados similares a los encontrados por Moreno *et al.* (2005), quienes observaron el infiltrado inflamatorio y depósitos antigénicos en las secciones de placentas y úteros de ratas Wistar crónicamente infectadas y con reactivación de la infección durante la gestación. Más recientemente Badra *et al.* (2008) observaron transmisión placentaria en ratones infectados con una cepa de *T. cruzi* aislada de murciélagos con cambios histopatológicos y presencia de nidos de amastigotes en úteros y placentas de los ratones durante la fase aguda de la infección, así como la presencia de nidos de amastigotes en el músculo esquelético fetal, confirmando la transmisión transplacentaria.

Los estudios de Id Boufker *et al.* (2006) haciendo seguimiento de embriogénesis in vivo e in vitro de ratones BALB/c experimentalmente infectados, han determinado que la infección aguda

por *T. cruzi* induce infertilidad, a pesar de que la ovulación, fertilización y primera división del cigoto, no se ve afectada ni demorada, sin embargo del estado de dos células a la fase de blastocisto se produce una desaceleración celular, no alcanzándose la fase de ocho células, por lo que en el desarrollo embrionario se produce un número insuficiente de blastómeros y otros degeneran. Estos y otros eventos estarían produciendo irregularidades en los procesos de diferenciación celular, crecimiento y desarrollo fetal, como lo observado en 3 (15%) de los fetos de ratones infectados, en los cuales se observaron diferencias en la fecundidad relacionada con una disminución en el número de fetos en comparación con los ratones sanos gestantes, los cuales mostraron un mayor número de fetos con tamaño corporal y desarrollo normal. En otras investigaciones Solana *et al.*, (2000) trabajando con ratones C3H/HeN infectados con las cepas RA y K98 determinaron diferencias en la fecundidad, en la producción de abortos y en la presencia parasitaria en las crías, afirmando que la cepa de *T. cruzi*, sería un factor determinante en los distintos aspectos de la infección congénita.

Las manifestaciones clínico patológicas y la infección fetal por *T. cruzi* pueden producirse tanto en etapas tempranas como tardías de la gestación, por lo que no existe ningún período exento del riesgo, de tal forma que se han reportado diversos patrones clínicos y datos sobre morbilidad y mortalidad en recién nacidos de madres con infección aguda, crónica y con recrudescencia de la infección crónica por efecto de la gestación. Por lo tanto la enfermedad de Chagas congénita puede resultar de un complejo equilibrio entre la respuesta inmune materna, factores placentarios, y las características de la cepa (Torrico *et al.*, 2004; Burgos *et al.*, 2007; Brutus *et al.*, 2008).

En el modelo experimental de infección congénita empleado, los tejidos cardíaco y muscular esquelético fetales, desarrollaron un proceso inflamatorio, inducido probablemente por la infección chagásica aguda de la madre, ocasionando anomalía tisular en los fetos, con características de una miocarditis y miositis, tal como se han detectado en recién nacidos con infección intrauterina, en los cuales es frecuente observar insuficiencia cardíaca o meningoencefalitis con crisis convulsivas, cardiomegalia, derrame pleural, taponamiento cardíaco y elevada mortalidad (Saleme *et al.*, 1971).

Por otro lado y en relación con la enfermedad de Chagas experimental y los defectos congénitos, la prole puede provenir de madres que durante el embarazo se encuentran con una infección clínica, subclínica, reactivación, reinfección o una infección crónica latente y cada una de estas situaciones puede ser infectante para el recién nacido. En este sentido, la transmisión al feto puede ocurrir por la vía transplacentaria en el 10% de las portadoras en fase aguda o crónica de la infección materna, sin embargo aún se desconocen los factores que protegen a la gran mayoría de los hijos de madres infectadas con *T. cruzi*, los cuales nacen libres de la infección anomalías morfológicas, estructurales, funcionales o moleculares irreversibles, las cuales provocan una amplia variedad de patologías en los fetos. Los resultados del presente estudio evidenciaron manifestaciones clínicas con retraso en el crecimiento corporal intrauterino y signos de anomalías congénitas músculo-esqueléticas severas en 3 (15%) fetos, en los cuales se produjeron alteraciones en la organización celular y en la maduración de sus sistemas, durante el período de gestación, cuando los fetos se encuentran con un sistema inmunológico inmaduro y una carga hormonal circulante en el feto de madres con infección chagásica aguda (Villarreal & Reyes, 2004). Otras investigaciones en humanos y ratas han sugerido que la reducción en el peso corporal y en el tamaño fetal atribuidas a la infección materna por *T. cruzi*, es provocada por la disminución en la absorción de alimentos, así como a las lesiones placentarias que afectan la transferencia de nutrientes de la madre al feto (Mjihdi *et al.*, 2002).

Finalmente concluimos que la enfermedad de Chagas congénita constituye por su importancia epidemiológica la tercera vía de transmisión del *T. cruzi*

al hombre. La incidencia de la transmisión vertical de *T. cruzi*, en los países de América Latina depende de factores epidemiológicos así como de la tasa de seroprevalencia, diferencias genéticas, inmunológicas y nutricionales de las madres gestantes con infección chagásica, sin embargo aún se desconocen los factores que condicionan la infección transplacentaria, al observarse que solo una pequeña proporción de los hijos de madres chagásicas adquieren la infección por esta vía (García *et al.*, 2001; Feliciangeli *et al.*, 2007; CLAP-OPS/OMS, 2007; Brutus *et al.*, 2008).

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo de Desarrollo Científico y Tecnológico de la Universidad de los Andes, Proyecto: C-1476-07-03-B.

Morphological and structural anomalies in fetuses of mice with acute experimental infection by *Trypanosoma cruzi*

SUMMARY

The present study shows the development of the fetuses from pregnant female mice NMRI inoculated with M/HOM/BRA/53/Y *Trypanosoma cruzi* strain. The infection revealed the highest levels of patent parasitemia in mice with 30 days post-infection and 20 days of pregnancy in comparison with infected unmated mice. Three fetuses (15%) from two infected mice with high levels of parasitemia, showed morphological and structural muscular-skeletal congenital anomalies. Two protuberances were observed, one on the dorsal side of the body, and the other on the left footpad base. In another fetus his right footpad came out from the right part of his face and in the 3rd one it was observed a lump in the left leg, above the level subscapular region. The histopathological study with hematoxylin-eosin staining of skeletal muscle and cardiac tissue, showed in 10% (2/20) of the mice, inflammatory infiltrate with lymphocytes, macrophages and monocytes into muscular and cardiac fibers, with discrete myositis and myocarditis. Peroxidase anti-peroxidase staining showed *T. cruzi* antigens in placenta and skeletal muscle of the fetuses with morphological alterations. In the pregnant mice, fetuses also showed both, loss of weight and growth retardation, as well as reduction

of the number of fetuses to 10 in comparison with 14 fetuses in normal and healthy pregnant mice.

Key words: *Trypanosoma cruzi*, pregnancy, mice, fetal morphological anomalies

REFERENCIAS

- Alarcón M., Lugo de Yarbub A., Moreno E., Payares G., Araujo S. & Colmenares M. (2006). Presencia de *Trypanosoma cruzi* en tejidos de ratas Wistar infectadas experimentalmente y sus fetos. *Bol. Malarial. Salud Amb.* **46**: 137-148.
- Amato Neto V., Lopes M., Setsu E., de Sousa R & Pinto Dias J. (2000). Outras formas de transmissão do *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Pat. Trop.* **29**: 115-129.
- Andrade SG. (1982). The influence of the strain of *Trypanosoma cruzi* in placental infections in mice. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **76**: 123-128.
- Badra E. S., Sala M. A., Lopes R. A., Prado J. C. Jr., Albuquerque S., Zucoloto S. & Carraro-Abraham A. A. (2008) Histopathological Changes in the placental and fetuses of mice infected with *Trypanosoma cruzi* isolated from the *Myotis nigricans* bat. *J. Comp. Pathol.* **139**: 108-112.
- Becker P. (1975). Molestia de Chagas aguda accidental. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.* **17**: 187-198.
- Bittencourt A. L. (1976). Congenital Chagas' disease. A review. *Am. J. Dis. Child.* **130**: 97-102.
- Bittencourt A. L. (1992). Possible risk factors for vertical transmission of Chagas' disease. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.* **34**: 403-408.
- Box G. E., Hunter J. S. & Hunter W. G. (2005). *Statistics for Experimenters: Design, Innovation, and Discovery*. 2ª edición, Ed. John Wiley & Sons. N.Y., USA.
- Brener Z. (1962). Observações sobre a imunidade a superinfecções em camundongos experimentalmente inoculados com *Trypanosoma cruzi* e submetidos a tratamento. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.* **4**: 119-123.
- Brutus L., Schneider D., Postigo J., Romero M., Santallab 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.
- Burgos J., Altchet J., Bisio M., Duffy T., Valadares H., Seidenstein M. et al. (2007). Direct molecular profiling of minicircle signatures and lineages of *Trypanosoma cruzi* bloodstream populations causing congenital Chagas disease. *Inter. J. Parasitol.* **37**: 1319-1327.
- Cardoso A., Lescano S., Gakiya E., Santos S. & Amato Neto V. (2005). Avaliação da sobrevivência do *Trypanosoma cruzi* na cana de açúcar utilizada no preparo do caldo. *Parasitol. Latinoam.* **60**: 211-215.
- Carlier Y. & Truyens C. (1999). Influence of maternal infection on offspring resistance towards parasites. *Parasitol. Today.* **11**: 94-99.
- Carlier Y. & Torrico F. (2003). Congenital infection with *Trypanosoma cruzi* from mechanism of transmission to strategies for diagnosis and control. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **36**: 767-771.
- Chagas C. (1909). Nova trypanosomiasis humana. Estudo sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi*. *N.Gen. Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **1**: 139-218.
- CLAP-OPS/OMS (2007). *Informe de la Consulta Técnica sobre Información, Educación y Comunicación (IEC) en Enfermedad de Chagas Congénita*. Montevideo, Uruguay.
- Dias J. & Brener S. (1984). Chagas' disease and blood transfusion. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **79**: 138-147.
- Feliciangeli M. D., Sánchez-Martín M. J., Suárez B., Marrero R., Torrellas A., Bravo A. et al. (2007). Risk factors for *Trypanosoma cruzi* human infection in Barinas state, Venezuela. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **76**: 915-921.
- Freilij H. & Altcheh J. (1994). Chagas congénito pp. 267-278. En: *Enfermedad de Chagas*. Eds. Storino R. & Milei J. Ed. Mosby Doyma, Buenos Aires.
- Fretes R. & Fabro S. (1995). In vivo and in vitro analysis of lysosomes and acid phosphatase activity in human chagasic placenta. *Exp. Mol. Pathol.* **63**: 153-160.

- García A., Bahamonde I., Verdugo S., Correa J., Pastene O., Solara A., *et al.* (2001) Infección transplacentaria por *Trypanosoma cruzi*: Situación en Chile, *Revista médica de Chile*, **129**: 329-331.
- Guarner J., Bartlett J., Zaki S., Colley D., Grijalva M. & Powel M. (2001) Mouse model for chagas disease: immunohistochemical distribution of different stages of *Trypanosoma cruzi* in tissues throughout infection. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **65**: 152-158.
- Id Boufker H., Alexandre H., Carlier Y. & Truyens C. (2006). Infertility in murine acute *Trypanosoma cruzi* infection is associated with inhibition of pre-implantation embryo development. *Am. J. Pathol.* **169**: 1730-1738.
- Kollien A. H. & Schaub G. A. (2000). The development of *Trypanosoma cruzi* in triatominae. *Parasit. Today.* **16**: 381-387.
- Mjihdi A., Lambot M. A., Stewart I. J., Detournay O., Noel J., Carlier Y. & Truyens C. (2002). Acute *Trypanosoma cruzi* infection in mouse induces infertility or placental parasites invasion and ischemic necrosis associated with massive fetal loss. *Am. J. Pathol.* **161**: 673-680.
- Moreno E., Méndez M., Alarcón M., Araujo S., & Lugo-Yarbu A. (2006). Reactivación de la infección chagásica en ratas Wistar gestantes. *Kasmera.* **33**: 51-63.
- Moreno E., Araujo M., Alarcón M., Lugo de Yarbu A., Araujo S. & Borges R. (2006). Efecto de la infección chagásica aguda en ratas wistar gestantes. *Rev. Cient. FCV. Universidad del Zulia (LUZ).* **5**: 506-516.
- Nilo M., Alvarado J., Ramírez M. & Espejo E. (2005). Hallazgo de tripomastigotes en estudio citoquímico de líquido amniótico. *Parasitol. Today.* **24**: 49-51.
- Pehrson P., Walhgren M. & Bengtsson N. (1982). Intracranial calcification probably due to congenital Chagas' disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **3**: 449-452.
- Pereira da Silva L. H. & Nussenzweig V. (1953). Sobre una cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. *Fol. Clin. Biol.* **20**: 191-207.
- Pehrson P., Walhgren M. & Bengtsson N. (1982) Intracranial calcification probably due to congenital Chagas' disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **3**: 449.
- Sala M., Lopes R., Carraro A. & Meneguette C. (2006) Efecto de La infección aguda por diferentes cepas de *Trypanosoma cruzi* sobre el crecimiento intrauterino de fetos de ratón. *Parasitol Latinoam.* **61**: 69-73.
- Saleme A., Yanicelli G. & Iñigo L. (1971). Enfermedad de Chagas-Mazza en Tucumán. *Arch. Arg. Ped.* **69**: 162.
- Solana M. E., Celentano A. M., Tekiel V., Jones M. & Gonzalez Cappa S. M. (2000). *Trypanosoma cruzi*: Effect of parasite subpopulation on murine pregnancy outcome. *J. Parasitol.* **88**: 102-106.
- Torrice F., Alonso Vega C., Suarez E., Rodriguez P., Torrico M. C., Dramaix M., Truyens C. & Carlier Y. (2004). Maternal *Trypanosoma cruzi* infection, pregnancy outcome, morbidity and mortality of congenitally infected and non-infected newborns in Bolivia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **70**: 201-209.
- Truyens C., Herman E., Alonso Vega C., Rodríguez P., Vekemans J., Torrico F. & Carlier Y. (2005). Respuesta inmune en neonatos no infectados nacidos de madres infectadas con *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **38**: 96-100.
- Villarroel J. & Reyes A. (2004). *Síndrome de TORCH. Enfermedades Infecciosas en Pediatría*. Ed. Banfi A., Ledermann W., Cofré J., Cohen J. & Santolaya M. E. 3ª edición. 312-324.
- Waynforth H. & Flecknell P. (1992). Experimental and surgical technique in the rat. *Academic Press Limited. London.* **6**: 119-124.
- Zaidenberg M. (1998). *Enfermedad de Chagas congénita. Temas de zoonosis y enfermedades emergentes*. En: Resúmenes del 2º Congreso Argentino de Zoonosis, Asociación Argentina de Zoonosis, Buenos Aires. p. 114-148.

Recibido el 09/07/2007
Aceptado el 19/09/2008