

Presencia de *Trypanosoma cruzi* en tejidos de ratas Wistar infectadas experimentalmente y sus fetos

Maritza Alarcón^{1*}, Ana Lugo de Yarbuh¹, Elio A. Moreno¹, Gilberto Payares²,
Sonia Araujo¹ & Melisa Colmenares¹

Este estudio fue realizado con un grupo de ratas juveniles hembras (*Rattus norvegicus*) cepa Wistar con 20 días de nacidas y 250 grs. de peso. Cada rata fue inoculada inyectándole por vía intraperitoneal 0.1 mL de la suspensión sanguínea con 1×10^5 tripomastigotes sanguíneos de *Trypanosoma cruzi* (cepa I/PAS/VE/00/PLANALTO). Los parásitos fueron aislados de *Panstrongylus geniculatus*, naturalmente infectado y capturado en un área urbana del valle de Caracas, Venezuela y mantenidos en ratones NMRI. A los 10 días post-infección a estas ratas (GI) les fue determinado el ciclo estral y luego fueron apareadas con los machos en una relación 2 hembras/1 macho en cada jaula. Grupos de ratas vírgenes inoculadas con *T. cruzi* (GII), ratas sanas (GIII) y ratas preñadas (GIV) fueron usadas como controles. La infección por *T. cruzi* en las ratas de GI reveló los más altos niveles de parasitemias patentes con $12,2 \pm 1,1$ *T. cruzi*/mm³ de sangre a los 18, 24 y 34 días post-infección con 6, 12 y 20 días de gestación respectivamente, al compararla con el GII. Los títulos de anticuerpos específicos anti-*T. cruzi* fueron mayores en el grupo de ratas gestantes e infectadas con *T. cruzi*, en comparación con las vírgenes infectadas, representados por 1:512 y 1:2048 a los 19 y 20 días post-infección respectivamente. El 33 % de las muestras de líquido amniótico de las ratas del GI, desarrollaron formas flageladas de *T. cruzi* en el medio de cultivo NNN. El estudio histopatológico de los cortes de 6µ de espesor coloreados con hematoxilina y eosina del corazón fetal (CF) obtenidos de 2 fetos de ratas del GI con 34 días de infección, reveló nidos de amastigotes en el tejido cardíaco. En las placentas de las ratas del GI se observó una placentitis caracterizada por intenso infiltrado inflamatorio de células mononucleares y polimorfonucleares con predominio de neutrófilos. Los ensayos inmunocitoquímicos con el doble marcaje Isotiocianato de fluoresceína-ioduro de propidio y peroxidasa-anti-peroxidasa en los cortes de placenta, corazón fetal y cordón umbilical de las ratas del GI, mostraron parásitos y abundante antígeno de *T. cruzi*. Estos resultados demostraron la infección intrauterina fetal por *T. cruzi* confirmando la transmisión transplacentaria del parásito desde la madre infectada a su progenie. Posiblemente el mecanismo de transmisión congénita esté relacionado con la liberación de los tripomastigotes a través del trofoblasto, a la aspiración del líquido amniótico por los fetos o a la penetración activa de los parásitos a través de la piel y/o mucosas durante el período fetal.

Palabras claves: *Trypanosoma cruzi*, rata Wistar, tejidos fetales, transmisión transplacental.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas es causada por el protozoario flagelado *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909), tanto en Centro como en Sur América, donde es uno de los grandes problemas de salud pública. El parásito es comúnmente transmitido a los humanos y

a otros mamíferos cuando las heces y orina de insectos hematófagos (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) contentivas de formas flageladas de *T. cruzi*, son pasivamente depositadas sobre la piel durante la ingesta sanguínea (Schuster & Schaub, 2000). En humanos *T. cruzi* penetra a través de membranas mucosas intactas y muy probablemente por la piel sana (Lugo, 1973), o por otros mecanismos alternos como, transfusiones sanguíneas, como la reportada en Bancos de Sangre en Venezuela (Aché, 1993a) y en México (Guzmán *et al.*, 1998), transplantes de órganos (Schijman *et al.*, 2000), contaminación oral (Nilo *et al.*, 2000; Camandaroba *et al.*, 2002), por la leche materna (Bittencourt, 2000; Azogue &

¹ Laboratorio de Parasitología Experimental, Depto. de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de los Andes. Mérida, 5101, Venezuela.

² Instituto de Biología Experimental (IBE) Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela (UCV), Caracas - Venezuela.

*Autor de correspondencia: amaritza@ula.ve

Darras, 1995) o a través de la vía transplacentaria. Esta modalidad de transmisión prevalece en mujeres preñadas en Sur América en un rango desde 2 a 51% en áreas urbanas, favorecida por la migración interna de personas infectadas desde zonas endémicas y desde 23 a 81% en las mujeres residentes en áreas endémicas (Bittencourt, 1992). Si bien la transmisión congénita de *T. cruzi* de la madre al feto fue observada por Chagas (1911) en Brasil, cuando encontró la infección en un niño de 17 días de nacido y no pudiendo explicar la puerta de entrada del parásito sugirió que era una infección transplacentaria, la enfermedad de Chagas congénita en humanos fue reportada por primera vez en Venezuela por Dao (1949), cuando *T. cruzi* fue observado en la sangre periférica de un recién nacido de madre chagásica. Algunas investigaciones han reportado que existe una estrecha relación entre el tiempo de infección por *T. cruzi* de la madre gestante y la transmisión de los parásitos a los fetos, por lo que han sugerido que la infección fetal ocurre en los primeros tres meses del embarazo, siendo necesario tomar en consideración los efectos secundarios producidos con la aplicación de las drogas utilizadas en el tratamiento de la enfermedad de Chagas durante la preñez (Moretti *et al.*, 2005). En este sentido, se ha destacado que la infección experimental crónica del ratón por *T. cruzi* no altera la fecundidad, comprobándose que en estos animales la aminofilina es capaz de favorecer la infección del feto por *T. cruzi*, probablemente porque el pasaje del parásito es favorecido por una vacuolización del sincicio placentario producida por la droga (Werner & Kunert, 1958). En las crías infectadas por *T. cruzi* el espectro patológico ha resultado ser muy parecido al que predomina en el humano, sin embargo, no es posible interpolar estos hallazgos realizados en roedores, ya que ambos tipos de placentas son totalmente diferentes (Dávila *et al.*, 1994).

La infección transplacental puede ocurrir en cualquiera de las fases de la infección maternal y con mayor probabilidad durante la fase aguda, debido a la frecuente circulación de los tripomastigotes en la sangre de las madres gestantes. Estos parásitos penetran las vellosidades placentarias transformándose en amastigotes y en un momento dado se multiplican transformarse en tripomastigotes, los cuales son liberados atravesando la barrera placentaria alcanzando la circulación fetal y/o el líquido amniótico, el cual puede ser aspirado

en pequeñas porciones junto con los parásitos por los fetos, en los cuales la interiorización de los parásitos producirían la infección los tejidos muscular cardíaco y/o muscular esquelético fetal entre otros (Delgado & Santos-Buch, 1978; Alarcón *et al.*, 2003). Otros estudios han reforzado el conocimiento sobre la interacción materno-fetal, entre ellos la infertilidad, el retardo en el crecimiento y la pérdida fetal temprana asociados o no con la infección congénita, como ocurre con la infección placentar sin transmisión congénita en ratones, a pesar de los altos niveles de parasitemia circulantes en la madre gestante (Abderkarim *et al.*, 2002). En este sentido, en los casos con enfermedad de Chagas congénita los efectos del embarazo sobre la parasitemia en los fetos no han sido aún esclarecidos y hasta el momento se desconocen las causas por las cuales una madre chagásica origina o no un hijo infectado, aún cuando ocurra la reactivación de la infección (Szarfman *et al.*, 1975; Moreno *et al.*, 2005), ya que en esos casos la incidencia de la infección fetal tendería a ser muy grande (Stiehm *et al.*, 1966). Varios factores han sido asociados con la infección fetal, por lo que algunas investigaciones la han relacionado con las características genéticas, los insectos transmisores, la virulencia de las cepas de parásitos, así como también con el área poblacional estudiada, siendo más frecuente la transmisión transplacentar de *T. cruzi* en las regiones geográficas de alta endemicidad, donde una gran proporción de madres y sus recién nacidos han mostrado ser seropositivos a anticuerpos anti-*T. cruzi*. Estos factores aún no han sido claramente definidos y la infección pareciera estar más influenciada por el origen geográfico de las cepas de *T. cruzi*, las cuales juegan un papel muy importante en la frecuencia de la transmisión congénita (Andrade *et al.*, 1994). Otras observaciones han reportado diferente comportamiento en el tropismo placentario durante la transmisión vertical de *T. cruzi* a un reducido número de crías de ratas Wistar infectadas experimentalmente con cepas de *T. cruzi* procedentes de regiones endémicas para la enfermedad de Chagas en Venezuela (Moreno *et al.*, 2003a). Basados en las consideraciones anteriormente planteadas, nos propusimos seguir un protocolo de trabajo, que nos permitiera hacer un diagnóstico parasitológico en los tejidos fetales en el modelo experimental rata Wistar gestante. En estos animales el curso de la infección chagásica aguda fue seguido mediante la determinación de anticuerpos anti-IgG en las ratas gestantes así como con estudios parasitológicos e histopatológicos. El estudio parasitológico fue

realizado a nivel de la placenta, cordón umbilical, líquido amniótico y tejido muscular cardíaco de los fetos con 20 días de desarrollo en ratas Wistar con 20 días de gestación y 34 días de infección por *T. cruzi*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepa de Trypanosoma cruzi

Se utilizaron tripomastigotes sanguíneos de la cepa I/PAS/VE/00/PLANALTO de *T. cruzi*, aislada de *Panstrongylus geniculatus* naturalmente infectado, capturado por el Dr. G. Payares en el interior de una vivienda de un área urbanizada en las Colinas de Bello Monte, Caracas-Venezuela. Esta cepa de parásitos fue caracterizada por nosotros a través de la Reacción en Cadena de Polimerasa y mantenida en nuestro Laboratorio de Parasitología Experimental (LAPEX), del Departamento de Biología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de los Andes, por pasajes seriados en triatominos, cultivos in vitro y ratones NMRI.

Infección experimental y apareamiento

Un inóculo de tripomastigotes sanguíneos fue obtenido a partir de ratones machos NMRI que cursaban altas parasitemias patentes. Estos animales fueron sangrados por cardiopuntura y la sangre fue mezclada con solución salina estéril al 0,85%. Los tripanosomas fueron contados siguiendo el método modificado por Brener (1962) a fin de obtener un inóculo aproximado de 1×10^5 tripanosomas/0,1 mL de la suspensión sanguínea. Para el estudio se utilizaron 24 ratas albinas juveniles hembras (*Rattus norvegicus*) cepa Wistar de 45 días de nacidas y un promedio de 250 grs de peso. Las ratas fueron separadas en 4 grupos de 6 ratas cada uno: GI formado por ratas infectadas con *T. cruzi* y preñadas a los 10 días post-infección (pi), GII formado por ratas vírgenes infectadas con *T. cruzi* (control infectado), GIII formado por ratas vírgenes (control sano) y GIV formado por ratas sanas preñadas (control gestante). Las ratas de GI y GII fueron inoculadas por vía intraperitoneal (ip) con 1×10^5 tripanosomas/0,1 mL de la suspensión sanguínea y las ratas de GIII y GIV fueron inyectadas con 0,1 mL de solución salina por la misma vía. Antes del apareamiento a las ratas de GI y GIV les fue determinado el ciclo estral entre los 10 y 12 días (pi). Para tal fin se introdujo 0,5 mL de solución salina con una micropipeta Pasteur en la

abertura vaginal, después de mezclar la solución con el contenido vaginal de cada rata, se tomó una pequeña muestra la cual fue colocada sobre un portaobjeto para la observación al microscopio con 10X. La presencia de células nucleadas y células epiteliales cornificadas junto al moco vaginal, comprobaron que las ratas estaban en proestrus o estrus del ciclo (Waynforth & Flecknell, 1992). Las ratas fueron colocadas en jaulas en una relación 2 hembras/1 macho durante dos días para el apareamiento y fueron consideradas preñadas por el encuentro de espermatozoides en los frotis del contenido vaginal coloreado con azul de metileno. A este tiempo las hembras fueron separadas de los machos y mantenidas en jaulas individuales en el Bioterio experimental de la Facultad de Ciencias-ULA, bajo condiciones ambientales controladas y alimentadas con dieta comercial y agua *ad libitum*.

Evaluación de la infección

Para el diagnóstico parasitológico las muestras de sangre fueron extraídas de las ratas infectadas gestantes y de las vírgenes infectadas con *T. cruzi*, entre 12 y 34 días (pi). Estando los animales ligeramente anestesiados con éter dietílico fueron sangrados por ruptura del plexo retro orbital con capilares heparinizados, la sangre fue recogida en tubos de microcentrifuga de 1,5 mL y el número de tripomastigotes sanguíneos fue estimado en 5 μ L de sangre colocado sobre láminas portaobjeto y contados en 100 campos microscópicos.

Determinación de la presencia de anticuerpos IgG anti-T. cruzi

Los niveles de anticuerpos específicos IgG anti-*T. cruzi* fueron determinados mediante la reacción de inmunofluorescencia indirecta (IFI) (Camargo 1966). Para esta prueba las muestras de sangre obtenidas anteriormente de las ratas infectadas de los GI y GII fueron mantenidas a 4°C por 1 hora. Una vez retraído el coágulo los sueros fueron separados por centrifugación de la sangre a 3000 rpm durante 15 min y almacenados a -20 °C hasta su uso. Los sueros de las ratas fueron diluidos desde 1:32 hasta 1:4096, depositados sobre láminas portaobjetos que contenían como antígeno tripomastigotes de cultivo de la cepa PLANALTO durante 1 hora a temperatura ambiente, fijados con acetona, lavados tres veces con Buffer Fosfato Salino (PBS) a pH 7,2 durante 5 min cada vez e incubadas con el anticuerpo anti-IgG de rata

marcado con isotiocianato de fluoresceína (Sigma, St. Louis, USA) diluido 1:500 en PBS a pH 7,2 durante 1 h, lavados nuevamente con PBS a pH 7,2 y cubiertas con glicerina tamponada 9:1 para la observación al microscopio de fluorescencia.

Determinación de tripomastigotes en el líquido amniótico

Las ratas del GI con 20 días de gestación y 34 días (pi) fueron sobreanestesiadas con éter dietílico e inmediatamente se les extrajo el útero grávido, separándolo por debajo del antro a nivel del fondo de la vagina. A través de una pequeña incisión a nivel de las membranas que recubren cada saco uterino (SU) se tomaron muestras de líquido amniótico (LA). Pequeñas porciones de LA fueron colocadas sobre láminas portaobjeto para la observación al fresco, y otras muestras una vez secas fueron fijadas con metanol y coloreadas con Giemsa al 10% en buffer Sørensen a pH 7,2 para continuar con la búsqueda de tripomastigotes en el LA bajo el microscopio, el resto de las muestras de LA fue sembrado en el medio de cultivo NNN.

Estudio histopatológico

A través de una incisión longitudinal de la membrana uterina, se extrajeron los fetos con sus placentas los cuales fueron colocados en placas de Petri para lavarlos con solución fisiológica. Los fetos, cordones umbilicales(CU), placentas (P) y fragmentos de útero grávido (U) fueron fijados en formalina al 10 % durante 48 horas, al cabo de este tiempo a los fetos se les extrajo el corazón (CF). Los tejidos fueron incluidos en Paraplast (Monoject Scientific, St. Louis, MO. USA) y los cortes histológicos de 6 µm de espesor de cada tejido fueron coloreados con hematoxilina y eosina (HE) (Sigma, St. Louis. USA).

Estudio inmunocitoquímico

Para la detección de parásitos y antígeno de *T. cruzi* se utilizó el doble marcaje con inmunofluorescencia indirecta-ioduro de Propidio (IFI-IP) y peroxidasa-anti-peroxidasa (PAP) (Sell & Burton, 1981), a fin de verificar infección y antígeno de *T. cruzi* en los tejidos. Para tal fin los cortes histológicos de las muestras P, CU, U de las ratas infectadas gestantes y CF de los fetos de las mismas

ratas, fueron desparafinados, hidratados e incubados con antisuero de conejo anti-*T. cruzi* diluido 1:30, anticuerpo IgG de rata conjugado con isotiocianato de fluoresceína (Sigma, St. Louis. USA) diluido 1:500 y ioduro de propidio (Molecular probe, Inc. USA) diluido 1:1000 con PBS a pH 7,2, lavados con PBS a pH 7,2 y cubiertos con glicerina tamponada 9:1 y laminilla para su observación. Otro grupo de láminas conteniendo los cortes histológicos de P, CU, U, CF fueron desparafinados, hidratados e incubados con H₂O₂ al 3% en metanol para inactivar la peroxidasa endógena, antisuero de conejo anti-*T. cruzi* diluido 1:30 y anticuerpo IgG de rata conjugado con peroxidasa (Sigma, St. Louis. USA) diluido 1:500 con PBS a pH 7,2. Los cortes fueron lavados con PBS a pH 7,2 después de cada una de las incubaciones y la reacción fue revelada con 3,3 tetracloruro de diaminobencidina, contracolorada con hematoxilina de Mayer, deshidratados y cubiertos con MAR-TEX y cubreobjeto. Las muestras de tejidos fueron observadas en un microscopio confocal laser Olympus Fluoview II (CCD System, Olympus Optical CO., Japan). Los cortes de U de ratas vírgenes infectadas con *T. cruzi* (GII) y U de ratas sanas (GIII) y P, CU, U y CF de los fetos separados de ratas sanas gestantes (GIV), fueron procesados y revisados como controles de infección y gestación respectivamente.

Análisis estadístico

Los resultados de las parasitemias patentes fueron procesados mediante un análisis de varianza para efectos fijos y un contraste de inferencia simultánea (Kleinbaum *et al.*, 1998).

RESULTADOS

Evaluación de la parasitemia patente

El estudio parasitológico efectuado a los 12, 19, 26 y 34 días de infección y 6, 12 y 20 días de gestación, reveló en la ratas infectadas gestantes niveles de parasitemias significativamente mayor alcanzando su máximo valor promedio de 12,2 ±1,1 tripomastigotos/mm³ de sangre a los 34 días (pi) y 20 días de gestación, en relación con la observada en las ratas vírgenes infectadas (Fig. 1). La comparación de la evolución de la parasitemia entre las ratas infectadas gestantes y vírgenes infectadas con *T. cruzi*, revelaron diferencias altamente significativas al 1 % entre la primera y segunda semana de gestación.

Evaluación de la respuesta humoral

En las ratas de los GI y GII la evolución de la respuesta humoral reveló un aumento en los títulos de anticuerpos IgG, anti-*T. cruzi*. A medida que progresaba la infección chagásica los niveles más altos de anticuerpos IgG oscilaron entre 1:512 y 1:2048 en las ratas infectadas gestantes los que tendieron a mantenerse elevados entre los 19 y 34 días (pi) y 6 a 20 días de gestación, mientras que en las ratas vírgenes infectadas con *T. cruzi* los títulos de TAc-IgG disminuyeron a 1:125 (Fig. 2). La comparación de los TAc entre los dos grupos de ratas infectadas con *T. cruzi* reveló diferencias significativas al 5 %.

Evaluación del líquido amniótico

El líquido amniótico separado de los sacos uterinos de 2 de las 6 ratas infectadas gestantes (33,33 %) con 34 días pi y 20 días de gestación, desarrolló formas flageladas de *T. cruzi* entre los 30 y 40 días de incubación en el medio de cultivo NNN.

Estudios histopatológicos

La histología de las placentas de las ratas infectadas gestantes mostró vellositis de variable intensidad representada por lesiones inflamatorias agudas, moderada placentitis caracterizada por la presencia de infiltrado celular con abundantes neutrófilos muy cerca de los vasos sanguíneos (Fig.

3A) y numerosas células gigantes dispersas en el estroma veloso, placas coriónica y tejidos desiduales. El 25 % de las placentas (13/52) mostró nido de amastigotes en las células trofoblásticas y macrófagos rodeados de inflamación mononuclear (Fig. 3B). La respuesta inflamatoria uterina estuvo representada por un infiltrado linfomonohistiocitario junto a nido de amastigotes a nivel de las fibras musculares lisas del útero en el 25 % de las ratas infectadas gestantes (Fig. 3C). El útero de las ratas vírgenes infectadas con *T. cruzi*, mostró escaso infiltrado celular disperso en el tejido uterino y sin infección tisular. El análisis histológico con H-E y la imagen confocal de los corte de corazón de los fetos separados de las ratas infectadas gestantes, mostraron células inflamatorias mononucleares y polimorfonucleares, signos de activación endotelial, miositis hipertrófica y nido de amastigotes en el tejido cardíaco fetal (Fig. 4 A,B). La inmunotinción mediante IFI-IP de los cortes histológicos de la P (Fig 5A) y del CU (Fig. 5B) mostraron abundante depósito antigénico de *T. cruzi* disperso en el tejido placentario y localizado cerca de los vasos sanguíneos del cordón umbilical.

DISCUSIÓN

Se ha referido que la transferencia de antígenos de la madre al feto aumenta la capacidad de la progenie para responder a la infección a través de la modulación del sistema inmune fetal (Carlier & Truysens, 1999; Shearer & Clerici, 1996), por lo

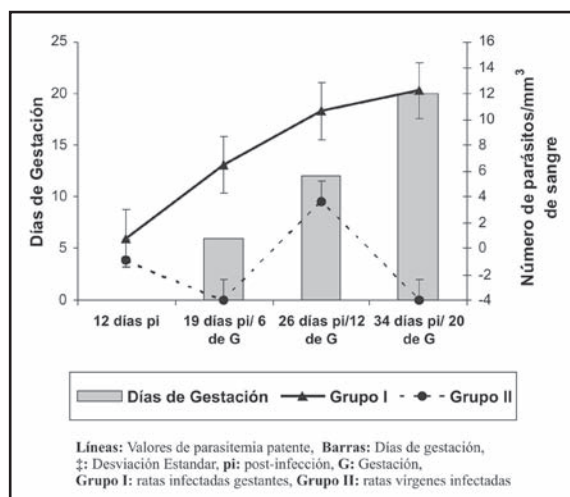


Fig. 1. Niveles de parasitemias patentes detectados en las ratas Wistar gestantes y ratas vírgenes infectadas con *Trypanosoma cruzi* cepa PLANALTO.

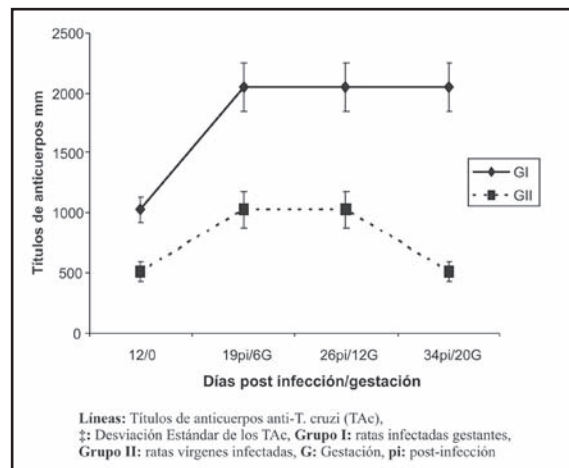


Fig. 2. Evolución de los títulos de anticuerpos IgG anti-*T. cruzi* en las ratas Wistar infectadas gestantes y ratas vírgenes con infección aguda. Reacción Inmunofluorescencia Indirecta.

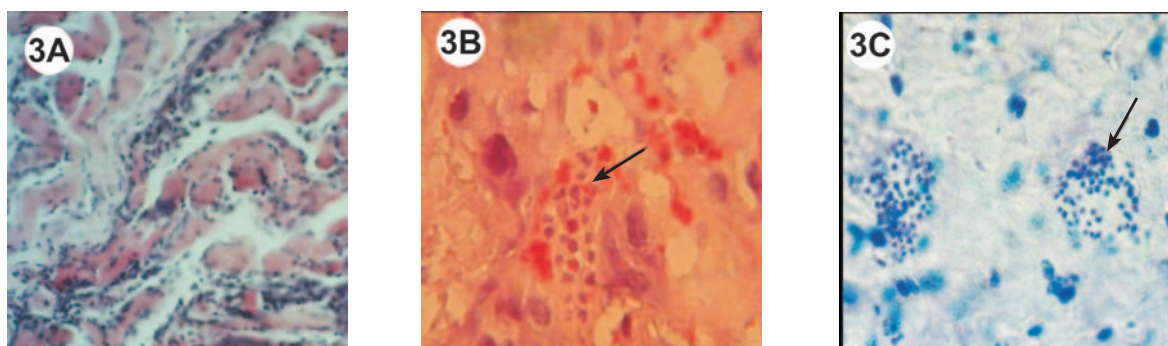


Fig. 3. Secciones histológicas de la placenta de rata Wistar con 34 días de infección con *Trypanosoma cruzi* y 20 días de gestación que muestran: A) áreas de inflamación mononuclear; B) grupo de neutrófilos cerca de vasos sanguíneos (—>); C) nidos de amastigotes (—>) y células inflamatorias en el tejido placentario. (H-E. 1000x).

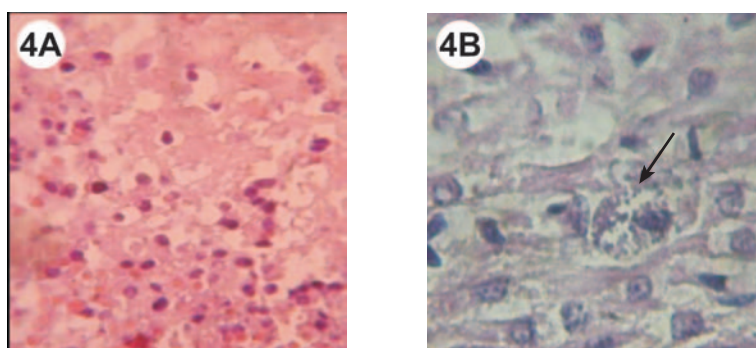


Fig. 4. Secciones histológicas de corazón de feto de rata Wistar con 34 días de infección con *Trypanosoma cruzi* y con 20 días de gestación. A) infiltrado inflamatorio de células mononucleares; B) nido de amastigotes (—>) en el tejido cardíaco fetal (H-E. 450x, 1000x).

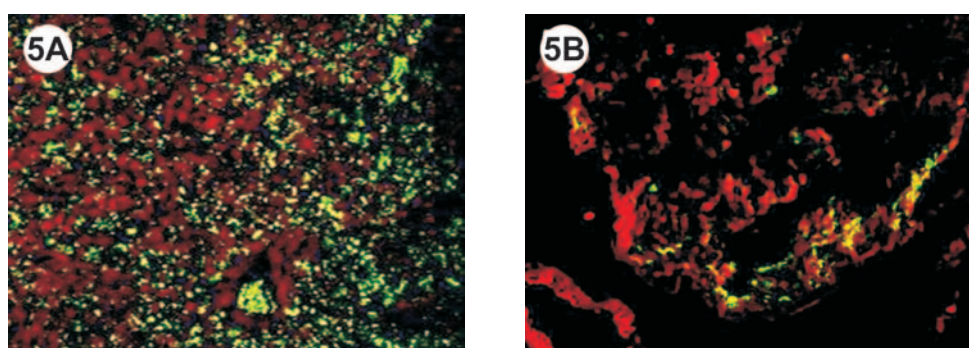


Fig 5. Imágenes confocales de corte histológico de placenta y de cordón umbilical de rata Wistar con 34 días de infección con *Trypanosoma cruzi* y con 20 días de gestación que muestran: A) abundante depósito antigénico fluorescentes de *T. cruzi* disperso en el tejido placentario (verde); B) Antígeno de *T. cruzi* muy cerca de vasos sanguíneos del cordón umbilical (núcleos celulares de color rojo) (IFI-IP.1250x).

que tanto los fetos como los recién nacidos pueden tener tanto parasitemias positivas como negativas aún cuando sus madres resulten con xenodiagnósticos positivos, lo que sugiere que la infección congénita no es transmitida a toda la progenie (Barousse *et al.*, 1978). En este estudio el hecho de que solo algunas de las placentas de las ratas Wistar se hayan infectado con *T. cruzi*, pudiera estar relacionado con la competencia inmunológica de la placenta al proteger al feto de la infección y en consecuencia modular la severidad de la infección congénita (Bitterncourt, 1992). En otros animales experimentales como el modelo ratón se ha observado que la infección por *T. cruzi* no altera la fecundidad, se produce una disminución significativa en el número de crías y en la sobrevivencia de las mismas al mes de nacidas, con presencia de anticuerpos aglutinantes anti-*T. cruzi* en los músculos esqueléticos, cardíacos y vasos sanguíneos (Meckert *et al.*, 1980; Gitlin & Koch, 1988). Estos anticuerpos pudieran estar acumulándose en el tejido muscular cardíaco de los fetos de las ratas Wistar infectadas con *T. cruzi*, debido posiblemente a la acción de los anticuerpos maternos anti-*T. cruzi* transferidos pasivamente por vía transplacental, así como a la activación de los monocitos los cuales participan en el control de la infección y en el mantenimiento de la preñez en humanos (Sack *et al.*, 1999), de esta forma los tejidos fetales estarían protegidos contra una eventual transmisión vertical de los parásitos, debido al sinergismo entre los anticuerpos y monocitos activados (Umekita & Mota, 2000).

Otros estudios en humanos y modelos experimentales relacionados con la infección chagásica congénita, han planteado que los linfocitos obtenidos de la sangre del cordón umbilical proveniente de madres chagásicas, pudieran relacionarse con antígenos de *T. cruzi* o expresar idiotipos sobre anticuerpos específicos (Elói-Santos *et al.*, 1989). Estas interacciones podrían ser capaces de alterar el curso de la infección con el progreso de la gestación (Carlier *et al.*, 1992; Márquez de Araujo *et al.*, 1996), de tal forma que si la respuesta inmune de la madre influye en el sistema inmune del feto, es razonable pensar que el perfil fenotípico linfocítico de los recién nacidos chagásicos pudiera también estar relacionados con esas interacciones (Neves *et al.*, 1999; Altemani *et al.*, 2000).

La transmisión congénita así como los cambios en la fertilidad, sobrevivencia de los

recién nacidos y el número total de la reabsorciones en ratones han sido relacionados con el proceso inflamatorio uterino (Gonzalez-Cappa *et al.*, 1999). A este respecto la interacción infección chagásica aguda/embarazo en la ratas Wistar produjo la transmisión congénita a un reducido número de fetos, en los cuales las células inflamatorias y nido de parásitos fueron observados en el tejido cardíaco fetal, cuando las fibras musculares lisas del útero grávido, estroma veloso y área vascular de algunas placentas de las ratas Wistar gestantes, estuvieron cargados de células polimorfomononucleares, a diferencia de lo observado por Carraro-Abrahão *et al.*, (2000) en ratones NMRI y suizos infectados con las cepas RAL y Y de *T. cruzi* respectivamente, cuyas placentas mostraron nidos de amastigotes en las células gigantes con inflamación linfoplasmohistiocitaria. En este sentido, algunos autores han sugerido que es posible que la presencia de infiltrado de células mononucleares y polimorfonucleares en las placentas infectadas con *T. cruzi*, pudiera estar relacionados con la activación del complemento por los parásitos durante el período maternofetal lo que produciría la muerte de los fetos, como ocurre en ratones con infección chagásica aguda (Tomlinson *et al.*, 1994; Xu *et al.*, 2000), este último evento pudiera también ocurrir en el modelo experimental rata Wistar, sin embargo, no podemos afirmarlo por cuanto en este estudio la gestación en las ratas fue interrumpida a los 20 días de evolución.

Andrade (1982) refirió la presencia de parasitismo en el área vascular de las placentas de ratones infectados con diferentes cepas de *T. cruzi* y su transmisión congénita, posteriormente el autor confirma la marcada diferencia que existe en el tropismo placentar (Andrade, 1992), por lo que se considera que el parasitismo placentario no guarda una estricta correlación con la infección fetal, dado que se han observado casos de enfermedad de Chagas congénita sin nidación placentaria (Bitterncourt, 2000). Los resultados experimentales obtenidos en el presente estudio sugieren que durante la infección aguda el origen de las cepas de parásitos puede ser un factor determinante en la infección de la placenta y por tanto en la infección congénita de *T. cruzi*, por lo que el hallazgo de tripomastigotes en el 33 % de las muestras de líquido amniótico y la presencia de nidos de amastigotes en el corazón fetal, son resultados indicativos de que los parásitos lograron atravesar las barreras mecánicas e inmunológicas hasta llegar a la circulación fetal causando la infección congénita a un reducido número de fetos, a, lo que indica la

eficacia de las capas trofoblásticas placentales para bloquear el pasaje de parásitos de la madre a los fetos a pesar de la presencia de numerosos parásitos en la sangre materna. En este sentido, los mecanismos por los cuales las capas trofoblásticas previenen la infección del feto aún es desconocida, sin embargo se ha sugerido que las enzimas lisosomales estarían limitando la propagación de *T. cruzi* hacia los fetos (Frank *et al.*, 2000).

Las alteraciones histológicas sufridas por la placenta debida a la infección por *T. cruzi* junto con la respuesta inmune generada por la presencia de los parásitos, pudieran limitar el intercambio materno-fetal, el cual también ha sido asociado con la presencia de infiltrado inflamatorio con predominio de neutrófilos, con la formación de trombos, necrosis isquémica y degeneración fibrinoide en ratones, hechos que reducen el flujo de sangre en la placenta produciéndose una insuficiencia placentaria severa la cual afecta la transferencia de nutrientes para el feto y por tanto la reducción del crecimiento fetal y la formación de lesiones placentarias (Scrimshaw y Schürch, 1998; Mjihdi *et al.*, 2002; Sala *et al.*, 2006).

En este estudio, la presencia de formas flageladas en los cultivos del líquido amniótico de algunas ratas Wistar infectadas gestantes, demuestra que los parásitos pueden alcanzar los fetos por vía hematogena (Nilo *et al.*, 2000), este pasaje de *T. cruzi* probablemente se deba a la placentitis provocada por la multiplicación o por la penetración activa de los parásitos hacia la circulación fetal a través de la placenta (Moreno *et al.*, 1998), tal como fue demostrado por la presencia de tripomastigotes en el líquido amniótico separado de tres sacos uterinos de un ratón de la cepa NMRI preñada e infectada con tripomastigotes aislados de un marsupial procedentes de una región geográfica venezolana para la enfermedad de Chagas en el estado Barinas (Moreno *et al.*, 2003b), en contraste con otras cepas de *T. cruzi*, de origen humano y canino provenientes de la misma área endémica, con las cuales no se observaron tripomastigotes en el LA de un grupo de ratas Wistar infectadas con estos aislados (Moreno *et al.*, 2003a).

Con estos resultados hacemos énfasis en dos encuentros importantes como son la infección placentar e intrauterina fetal y por tanto la transmisión congénita en el modelo experimental rata Wistar

infectadas por *T. cruzi* aislado de *P. geniculatus*, vector intradomiciliario urbano encontrado naturalmente infectado en la habitación de una vivienda ubicada en el valle de Caracas, donde su alta infección (76.1%) a *T. cruzi* (genotipo Tc1) y el alto contacto hombre-vector (98% HB) han sido recientemente demostrados (Carrasco *et al.*, 2005). Finalmente concluimos, comentando la importancia epidemiológica relacionada con la transmisión congénita de *T. cruzi*, en áreas geográficas urbanas no endémicas para la enfermedad de Chagas como el valle de Caracas.

Esta forma de transmisión de gran importancia en áreas endémicas ubicadas en sectores poblacionales rurales y suburbanos, donde las condiciones socioeconómicas y la carencia de educación sanitaria en los pobladores son factores de riesgo para el manteniendo de la infección así como de la epidemia (Aché, 1993b), se ha visto favorecida por el incremento del turismo y la migración interna de personas infectadas hacia zonas no endémicas altamente urbanizadas, donde los parásitos se encuentran circulando entre la población humana, triatomíneos vectores y reservorios silvestres de *T. cruzi*, como lo muestran los trabajos de investigación referidos por Pifano (1986) y como lo señalan Herrera & Urdaneta-Morales, (1992) y Herrera *et al.*, (2003), quienes aislaron *T. cruzi* de *Didelphis marsupialis* y *P. geniculatus*, vector encontrado en la misma región urbana donde fuera capturado el triatómino infectado con *T. cruzi* cepa PLANALTO, cuyas formas sanguíneas utilizadas en la infección experimental de las ratas Wistar, mostraron preferencia por los tejidos placentario y cardíaco fetal. Estos encuentros muestran la necesidad de vigilar los posibles nuevos focos de la enfermedad de Chagas en zonas altamente urbanizadas de Venezuela, donde se encuentra una gran población la cual estaría sometida a una continua transmisión activa debida a la presencia de vectores intradomiciliarios infectados con *T. cruzi*.

Presence of *Trypanosoma cruzi* in tissues of experimentally infected Wistar rats and their fetuses

SUMMARY

This study was carried out with a group of 20 days old, 250-g female juvenile rats (*Rattus*

norvegicus) of the Wistar strain. Each rat was inoculated, injecting it intraperitoneally with a 0.1-mL suspension of Blood with 1×10^5 tripomastigotes from the I/PAS/00/PLANALTO strain. The parasites were isolated from naturally infected *Panstrongylus geniculatus* from a street in an urban area in Caracas, Venezuela, and maintained in NMRI rats. At 10 days post-infection (pi), the rats were determined to have completed the estrual cycle and were then mated with males, with a ratio of 2 females and 1 male in each cage. Groups of virgin rats inoculated with *T. cruzi* (GII), healthy rats (GIII) and pregnant rats (GIV) were used as controls. Infection by *T. cruzi* in the GI rats revealed the highest levels of clear parasitemia with 12.2 ± 1.1 tripomastigotes/mm³ of blood at 18, 24 and 34 days (pi) with 6, 12 and 20 days from gestation, respectively, compared with GII. The titles of specific antibodies anti-*T. cruzi* were greater in the group of pregnant and infected rats in comparison with the infected unmated rats, represented by 1:512 and 1:2048 at 19 and 20 days (pi) respectively. 33% of the samples of amniotic fluid of the rats of GI developed flagellate forms of *T. cruzi* in NNN culture. Histopathological study of 6µm sections stained with hematoxylin-eosin of fetal hearts obtained from 2 rat fetuses revealed nests of amastigotes in the cardiac tissue. In the placentas of GI with 34 days of infection, we observed a placentitis characterized by intense inflammatory infiltration of the mononuclear and polymorphonuclear cells with neutrophils predominant. The immunohistochemical assays using double marking with fluorescein isothiocyanate-propidium iodide and peroxidase-antiperoxidase in the sections of placenta, fetal hearts and umbilical cords showed parasites and abundant antigen of *T. cruzi*. These results demonstrate the fetal intrauterine infection by *T. cruzi*, confirming the transplacental transmission of the parasite from the infected mother to her offspring. Possibly the mechanism of congenital transmission is related to the release of the tripomastigotes across the trophoblast, to the taking up of the amniotic liquid by the fetuses or by the active penetration of the parasite across the skin and/or mucosa during the fetal period.

Key words: *Trypanosoma cruzi*, Wistar rats, tejidos fetales, transplacental transmission.

AGRADECIMIENTOS

Este estudio fue apoyado por el Fondo Nacional de Ciencia, Tecnología e innovación, FONACIT (Proyecto No. 2002000500).

REFERENCIAS

- Abderkarim M., Lambot M. A., Stewart I. J., Detournay O., Noel J. Ch., Carlier Y. & Truyens C. (2002). Acute *Trypanosoma cruzi* infection in mouse induced infertility or placental parasite invasion and ischemic necrosis associated with massive fetal loss. *Am. J. Patol.* **161**: 673-680.
- Aché A. (1993a). Prevalencia de infección humana por *Trypanosoma cruzi* en Bancos de Sangre de Venezuela. *Rev. Med. Trop. São Paulo.* **35**: 233-245.
- Aché A. (1993b). Programa de control de la Enfermedad de Chagas en Venezuela. *Bol. Dir. Malariol. San Amb.* **33**: 11-22.
- Alarcón M., Lugo de Yarbuh A., Moreno E., Araujo M. & Araujo S. (2003). *Enfermedad de Chagas congénita: Hallazgo de T. cruzi en el líquido amniótico de ratas Wistar gestantes con infección aguda*. LIII Convención Anual de AsoVAC: 231.
- Andrade S.G. (1982). The influence of the strain of *Trypanosoma cruzi* in placental infections in mice. *Trans. Roy. Trop. Med. Hyg.* **76**: 123-128.
- Andrade S. G. (1992). Epidemiologic research in congenital *T. cruzi* infection. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **89**: 32.
- Andrade A. L., Zicker F. & Martelli C. M. (1994). Método epidemiológico na investigação congênita pelo *Trypanosoma cruzi*. *Cad. Saúde Publ.* (Rio de Janeiro), **10 Supl. 2**: 345-351.
- Altemani A., Bittencourt A. & Lana A. (2000). Immunohistochemical characterization of the inflammatory infiltrate in placental Chagas' disease: a qualitative and quantitative analysis. *Am. J. Trp. Med. Hyg.* **62**: 319-324.
- Azogue E. & Darras C. (1995). Chagas congénito en Bolivia: estudio comparativo de la eficacia y el costo de los métodos de diagnóstico. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **28**: 39-43.
- Barousse A. P., Eposto M. O., Mandel S. & Sousa-Martinez F. (1978). Enfermedad de Chagas congénita en área no endémica. *Medicina* (B. Aires) **38**: 611.

- Bittencourt A. (1992). Possible risk factors for vertical transmission of Chagas' disease. *Rev. Inst. Trop. São Paulo*. **34**: 403-408.
- Bittencourt A. L. (2000). Transmissão vertical da doença de Chagas. En: Brener Z, Andrade ZA, Barral-Neto M. Eds. *Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas*, 2a Edc. Guanabara Koogan, Brasil, p: 16.
- Brener Z. (1962). Observações sobre a imunidade a superinfecções em camundongos experimentalmente inoculados con *Trypanosoma cruzi* e submetidos a tratament. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*. **4**: 119-123.
- Camandaroba E. L., Pinheiro C. M. & Andrade S. (2002). Oral transmission of Chagas' disease: importance of *Trypanosoma cruzi* biodeme in the intragastric experimental infection. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*. **44**: 97-103.
- Camargo M. (1966). Fluorescent antibody test for serodiagnosis. Technical modification employing preserved culture forms of *Trypanosoma cruzi* in slide test. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*. **8**: 227-234.
- Carlier Y., Rivera M. T., Truysens C., Ontivero M., Flament J., Van Marck E. & De Maertelaer V. (1992). Chagas' disease decreased resistane to *Trypanosoma cruzi* acquired infection in offspring of infected mice. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **46**: 116-122.
- Carlier Y. & Truysens C. (1999). Influence of maternal infection on off-spring resistance towards parasites. *Parasitol. Today*. **11**: 405-408.
- Carraro-Abrahão A. A., Lopes R. A., Salas M. A., Ribeiro R. D., Prado Jr. J. C., Alburquerque 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.
- Carrasco H. J., Torrellas A., Garcia C., Segovia M. & Feliciangeli M. D. (2005). Risk of *Trypanosoma cruzi* I (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) transmission by *Panstrongylus geniculatus* (Hemiptera: Reduviidae) in Caracas (Metropolitan District) and neighboring States, Venezuela. *Int. J. Parasitol.* **35**: 1379-1384.
- Chagas C. (1909). Nova trypanosomiasis humana. Estudo sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi*, N. Gen. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. **1**: 159-218.
- Chagas C. (1911). Nova entidade morbida do homen. Resumo general dos estudos etiologicos e clinicos. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. **3**: 219.
- Dao L. (1949). Otros casos de enfermedad de Chagas en el estado Guárico (Venezuela): formas agudas y crónicas; observación sobre enfermedad de Chagas congénita. *Rev. Policlin. Caracas*, **17**: 17-32.
- Davila H. O., Revelli S. S. & Moreno H. S. (1994). Infection with *Trypanosoma cruzi* during pregnancy in rats and a decrease in chronic myocardial lesion in their infected offspring. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **50**: 506-511.
- Delgado M.A. & Santos-Buch C.H.A. (1978). Transplacental transmission and fetal parasitosis of *Trypanosoma cruzi* in outbred white mice. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **27**: 1108-1115.
- Elói-Santos S. M., Novato-Silva E., Maselli V. M., Gazzinelli G., Colley D. G. & Correa-Oliveira R. (1989). Idiotypic sensitization in utero of children born to mothers with schistosomiasis or Chagas' disease. *J. Clin. Invest.* **84**: 88-93.
- Frank F., Sartori M. J., Asteggiano C., Lin S., de Fabro S. P. & Fretes R. E. (2000). The effect of placental subfractions on *Trypanosoma cruzi*. *Exp. Mol. Pathol.* **69**: 144-151.
- Gitlin D. & Koch C. (1988). On the mechanism of maternofetal transfer of human albumin and G-globulin in the mouse. *J. Clin. Invest.* **47**: 1204-1208.
- Gonzalez-Cappa S. M., Mirkin G. A., Solana M. E. & Tekiel V.S. (1999). *Patología por Trypanosoma cruzi ¿Cepa dependiente?*. Simposio internacional. Academia Nacional de Medicina. Buenos Aires.
- Guzmán B., García G., Floriani V., Guerrero M., Torres C., Ramírez M. (1998). Riesgo de transmisión por

- Trypanosoma cruzi* por transfusión de sangre en México. *Rev. Panam. Salud Pública*. **4**: 94-99.
- Herrera L. & Urdaneta-Morales S. (1992). *Didelphis marsupialis*: a primary reservoir of *Trypanosoma cruzi* in urban areas of Caracas, Venezuela. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **68**: 607-612.
- Herrera L., Urdaneta-Morales S. & Carrasco H. (2003). *Trypanosoma cruzi*: Behavior of metatrypomastigotes from *Didelphis marsupialis* and *Panstrongylus geniculatus*. *Rev. Cient. FCV-LUZ*. **13**: 307-311.
- Kleinbaum D., Kupper L., Muller I. & Nizan A. (1998). *Applied regression analysis and other multivariable method*. 3ra Ed. Duxbury Press. An Internacional Thomson Publishing Company, Boston.
- Lugo A. (1973). *Influencia de la ruta de inoculación de tripomastigotes de Trypanosoma cruzi sobre el desarrollo de la parasitemia en ratones albinos y alopécicos*. Postgrado en Parasitología. Enfermedad de Chagas. Universidad de los Andes, Mérida. Venezuela. p: 68-96.
- Marquez de Araujo S., Rivera M. T., El Bouhdidi A., de Maertelaer V. & Carlier Y. (1996). Maternal *Trypanosoma cruzi*-specific antibodies and worsening of acute infection in mouse offspring. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **54**: 13-17.
- Meckert P. C., Chambo G. J. & Laguens R. P. (1980). Enfermedad congénita secundaria a la infección crónica del ratón con *Trypanosoma cruzi*. *Medicina* (B. Aires), **40**: 40-44.
- Mjihdi A., Lambot M. A., Stewart I. J., Detournay O., Noël J. Ch., Carlier Y. & Truysens C. (2002). Acute *Trypanosoma cruzi* infection in mouse induces infertility or placental parasite invasion and ischemic necrosis associated with massive fetal loss. *Am. J. Pathol.* **161**: 673-680.
- Moreno E., Moreno S. & Zassa V. (1998). Transplacental transmission of *Trypanosoma cruzi* in rat with acute infection. 47 th Annual Meeting. *Am. J. Soc. Trop. Med. Hyg. San Juan Puerto Rico*. **59**: 639.
- Moreno E.A., Rivera I.M., Moreno S.C., Alarcón M.E. & Lugo-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., Quintero A. C. & Araujo S. (2003b). Efectos de la infección chagásica aguda en ratones NMRI durante la gestación. *Acta Cientif. Vzolana*. **54 (Supl.1)**: 227.
- Moreno E., Méndez M., Alarcón M., Araujo S. & Lugo de Yarbuh A. (2005). Reactivación de la infección chagásica en ratas Wistar gestantes. *Kasmera*. **33**: 51-63.
- Moretti E., Basso B., Castro I., Carrizo M., Chaul M., Barbieri G., Canal D., Sartori M. & Carrizo R. (2005). Chagas' disease: Study congenital transmission in cases of acute maternal infection. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **38**: 53-55.
- Neves S. F., Elói-Santos S., Ramos R., Rigueirinho S., Gazzinelli G. & Correa-Oliveira R. (1999). In utero sensitization in Chagas' disease leads to altered lymphocyte phenotypic patterns in the newborn cord blood mononuclear cells. *Parasit. Immunol.* **21**: 631-639.
- Nilo M. E., Alvarado J., Ramírez M. & Espejo E. (2000). Hallazgo de tripomastigotes en estudio citoquímico de líquido amniótico. *Parasitol. al día* **24**: 49-51.
- Pifano F. (1986). El potencial enzoótico del complejo *Schizotrypanum cruzi-Didelphis marsupialis-Panstrongylus geniculatus* y sus incursiones a la vivienda humana del Valle de Caracas, Venezuela. *Bol. Acad. Cienc. Fis. Mat. Nat. Caracas*. **46**: 9-37.
- Sacks G., Sargent I. & Redman C. (1999). An innate view of human pregnancy. *Immunol. Today*. **20**: 114-118.
- Sala M. A., Lopes R. A., Carrazo-Abrahão A. M. & Meneguette C. (2006). Effect of the acute infection by *Trypanosoma cruzi* intrauterine growth of the mouse fetuses. *Parasitol Latinoam*. **61**: 69-73.
- Schijman A., Vigliano C., Burgos J., Favaloro R., Perrone S. & Laguens R. (2000). Early diagnosis of recurrent of *Trypanosoma cruzi* infection by Polymerase Chain Reaction after heart

- transplantation of a Chronic Chagas' Heart Disease Patient. *J. Heart Lung Transplant.* **19**: 1114-1117.
- Schuster G. & Schaub G. (2000). *Trypanosoma cruzi*: skin-penetration kinetics of vector-derived metacyclic trypomastigotes. *Int. P. Parasitol.* **30**: 1475-1479.
- Scrimshaw N. S. & Schürch B. (1998). Causes and consequences of intrauterine growth retardation. *Eur. J. Clin. Nutr.* **52 (Suppl 1)**: S1-S103.
- Sell P. & Burton M. (1981). Identification of Leishmania amastigotes and their antigens in formalin fixed tissue by immunoperoxidase staining. *Trans. Roy Soc. Trop. Med. Hyg.* **75**: 461-468.
- Shearer G. M. & Clerici M. (1996). Protective immunity against HIV infection: has nature done the experiment for us?. *Immunol. Today.* **17**: 21-24.
- Stiehm E. R., Vaerman J. P. & Fudenberg H. H. (1966). Plasma infection in immunologic deficient state. Metabolic and therapeutic studies. *Blood.* **28**: 918.
- Szarfman A., Urman J., Otalora A., Larguia A. & Yanovsky J.F. (1975). Specific agglutinins and immunoglobulins levels in congenital Chagas infection. *Medicina (B. Aires).* **35**: 245.
- Tomlinson S., Pontes de Carvalho L. C., Vandekerckhove F. & Nussenzweig V. (1994). Role of sialic acid in the resistance of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes to complement. *J. Immunol.* **153**: 3141-3147.
- Umekita I. F. & Mota I. (2000). How are antibodies involved in the protective mechanism of susceptible mice infected with *T. cruzi*?. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **33**: 253-258.
- Waynforth H.B. & Flecknell P.A. (1992). Experimental and surgical technique in the rat. Academic Press Limited. London.
- Werner H. & Kunert H. (1958). Über die ursache von congenitale protozoen-infektionen. *U. Tropenmed. Parasit.* **9**: 17.
- Xu C., Mao D., Holers V. M., Palanca B., Cheng A. M. & Molina H. A. (2000). Critical role for murine complement regulator in fetomaternal tolerance. *Science*, **287**: 498-501.

Recibido el 21/03/2006
Aceptado el 05/10/2006