

Investigaciones sobre la transmisión vertical de *Trypanosoma cruzi* en ratas Wistar crónicamente infectadas

Elio A. Moreno^{1*}, Arelis C. Quintero¹, Marítza E. Alarcón¹, Ana Lugo de Yarbuh¹,
Stelliana C. Moreno¹, Sonia Araujo A.¹ & Rafael Borges²

Se presentan los resultados de un estudio experimental sobre la posible transmisión vertical de *Trypanosoma cruzi* en ratas albinas (*Rattus norvegicus*) cepa Wistar crónicamente infectadas. El curso de la infección fue evaluado antes del apareamiento, durante la gestación y después del parto mediante pruebas de diagnóstico parasitológico, inmunológico e histopatológico. Como controles se utilizaron ratas vírgenes infectadas y sanas gestantes. Los exámenes directos en muestras de sangre, hemocultivos y xenodiagnósticos realizados a las madres y a las crías, no presentaron parasitemias patentes y/o subpatentes. Exámenes serológicos realizados con la IFI y ELISA a las ratas vírgenes infectadas (A), gestantes infectadas (B) y a las crías, revelaron anticuerpos específicos anti-*T. cruzi* en el 100 % de las madres infectadas, 26,2 y 44,6 % de las crías y 41,6 y 83,3 % de las crías sanas que fueron alimentadas sobre madres infectadas. El estudio minucioso de las muestras frescas y de cultivo de líquido amniótico, no mostró formas flageladas de *T. cruzi*. El estudio histopatológico reveló discreta miocarditis, miositis y vellositis con características de cronicidad, acompañada de nidos de amastigotes de *T. cruzi* a nivel del músculo cardíaco, esquelético y en el estroma de una placenta; moderado infiltrado inflamatorio sin parasitismo en útero, cordón umbilical y glándulas mamarias. La persistencia de nidos de amastigotes de *T. cruzi* en el corazón, músculo esquelético y en una placenta de ratas con infección chagásica crónica, sugiere la posibilidad de infección fetal. La patogenicidad de la cepa, formas del parásito utilizado y el tamaño del inóculo, pudieran ser factores que inciden en las variaciones observadas en la transmisión vertical de *T. cruzi*.

Palabras claves: *Trypanosoma cruzi*, transmisión vertical, rata Wistar, infección crónica.

INTRODUCCIÓN

Trypanosoma cruzi (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) agente etiológico de la infección chagásica, puede ser transmitido de la madre al hijo por vía transplacentaria y por el amamantamiento, durante las fases aguda y/o crónica de la infección materna (Bittencourt, 2000). La posibilidad de transmisión congénita de la infección fue referida por Chagas (1911) y su comprobación fue atribuida a Dao (1949), quien observó formas sanguíneas de *T. cruzi* en la sangre periférica de un niño recién nacido de madre con enfermedad de Chagas agudo. A partir de ese momento, otros casos congénitos se han

descrito en Venezuela y en otros países del Continente Americano (Howard, 1957; Rassi *et al.*, 1958; Pifano, 1960; Bittencourt, 1972; Schmunis & Szafrman, 1977; Azogue *et al.*, 1985; Ponce & Ponce, 1995; Torrico *et al.*, 2004; 2006). Bittencourt *et al.* (1988) señalan que la prevalencia de la infección por *T. cruzi* en mujeres embarazadas en Sudamérica, varía entre 2 y 51 % en centros urbanos y de 23 a 81 % en áreas endémicas para la enfermedad de Chagas. Las madres infectadas asintomáticas pueden transmitir la infección a sus hijos a través de la placenta y ocasionalmente por la lactancia. Hasta el presente se desconocen las causas por las cuales esta incidencia es tan baja, así como los diferentes factores que influyen para que una misma madre genere algunos hijos infectados y otros no (Bittencourt, 2000; Blanco *et al.*, 1999).

La transmisión congénita de *T. cruzi* ha sido investigada en diferentes modelos animales, con el objeto de clarificar aspectos relacionados con este mecanismo de transmisión. Los primeros trabajos

¹ Laboratorio de Parasitología Experimental (LAPEX), Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, ULA - Mérida.

² Departamento de Estadística, Facultad de Economía, Universidad de los Andes, Mérida 5101, Venezuela.

*Autor de correspondencia: emorenob@ula.ve

experimentales fueron realizados por Mayer & Rocha-Lima (1914) quienes formularon la hipótesis de la transmisión placentaria al encontrar nidos de amastigotes de *T. cruzi* en las placentas de cobayos experimentalmente infectados, sin observar alteraciones en las crías. A partir de entonces, otras investigaciones efectuadas en ratones (Delgado & Santos-Buch, 1978; Andrade, 1982; Abdelkarim *et al.*, 2002; Moreno *et al.*, 2003a), conejos (Villela, 1923), perros (Souza-Campos, 1928) y monos (Sullivan *et al.*, 1994), han demostrado transmisión congénita del parásito durante la fase aguda de la infección a un número reducido de crías.

Estudios experimentales llevados a cabo en la rata albina (*Rattus norvegicus*), cepa Wistar, machos y hembras, producidas por la inoculación intraperitoneal de formas sanguícolas de la cepa Y de *T. cruzi*, demostraron que la misma constituye un modelo apropiado, que reproduce con gran semejanza: el espectro patológico que predomina en la enfermedad de Chagas aguda (Scorza, 1980) y los mecanismos de transmisión congénita del parásito durante la fase aguda de la infección chagásica (Moreno *et al.*, 2006). Partiendo de esta premisa, el presente trabajo tiene como objetivo investigar si este mecanismo de transmisión vertical de *T. cruzi* ocurre en ratas con infección chagásica crónica. El curso de la infección fue evaluado antes, durante la gestación y después del parto, mediante un estudio parasitológico, inmunológico e histopatológico en las ratas crónicamente infectadas con *T. cruzi* y en sus crías.

MATERIALES Y MÉTODOS

Parásitos

Se utilizaron parásitos de la cepa Y de *T. cruzi* (Pereira da Silva & Nussenzweig, 1953) de referencia internacional y cedida por la Cátedra de Parasitología de la Universidad de Carabobo, Valencia-Venezuela, y mantenidos en nuestro laboratorio por pasajes seriados en triatomíneos (*Rhodnius prolixus*), cultivos *in vitro* y en ratones NMRI. Las formas sanguícolas de *T. cruzi* fueron obtenidas por cardiopuntura con jeringas heparinizadas, a partir de ratones experimentalmente infectados con altas parasitemias. La sangre fue mezclada con PBS pH 7,2 y el número de parásitos fue cuantificado siguiendo la metodología

descrita por Brener (1962), mediante el conteo de los tripomastigotes en 5 mm³ de la suspensión sanguínea.

Infección experimental

De un total de 30 ratas hembras de 20 días de nacidas y con un peso promedio de 50 gr, 20 fueron inyectadas intra-dérmicamente en el miembro inferior derecho con un inóculo aproximado de 1x10⁵ tripomastigotes sanguícolas contenidos en un volumen de 0,1 mL de la suspensión. Las 10 ratas juveniles restantes sanas, utilizadas como grupo control, fueron inyectadas por vía intra-dérmica con 0,1 mL de solución fisiológica salina. Ambos grupos de ratas fueron mantenidas en jaulas separadas en nuestro bioterio experimental bajo condiciones ambientales controladas y alimentadas con dieta comercial (ratarina) y agua *ad libitum*.

Estimación de la infección y apareamiento

A las ratas adultas que cursaban la fase crónica de la infección, se les practicaron exámenes parasitológicos (directos en sangre periférica e indirectos tales como: xenodiagnóstico utilizando ninfas de IV estadio de *R. prolixus* y hemocultivo en medio de cultivo NNN-USAMRU (Walton *et al.*, 1972) adicionada con solución fisiológica salina como fase líquida) y serológicos siguiendo los procedimientos indicados por Moreno *et al.* (2003b). Inmediatamente después, las ratas infectadas y controles sanas fueron separadas en tres grupos: Un grupo control infectado (A) de 8 ratas vírgenes, un grupo (B) de 12 ratas infectadas y un grupo control sano (C) de 10 ratas. Las ratas de los grupos B y C en etapas de proestrus y/o estrus de su ciclo estral, fueron apareadas con machos en una relación de 2 hembras/1 macho por jaula. Una vez comprobados los espermatozoides en el lavado vaginal, las ratas infectadas y controles sanas preñadas, fueron colocadas en jaulas individuales en el bioterio experimental bajo las mismas condiciones ambientales señaladas.

Estimación parasitológica durante la gravidez

La parasitemia fue evaluada en forma individual en las ratas infectadas mediante el examen directo de muestras de sangre extraída con capilares heparinizados, por punción del plexo retro-orbital a los 6, 12 y 20 días de la gravidez y a los 15 días después del parto normal, utilizando el método modificado de

Brener (1962) y el microhematócrito como método de concentración (Freilij *et al.* 1983).

Detección de anticuerpos humores

Los métodos serológicos empleados para apreciar los niveles de anticuerpos (Ac) específicos anti-*T. cruzi* en los sueros de las madres infectadas, en las ratas no preñadas infectadas y en las crías, fueron las técnicas de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) y el Ensayo Inmunoenzimático (ELISA). Para estas pruebas, se utilizó 0,5 y 1 mL de sangre extraída del plexo retro-orbital de cada animal y los sueros separados por centrifugación fueron congelados a -20 °C hasta su uso. El antígeno empleado se preparó con formas de cultivo de la cepa Y de *T. cruzi*, colectadas en fase exponencial de crecimiento en el medio de cultivo NNN, siguiendo los procedimientos descritos por Camargo (1966) y Voller *et al.* (1975).

Transmisión de T. cruzi transplacentaria y por el amamantamiento

Al término de la gestación las ratas del grupo B fueron separadas en tres subgrupos: a 4 ratas (B1) se les permitió el parto normal con el objeto de investigar transmisión transplacentaria del parásito; 4 ratas (B2) se les permitió el parto normal, pero sus crías recién nacidas fueron intercambiadas por crías recién nacidas de ratas sanas, con la finalidad de investigar la transmisión de *T. cruzi* a través de la leche durante la lactancia y las 4 ratas infectadas (B3) restantes, junto con 3 ratas gestantes sanas fueron sacrificadas para buscar tripomastigotes del parásito en el líquido amniótico y alteraciones histopatológicas a nivel del corazón, músculo esquelético, útero grávido, cordón umbilical, glándulas mamarias y placentas.

Evaluación parasitológica de las crías

Muestras de sangre extraída de la cola de cada una de las crías juveniles amamantadas por sus madres biológicas infectadas y las alimentadas por nodrizas sanas, fueron examinadas a los 10, 20 y 30 días de nacidas, con el fin de detectar parasitemias patentes. Igualmente, parasitemias ocultas o subpatentes fueron investigadas después del último muestreo, mediante exámenes parasitológicos indirectos como el hemocultivo en medio NNN y el xenodiagnóstico con ninfas de *R. prolixus*. Para tal fin, 0,3 mL de sangre obtenida con capilares heparinizados del plexo ocular

de cada cría juvenil, fue mezclada con la solución fisiológica salina contenida en tubos con medio de cultivo NNN. Los hemocultivos fueron mantenidos en estufa a 26 °C y revisados a los 15, 30 y 45 días después de la adición de la sangre.

Para la aplicación de xenodiagnósticos, 10 ninfas de *R. prolixus* se alimentaron hasta la repleción sobre cada una de las madres infectadas y sus crías inmovilizadas dentro de una malla de plástico. Las ninfas fueron mantenidas en el insectario experimental y 30 días después de la ingesta sanguínea, las heces de los triatominos obtenidas individualmente mediante compresión abdominal, fueron examinadas al microscopio con el objeto de precisar la presencia de formas flageladas de *T. cruzi*.

Evaluación parasitológica del líquido amniótico (LA)

Las ratas infectadas del grupo B3 y 3 ratas sanas (A) a término de la gestación fueron sacrificadas por hiperanestesia con éter dietílico. En el momento del sacrificio, se extrajo cuidadosamente el útero grávido con sus órganos anexos, el cual fue lavado sobre una cápsula de Petri con solución fisiológica salina y cuidadosamente secado con papel adsorbente a fin de eliminar restos sanguíneos procedentes de las venas y arterias uterinas para evitar cualquier contaminación. Con una pipeta Pasteur se hizo una pequeña incisión sobre la membrana en cada cuerno uterino a nivel de los fetos. Se recolectaron varias muestras de LA, una para ser examinada bajo el microscopio y las otras fueron depositadas en un recipiente estéril con la finalidad de conformar un "pool". Entre 0,3 y 0,5 mL del pool de LA/rata fue adicionado a 2 tubos con medio de cultivo NNN y revisados a los 15, 30 y 45 días después de la adición de la muestra.

Estudio histopatológico

Las incisiones sobre la membrana uterina fueron ampliadas para extraer los fetos unidos por el cordón umbilical a sus placentas. Al mismo tiempo, se extrajo el corazón completo que fue cortado frontalmente en dos partes, fragmentos de músculo esquelético poplíteo, útero grávido y el sexto par de glándulas mamarias. Los tejidos fueron fijados en formalina neutra al 10 % durante 48 horas e incluidos en Paraplast (Monoject Scientific, St. Louis, MO. USA). Los cortes de 6 µm de espesor se hicieron en

un microtomo American Optical Spencer y fueron coloreados por los métodos de Giemsa-Pappenheim-colofonio (Bray & Garnham, 1962) y hematoxilina-eosina (HE). Igualmente, fueron sacrificadas por sobreenestesia con éter dietílico las crías juveniles provenientes de las madres chagásicas, junto con las crías sanas que fueron amamantadas sobre ratas infectadas y las crías de las ratas controles restantes. De cada una de las crías se extrajo el corazón completo que fue cortado frontalmente en dos partes iguales y fragmentos de la musculatura esquelética.

Análisis estadístico

Los títulos de anticuerpos anti-*T. cruzi* obtenidos con las técnicas serológicas empleadas (IFI y ELISA), fueron examinados mediante un análisis de variancia en una vía (Kleinbaum *et al.*, 1998). Las diferencias en los promedios de cada variable según los grupos y tiempos fueron considerados estadísticamente significativos con valores de $P < 0,001$.

RESULTADOS

Parasitemias

Los exámenes directos de muestras de sangre, hemocultivos y xenodiagnósticos realizados a cada una de las ratas con infección chagásica crónica, antes del apareamiento, durante el período de gestación y a los 15 días después del parto, no mostraron parasitemias patentes o subpatentes. Igualmente, resultaron negativas a las pruebas de diagnóstico parasitológico las 103 crías juveniles provenientes de las 8 ratas infectadas de los grupos B1 y B2 y amamantadas hasta el destete por sus madres

biológicas y por nodrizas sanas, así como las 12 crías juveniles de madres sanas que fueron amamantadas por madres infectadas del grupo B2.

Presencia de anticuerpos

Las pruebas serológicas realizadas a las ratas vírgenes infectadas (A) y a las ratas chagásicas gestantes (B) antes del apareamiento, durante la gravidez y a los 15 días después del parto, mostraron títulos específicos anti-*T. cruzi* $> 1:32$ para la IFI y densidad óptica (DO) $> 0,35$ para la ELISA, considerándose en ambos casos el 100 % de las ratas seropositivas. Los títulos de Ac obtenidos con la IFI durante el período de gestación, se analizaron mediante un gráfico que representa la mediana en cada tiempo y en cada grupo $\pm$ DT, observándose diferencias significativas en los títulos entre los tiempos ($P < 0,001$) (Fig. 1). Igualmente, los valores de DO obtenidos con la ELISA, mostraron diferencias significativas en los tiempos ($P = 0,03356$) y no en los grupos ($P = 0,2899$). En cuanto a los exámenes serológicos efectuados a las crías, las pruebas realizadas con ambas técnicas presentaron porcentajes variables de seropositividad desde un 26,2 y 44,6 % para las crías nacidas de madres chagásicas y 41,6 y 83,3 % para las crías sanas que fueron amamantadas por madres infectadas (Tabla I). Los sueros procedentes de las ratas sanas y de sus crías no mostraron reactividad alguna.

Valoración del líquido amniótico y alteraciones histopatológicas

En los exámenes microscópicos directos realizados a las muestras de líquido amniótico de las ratas infectadas sacrificadas a término de la gestación, y en los cultivos *in vitro*, no se apreciaron

Tabla I. Variación en los títulos de anticuerpos anti-*T. cruzi* en ratas crónicamente infectadas, gestantes y en su progenie.

Parámetros			Técnicas serológicas		
Sueros	N° de animales	(%)	Título (IFI)	(%)	DO (ELISA)
Ratas gestantes	12	100	1:64 - 1:2048	100	0,35 - 0,60
Crías de mch*	103	27/103 (26,2)	1:64 - 1:512	46/103 (44,0)	0,35
Crías de ms** amamantadas por mch*	12	5/12 (41,6)	1:64 - 1:128	10/12 (83,3)	0,35

* = madres chagásicas; ** = madres sanas; IFI = Inmunofluorescencia Indirecta; ELISA = Ensayo Inmunoenzimático; DO = densidad óptica

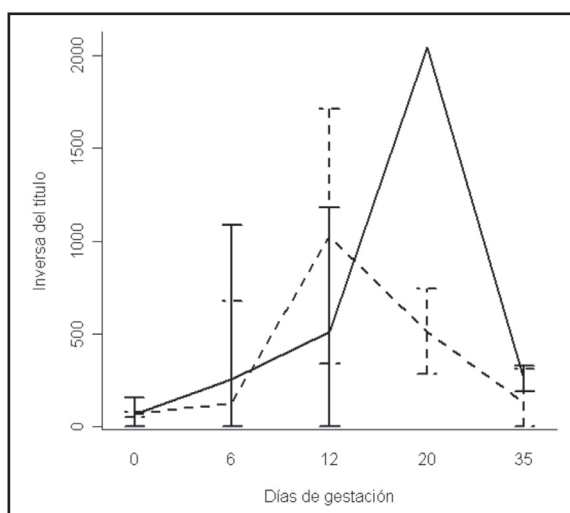


Fig. 1. Títulos de anticuerpos anti-*T. cruzi* detectado en sueros de ratas crónicamente infectadas con formas sanguícolas del parásito, antes del apareamiento (0), durante la gestación (6, 12 y 20) y 14 días después del parto normal (35). (— Ratas gestantes; ---- Ratas vírgenes)

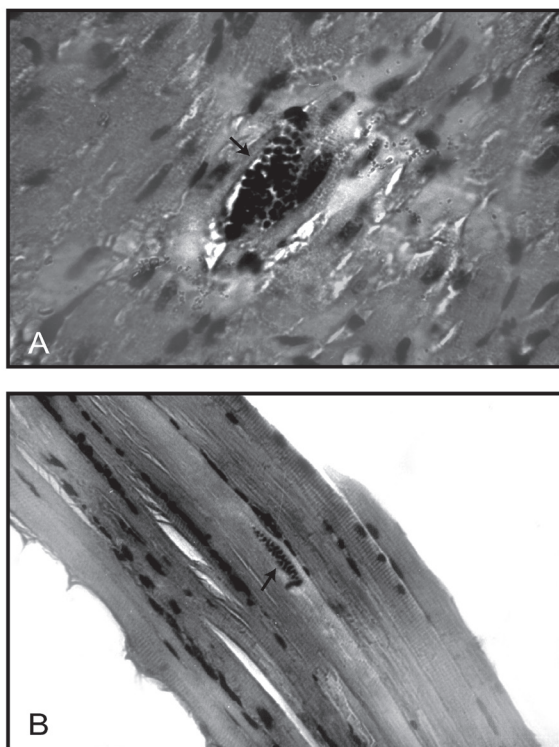


Fig. 2. Persistencia parasitaria en cortes de corazón (A) y músculo esquelético (B) de ratas Wistar crónicamente infectadas con la cepa Y de *T. cruzi*. Observe áreas de inflamación focalizadas de naturaleza mononuclear (Giemsa-Colofonio, 1000X, 400X).

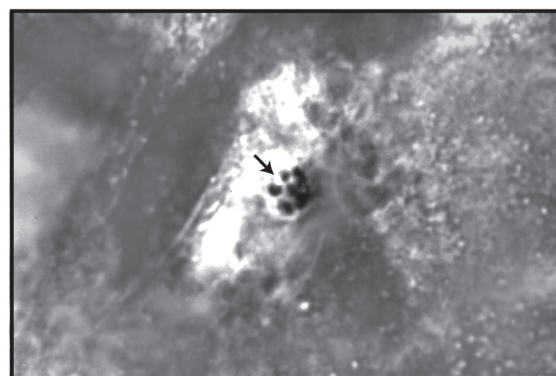


Fig. 3. Persistencia parasitaria en cortes de placenta de una rata Wistar crónicamente infectada con la cepa Y de *T. cruzi*, a término de la gestación (HE, 1000X).

formas flageladas de *T. cruzi*. Por otro lado, el análisis histopatológico de los órganos maternos reveló a nivel del corazón y músculo esquelético moderada miocarditis y miositis focal de variable intensidad, destrucción de algunas fibras musculares con discreta fibrosis en la masa muscular y persistencia escasa de nidos de amastigotes (Fig. 2 A, B). El útero grávido mostró distensión de las fibras musculares lisas, discreto infiltrado celular sin parasitismo y abundantes eosinófilos. En las secciones del cordón umbilical se observó un discreto infiltrado celular en el tejido mucoso de Wharton y en las tunicas media y adventicia de las arterias y venas umbilicales. En los cortes de glándulas mamarias no observamos alteraciones apreciables ni presencia de parásitos en los alveólos, conductos excretores y en el tejido conectivo inter e intralobulillar. Las células alveolares mostraron citoplasma altamente basofílico y secreciones con presencia de macrófagos en los conductos alveolares. En los cortes de las placentas se observaron focos inflamatorios a nivel del estroma vellosito placentario y en las placas coriónica y desidual. En una placenta se evidenció un nido de amastigotes a nivel del estroma y vellositis de variable intensidad (Fig. 3).

El estudio histopatológico de los cortes de corazón y músculo esquelético de las crías juveniles, nacidas de madres con infección chagásica crónica y de las 12 crías de madres sanas amamantadas por madres infectadas, mostraron en algunas secciones discretos focos inflamatorios y ausencia de parasitismo tisular. Los cortes del corazón, músculo esquelético y las placentas de madres sanas no presentaron alteraciones histopatológicas apreciables.

DISCUSIÓN

Los métodos de diagnóstico parasitológico empleados en las ratas infectadas con *T. cruzi*, durante el desarrollo de la investigación, revelaron ausencia de parasitemias patentes y/o subpatentes, lo que indica que en la fase crónica de la infección chagásica hay un control sobre la liberación de parásitos al torrente sanguíneo. Estos resultados corroboran las observaciones publicadas por Moreno *et al.* (2005) quienes estudiando la reactivación de la infección chagásica en ratas gestantes crónicamente infectadas con formas metacíclicas de *T. cruzi* DSM, no detectaron exacerbación de parasitemias en la sangre. Sin embargo, observaron cambios apreciables en la respuesta inmunológica caracterizados por una disminución en los niveles de IgG y un incremento significativo de la IgM, signos característicos de una reactivación de la infección chagásica aguda. Estos cambios en la respuesta inmunológica probablemente sean los responsables de la eliminación de las formas sanguíneas del parásito. No obstante, Bittencourt (1992) señaló que mujeres en estado crónico de la enfermedad de Chagas, desarrollan embarazos aparentemente normales, presentando pocas evidencias que indiquen cambios en la respuesta inmune o reflejen recrudescimiento de la enfermedad de Chagas.

En cuanto a la transmisión vertical de *T. cruzi*, algunos autores han referido casos congénitos de madres que presentaban importantes manifestaciones clínicas producidas por la infección chagásica tanto en la fase aguda (Dao, 1949; Jörg, 1954; Howard, 1957; Pifano, 1960) como en la fase crónica (Rassi *et al.*, 2004).

En animales experimentales los resultados han sido contradictorios, Souza-Campos (1928) demostró transmisión congénita del parásito en perras durante esta fase de la infección. Por otra parte, Apt *et al.* (1967) investigaron este mecanismo de transmisión en ratas con infección aguda y crónica. Los autores señalaron que a pesar de obtener infección en las ratas madres, no observaron infección congénita en las crías, lo que podría deberse a la resistencia natural de la rata a la infección por *T. cruzi*. Por otra parte, Carlier *et al.* (1987), Marques de Araujo & Chiari (1996) trabajando con ratones crónicamente infectados con *T. cruzi*, y Jansen *et al.* (1994) con faros (*Didelphis marsupialis*), no observaron este

mecanismo de transmisión del parásito a su progenie. La única referencia de infección congénita en ratones en fase crónica, es la de Cunio *et al.* (1980), quienes observaron formas amastigotas en el tejido fetal.

La transmisión vertical de la infección chagásica es mayor durante la fase aguda por la presencia de tripomastigotes en la sangre materna. Se ha señalado que el parásito invade y se multiplica en las células de Hofbauer de la placenta, que los tripomastigotes son liberados posteriormente y pueden alcanzar al embrión o feto por vía hematogénea (Bittencourt, 2000). Este mecanismo de transmisión ha sido investigado en animales experimentalmente infectados con diferentes cepas de *T. cruzi*, variando el inóculo y la forma del parásito. Dávila *et al.* (1994) trabajando con ratas endogámicas infectadas con 1×10^6 tripomastigotes sanguíneos de *T. cruzi* durante la gestación, demostraron que 5/67 (7,5 %) de las crías procedentes de madres infectadas presentaron parasitemias patentes y 5/15 hemocultivos positivos. Igualmente, Moreno *et al.* (2003b) empleando inóculos bajos de 1×10^4 formas metacíclicas de *T. cruzi* de origen canino, observaron transmisión vertical del parásito en 4/44 (9,1 %) crías procedentes de ratas que cursaban esta fase aguda de la infección chagásica. La transmisión vertical también ha sido observado en ratones C3H (Marques de Araujo & Chiari, 1996), ratones C3H/HeN (Solana *et al.*, 2000), ratones NMRI (Moreno *et al.*, 2003a) y en monos (Sullivan *et al.*, 1994). En el presente trabajo, los exámenes parasitológicos efectuados a las crías nacidas y amamantadas por las madres biológicas crónicamente infectadas, no mostraron formas sanguíneas de *T. cruzi* en las muestras de sangre examinadas, a pesar de que en una de las placentas se observó un nido de amastigotes. Estos resultados concuerdan con la opinión de Rassi *et al.* (1958) quienes, aún cuando observaron parásitos en la placenta, no pudieron comprobar la presencia de *T. cruzi* en el recién nacido. Posteriormente, Bittencourt (2000), señaló que la transmisión transplacentaria parece depender de factores ligados al parásito y al hospedador. La autora sugiere que el epitelio trofoblástico que separa la sangre materna del estroma y las vellosidades, además de ofrecer una barrera mecánica, constituye una barrera inmunológica. Por otra lado, se ha señalado que el pasaje transplacentario de *T. cruzi* también depende de la patogenicidad de la cepa y de la actividad fagocítica en la placenta (Delgado & Santos-Buch, 1978).

El otro mecanismo de transmisión de *T. cruzi* investigado, fue a través de la leche durante el amamantamiento. Las crías de madres sanas, que fueron amamantadas hasta el destete por ratas crónicamente infectadas, no presentaron infecciones patentes evidenciables por los métodos de diagnóstico parasitológico utilizados. En vista de la presencia de anticuerpos anti-*T. cruzi* en las crías, podría pensarse que los anticuerpos maternos transferidos pasivamente restringen la parasitemia. Investigaciones llevadas a cabo en mujeres crónicamente infectadas con *T. cruzi* y en animales infectados experimentalmente, no han evidenciado la transmisión del parásito por esta vía (Bittencourt, 1992; Marques de Araujo & Chiari, 1996; Amato Neto *et al.*, 2000; Campos *et al.*, 1988). Bittencourt *et al.* (1988) señalaron que la transmisión de *T. cruzi* a través de la lactancia raramente ocurre aún en casos con enfermedad de Chagas aguda. Igualmente, Miles (1972) había indicado que la transmisión del parásito por la leche materna era extremadamente rara, debido a la dificultad de la transmisión oral. Estas observaciones fueron corroboradas por Pinto *et al.* (1989) y por Moreno *et al.* (2003b) quienes estudiando la transmisión congénita de la infección chagásica aguda en ratones y ratas Wistar, no encontraron evidencias del pasaje de *T. cruzi* a través de este medio.

Anticuerpos humorales anti-*T. cruzi* fueron apreciados en los sueros de las ratas madres crónicamente infectadas. Los títulos de anticuerpos en las ratas gestantes aumentaron significativamente al final de la gestación, regresando después del parto a valores similares a las ratas infectadas no preñadas. Este incremento de los Ac sugiere que se produjeron cambios en la respuesta inmune de la madre, los cuales son potenciados por los efectos paralelos de la gravidez. Igualmente, fueron detectados importantes niveles de anticuerpos específicos en los sueros de las crías nacidas y amamantadas por sus madres biológicas con infección chagásica crónica y en las crías de madres sanas amamantadas por ratas chagásicas.

Con la técnica de ELISA, los valores porcentuales de los títulos de anticuerpos fueron mayores, lo que indica la mayor sensibilidad de la reacción. Estos hallazgos, confirman que hubo transmisión pasiva de anticuerpos maternos anti-*T. cruzi* vía transplacentaria y a través de la leche a su progenie, confiriéndole protección parcial contra

infecciones por *T. cruzi* (Apt *et al.*, 1967; Pinto *et al.*, 1989; Carlier *et al.*, 1992).

El estudio parasitológico del líquido amniótico no reveló formas flageladas del *T. cruzi* en este medio. No obstante, Moreno *et al.* (2003a; 2006) observaron dichas formas en el líquido amniótico de ratones y en ratas en fase aguda de la infección chagásica, tanto en muestras frescas como en el pool sembrado en los tubos de cultivo NNN. Señalan los autores que la presencia de tripomastigotes en este medio, es indicativo de una posible infección fetal. En humanos, se han encontrado formas flageladas de *T. cruzi* en el líquido amniótico de mujeres jóvenes con enfermedad de Chagas y se ha demostrado la transmisión transplacentaria del parásito a sus hijos (Bittencourt *et al.*, 1981; Nilo *et al.*, 2000). Es importante alertar a los médicos y enfermeras sobre la presencia de formas infectivas de *T. cruzi* en este medio, a fin de evitar cualquier contacto con el líquido amniótico durante el momento del parto, principalmente de mujeres procedentes de áreas endémicas para la enfermedad de Chagas.

El estudio histopatológico realizado a los corazones y fragmentos de músculo esquelético de las ratas chagásicas sacrificadas a término de la gravidez, mostraron una miocarditis y miositis focal con características de cronicidad, destrucción de algunas fibras musculares con discreta fibrosis y persistencia de parásitos en el tejido muscular, similar a la descrita por Moreno *et al.* (2005) en ratas Wistar y Añez *et al.* (1999) y Elías *et al.* (2003) en humanos con enfermedad de Chagas crónica. En las secciones del útero grávido se evidenció un moderado infiltrado linfocitario en el miometrio y abundantes eosinófilos; la presencia de estas células sugiere posibles efectos de la infección por *T. cruzi* así como los efectos inducidos por la gravidez.

La persistencia parasitaria también fue evidente en una placenta, en donde se observó un pequeño pseudoquisté a nivel del estroma y vellositis de variable intensidad. La presencia de nidos de amastigotes en la parte vascular de la placenta, sugiere la posibilidad de infección fetal en la fase crónica. Esto es posible que ocurra aunque la placenta actúe como una barrera contra infecciones producidas por varias cepas de *T. cruzi*, aún siendo ellas altamente patógenas (Delgado & Santos-Buch, 1978; Andrade, 1982). Por otro lado, Moreno *et al.*

(2003a) y Carraro-Abrahão *et al.* (2000) observaron en placentas de ratones NMRI y suizos infectados con la cepas RAL y Y de *T. cruzi*, un intenso parasitismo y grandes nidos de amastigotes en el citoplasma de las células gigantes del estroma, así como transmisión vertical a su progenie en la fase aguda de la infección. En placentas humanas se ha descrito una placentitis chagásica, necrosis de las vellosidades del epitelio trofoblástico, intenso parasitismo y células inflamatorias abundantes. Este parasitismo placentario no necesariamente tendría una estricta correlación con la infección fetal, dado que se han observado casos de enfermedad de Chagas congénita sin el hallazgo histológico de *T. cruzi* así como nidación placentaria sin infección fetal (Bittencourt, 2000). Los resultados también confirman las observaciones de Andrade (1982) y Delgado & Santos-Buch (1978), quienes señalaron que cepas de *T. cruzi* de diferente origen, presentan distinto tropismo por la placenta, por lo que la transmisión congénita dependería de la virulencia (capacidad de proliferación) e histotropismo de la cepa del parásito así como de la capacidad fagocítica de los macrófagos de las vellosidades placentarias. Técnicas moleculares han demostrado que diferentes cepas y clones de *T. cruzi* presentan diferencias en tropismo hacia los tejidos del hospedador vertebrado (Vago *et al.*, 1996; 2000; Macedo *et al.*, 2002). De conformidad con esta proposición, la cepa Y de *T. cruzi* mantiene un tropismo placentario evidenciable por los resultados observados, mientras que otras cepas estudiadas en nuestro laboratorio tendrían un bajo o inexistente tropismo placentario, lo cual explicaría en parte la diferencia en la transmisión vertical del parásito (Moreno *et al.*, 2003b; 2005).

La presencia de focos inflamatorios en la masa muscular cardíaca y esquelética de las crías nacidas de madres chagásicas y las crías de madres sanas amamantadas por madres infectadas, posiblemente se deba a la acción de los anticuerpos maternos anti-*T. cruzi* transferidos pasivamente por vía transplacentaria y por la leche materna, más que a la presencia de tripomastigotes de *T. cruzi*, ya que estas formas parasitarias no fueron detectadas a través de los exámenes parasitológicos empleados.

Es importante señalar que dada la posibilidad de control de la transmisión vectorial, la transmisión vertical adquiere más importancia, ya que en los países donde se ha controlado o no hay transmisión vectorial este sería el principal factor, conjuntamente

con la transmisión por transfusiones sanguíneas, de nuevas infecciones por *T. cruzi*. Finalmente, es necesario conocer y entender los factores que pueden incidir en las variaciones observadas en la transmisión congénita del parásito, entre ellos la patogenicidad de la cepa, las formas del parásito y el tamaño del inóculo utilizado.

Research on vertical transmission of *Trypanosoma cruzi* in chronically infected Wistar rats.

SUMMARY

We give the results of an experimental study on possible vertical transmission of *Trypanosoma cruzi* in chronically infected Wistar rats. The progress of the infection was evaluated before, during and after parturition with parasitological, serological and histopathological tests. Infected virgin rats and healthy gestating rats were used as control. Direct parasitological examinations of blood samples, blood cultures and xenodiagnosis carried out on mothers and offspring did not reveal patent or sub-patent parasitemias. At the same time, serological tests with IIF and ELISA on virgin rats (A) and infected gestating rats (B) and offspring showed specific anti-*T. cruzi* antibodies in 100 % of infected mothers and 26.2 and 44.6 % of offspring, while the figures for healthy offspring nursing from infected mothers was 41.6 and 83.3 %. Histopathological tests showed slight parasitic persistence in cardiac, skeletal muscle and in stroma from a placenta; discrete myocarditis and myositis with features of chronicity; moderate inflammatory infiltrate without parasitism in the uterus, umbilical cord and mammary glands. These results suggest that fetal infection is possible in Wistar rats with chronic chagasic infection. There follows a discussion of the factors that might produce the variations noted in congenital *T. cruzi* transmission, including the pathogenicity of the strain, the parasite forms used and the amount inoculated.

Key words: *Trypanosoma cruzi*, vertical transmission, Wistar rat, chronic infection.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo de Desarrollo Científico, Humanístico y Tecnológico de la Universidad de

los Andes por el apoyo financiero a través de los Proyectos C-1184-03-03-A.; al FONACIT: Proyecto S1-20020005001; al Insectario de cría "Dr. Herman Lent" del Departamento de Biología de la Facultad de Ciencias, por el suministro de las ninfas de *R. prolixus*.

REFERENCIAS

- Abdelkarim M., Lambot M.A., Stewart I.J., Detournay 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.
- Amato Neto V., Lopes M.H., Setsu U.E., de Souza R.M.A.R. & Pinto Dias J.C. (2000). Outras formas de transmissão do *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Pat. Trop.* **29** (Supl.): 115-129.
- Andrade S.G. (1982). The influence of the strain of *Trypanosoma cruzi* in placental infections in mice. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **76**: 123-128.
- Añez N., Carrasco H., Crisanti G., Rojas A., Fuenmayor C., Gonzalez N., et al. (1999). Myocardial parasite persistence in chronic chagasic patients. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **60**: 726-732.
- Apt W., Naquira C., Tejada A. & Strozzi L. (1967). Transmisión congénita del *Trypanosoma cruzi*. II. En ratas con infección aguda y crónica. *Bol. Chil. Parasitol* **23**: 9-15.
- Azogue E. C., La Fuente C. & Darras C. H. (1985). Congenital Chagas' disease in Bolivia: epidemiological aspects and pathological findings. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **79**: 176-180.
- Bittencourt A. L. (1972). Incidência da transmissão congénita da doença de Chagas em abortos. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.* **14**: 257- 259.
- Bittencourt A. L. (1992). Possible risk factors for vertical transmission of Chagas' disease. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.* **34**: 403- 408.
- Bittencourt A. L. (2000). Transmissão Vertical da Doença de Chagas. pp. 16-20. En: *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. Eds. Brener Z., Andrade Z.A. & Barral- Netto M. 2a ed. Guanabara-Koogan., Rio de Janeiro, Brasil.
- Bittencourt A. L., Freitas L. A., Araujo M. O. G. & Jakomo K. (1981). Pneumonitis in congenital Chagas' disease. A study of 10 cases. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **30**: 38- 42.
- Bittencourt A. L., Sadigursky M., Silva A., Menezes C. A., Marianetti M. M., Guerra S. C, et al. (1988). Evaluation of Chagas' disease transmission through breast-feeding. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **83**: 37- 39.
- Blanco S. B., Segura E. L. & Gürtler R. E. (1999). El control de la transmisión congénita de *Trypanosoma cruzi* en la Argentina. *Medicina* (B. Aires). **59** (Supl. II): 138-142.
- Bray R. & Garnham P. C. C. (1962). The Giemsa colophonium method for staining protozoa in tissue section. *Indian J. Malariol.* **16**: 152-155.
- Brener Z. (1962). Observações sobre a imunidade e as superinfecções em camundongos experimentalmente inoculados com *Trypanosoma cruzi* e submetidos a tratamento. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.* **4**: 119-123.
- 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.
- Campos R., Pinto P. L., Moreira A. A., Amato Neto V., Duarte M. I., Santana E. et al. (1988). Estudo experimental sobre a transmissão da doença de Chagas por medio do leite. *Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. São Paulo.* **43**: 146- 47.
- Carlier Y., Rivera M.T., Truyen C., Pouissant F. & Milaire J. (1987). Interactions between chronic murine *Trypanosoma cruzi* infection and pregnancy: fetal growth retardation. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **37**: 534-540.
- Carlier Y., Rivera M. T., Truyen 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. Med. Hyg.* **46**: 116-122.
- Carrarao-Abrahão A. A., Lopes R. A., Salas M. A., Ribeiro R. D., Prado Jr. J. C., Albuquerque S, *et al.* (2000). Placental alterations of swiss mice infected with RAL strain of *Trypanosoma cruzi* *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **95 (Suppl. II)**: 122.
- Chagas C. (1911). Nova entidade morbida do homen. Resumo geral dos estudos etiologicos e clinicos. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **3**: 219.
- Cunio R. W., Olmos J. A., De Mercau G. T. H., Blanca R. L., De Marteau D., Ontiveros M. I. & Budeguer M. V. (1980). Chagas Mazza congénito experimental. *Medicina* (Buenos Aires), **40 (Suppl I)**: 50 – 55.
- 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. Policlín. Caracas.* **17**: 17- 32.
- Davila H. O., Revelli S. S., Moreno H. S., Valenti J. L., Musso C., Poli H.O., Morcini J. C. & Bottasso H. O. (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.
- Delgado M. A. & Santos-Buch C. H. A. (1978). Transplacental transmission and fetal parasitosis of *Trypanosoma cruzi* in outbred white Swiss mice. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **27**: 1108-1115.
- Elias F. E., Vigliano C. A., Laguens R. P., Levin M. J. & Berek C. (2003). Analysis of the presence of *Trypanosoma cruzi* in the heart tissue of three patients with chronic Chagas' disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **68**: 242- 247.
- Freilij H., Müller L. & Gonzalez Cappa D. (1983). Direct micromethod for diagnosis of acute and congenital Chagas' disease. *J. Clin. Microbiol.* **18**: 327- 330.
- Howard J. E. (1957). Enfermedad de Chagas congénita. *Bol. Chil. Parasitol.* **12**: 42.
- Jansen A., Madeira F. B. & Deane M. P. (1994). *Trypanosoma cruzi* infection in the Opossum *Didelphis marsupialis*: Absence of neonatal transmission and protection by maternal antibodies in experimental infections. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **89**: 41 – 45.
- Jörg M. E. (1954). Trypanosomiasis cruzi congénita mortal en un lactante de 17 días de vida. *El Recién Nacido* (Buenos Aires). **2**: 152-167.
- Kleinbaum D., Kupper L., Müller L. & Nizan A. (1998). *Applied regression analysis and other multivariable method*. 3ra. Ed. Duxbury Press. An International Thomson Publishing Company, Boston.
- Kolodny M. H. (1939). The transmission of immunity in experimental trypanosomiasis (*Trypanosoma cruzi*) from mother rats to their offspring. *Am. J. Hyg.* **30**: 19- 39.
- Lana M., Vieira L. M., Machado-Cohelo L., Chiari E., Velos V. M. & Tafuri W. M. (1991). Humoral immune response in dogs experimentaly infected with *Trypanosoma cruzi*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz,* **86**: 471- 473.
- Macedo A. M., Oliveira R. P. & Pena S. D. J. (2002). Chagas' disease: role of parasite genetic variation in pathogenesis. *Exp. Rev. Mol. Med.* **5**: 1-17.
- 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 Tropenhyg.* **18**: 257- 292.
- Miles M. A. (1972). *Trypanosoma cruzi* milk transmission of infection and immunity from mother to young. *Parasitology.* **72**: 65: 1- 9.
- Moreno E. A., Quintero A. C. & Araujo S. (2003a). Efectos de la infección chagásica aguda en ratones NMRI durante la gestación. *Acta Cientif. Vzolana.* **54 (Supl.1)**: 227.

- Moreno E. A., Rivera I. M., Moreno S. C., Alarcón M. E. & Lugo de Yarbuh A. (2003b). Transmisión vertical de *Trypanosoma cruzi* en ratas Wistar durante la fase aguda de la infección. *Invest. Clin.* **44**: 241- 254.
- Moreno B. E., Méndez I. M., Alarcón M. E., Araujo A. S. & Lugo de Yarbuh A. (2005). Reactivación de la infección chagásica en ratas Wistar gestantes. *Kasmera*. **33**: 51- 63.
- 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.
- Nilo M. E., Alvarado J., Ramirez M. & Espejo E. (2000). Hallazgo de tripomastigoto en estudio citoquímico de líquido amniótico. *Parasitol. día.* **24**: 49- 51.
- 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.
- Pifano F. (1960). Algunos aspectos de la enfermedad de Chagas en Venezuela. *Arch. Venez. Med. Trop. Parast. Med.* **3**: 73- 99.
- Pinto P. L. S., Campos R., Santana E. J., Moreira A. A. B., Amato-Neto V., Duarte M. Y. S. *et al.* (1989). Estudo experimental sobre a transmissão da doença de Chagas por meio do leite. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, **31 (Supl.7)**: S15.
- Ponce C. & Ponce E. (1995). Transmisión congénita de la enfermedad de Chagas en Honduras. *Parasitol. día.* **19**: 199.
- Rassi A., Borges C., Köberle F. & De Paula O. (1958). Sobre a transmissão congénita da doença de Chagas. *Rev. Goiania de Medicina*, **4**: 4.
- 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. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **37**: 1 - 12.
- Scorza C. (1980). La rata “Wistar” como modelo experimental para el estudio de la miocarditis chagásica: aspectos histopatológicos, histoquímicos, inmunológicos y electrocardiográficos en diferentes etapas de la infección. [Trabajo de Ascenso] Mérida: Univ. de los Andes.
- Schmuñis G. A. & Szarfman A. (1977). La enfermedad de Chagas congénita. *Medicina (B. Aires)*, **37**: 47- 53.
- 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.
- Souza-Campos E. (1928). Transmissão intrauterina do *Trypanosoma cruzi* na infecção experimental do cão. *An. Fac. Med. São Paulo*, **3**: 35.
- 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.
- Torrico F., Alonso-Vega C., Suarez E., Rodríguez P., Torrico M.C., Dramaix M., Truysens 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.
- Torrico F., Alonso Vega C., Suarez E., Tellez T., Brutus L., Rodríguez P., Torrico M. C., Schneider D., Truysens C. & Carlier Y. (2006). Are maternal re-infections with *Trypanosoma cruzi* associated with higher morbidity and mortality of congenital Chagas' disease? *Trop. Med. Int. Health.* **2**: 628- 635.
- Vago A. R., Andrade L. O., Leite A. A., d'Avila Reis D., Macedo A. M., Adad S. J. *et al.* (1996). Kinetoplast KDNA signatures of *Trypanosoma cruzi* strains directly from infected tissues. *Am. J. Pathol.* **149**: 2153- 2159.
- Vago A. R., Andrade L. O., Leite A. A., d'Avila Reis D., Macedo A. M., Adad S. J. *et al.* (2000). Genetic characterization of *Trypanosoma cruzi*

- directly from tissue of patients with chronic Chagas' disease: differential distribution of genetic types into diverse organs. *Am. J. Pathol.* **156**: 1805- 1809.
- Villela E. A. (1923). A transmissão intrauterina da molestia de Chagas. Encefalite congenita pelo *Trypanosoma cruzi*. *Folha Med.* **4**: 41- 43.
- Voller A., Draper C., Bidwell D. & Bretletti A. (1975). Microplate enzyme-linked-immunosorbent assay for Chagas' disease. *The Lancet*, **1**: 426- 428.
- Walton B. C., Brooks W. H. & Arjona L. (1972). Serodiagnosis of american leishmaniasis by indirect fluorescent antibody test. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **21**: 296- 299.
-

Recibido el 24/04/2006
Aceptado el 26/10/2006