

---

---

## **Transmisión vertical de *Trypanosoma cruzi* en ratas Wistar durante la fase aguda de la infección.**

Elio A. Moreno<sup>1</sup>, Ivón M. Rivera<sup>1</sup>, Stellianna C. Moreno<sup>2</sup>, Maritza E. Alarcón<sup>1</sup> y Ana Lugo-Yarbuh<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Investigaciones Parasitológicas "J.F.Torrealba", Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, <sup>2</sup>Facultad de Medicina, Universidad de los Andes. Mérida 5101, Venezuela.

**Palabras clave:** *Trypanosoma cruzi*, transmisión congénita, rata Wistar, infección aguda.

**Resumen.** Ratas Wistar fueron inoculadas antes del apareamiento con  $1 \times 10^4$  tripomastigotes metacíclicos de las cepas de *T. cruzi* perro (Pr) y humano (YBM). La infección de las madres y crías fue evaluada mediante un estudio parasitológico, inmunológico e histopatológico. Como controles se utilizaron ratas sanas gestantes. Las ratas madres desarrollaron parasitemias entre los 18 y 45 días post-inoculación (pi), y cuatro crías machos (9,1% de madres infectadas con la cepa Pr mostraron altas parasitemias (432 y 240 trips./mm<sup>3</sup> de sangre) a los 30 y 40 días de nacidas. Las 40 restantes y las 52 crías de ratas infectadas con la cepa YBM resultaron negativas al examen de sangre, hemocultivos y xenodiagnósticos. Los niveles de anticuerpos anti-*T. cruzi* en los sueros de las madres fueron siempre mayores que los detectados en las 44/92 (47,8%) crías. En las muestras de líquido amniótico, no se observaron tripomastigotes. El estudio histopatológico del corazón y músculo esquelético de madres infectadas y crías con infección congénita, reveló el establecimiento de una miocarditis y miositis aguda de variable intensidad y extensión, caracterizada por abundante infiltrado linfoplasmohistiocitario asociado en algunos casos con nidos de amastigotes. Las placentas presentaron un moderado infiltrado celular sin parásitos en el estroma vascular. Las crías de madres chagásicas reinoculadas mostraron niveles de parasitemia significativamente menores ( $p < 0,05$ ) que las detectadas en las crías infectadas de madres sanas; a los 60 días pi se evidenció en ambos grupos una miocarditis y miositis con características de cronicidad. Los resultados demuestran de manera evidente que *T. cruzi* es transmitido verticalmente en la rata Wistar a un número reducido de crías; que los anticuerpos maternos anti-*T. cruzi* pueden pasar de la madre y modular la respuesta inmunológica de la prole; y que la patogenicidad

de las cepas de *T. cruzi* juega un papel importante en la transmisión congénita, independientemente del origen y de la región geográfica.

**Vertical transmission of *Trypanosoma cruzi* in Wistar rats during the acute phase of infection.**

*Invest Clín 2003; 44(3): 241 - 254*

**Key words:** *Trypanosoma cruzi*, congenital transmission, Wistar rats, acute infection.

**Abstract.** Research on this form of transmission was carried out on female rats intradermally injected, before mating, with  $1 \times 10^4$  metacyclic trypomastigotes of *T. cruzi* strains from dog (Pr) and human (YBM). The infected rats, as well as their offspring, were given parasitological, immunological and histopathological examinations during and after gestation. Healthy gestating rats were used as controls. Rats infected with *T. cruzi* strains showed clear signs of infection between 18 and 45 days post-inoculation (pi). Of 44 offspring from mothers infected with Pr, 4 males (9.1%) showed high parasitemia (432 and 240 tryps./mm<sup>3</sup> of blood) at 30 and 40 days after birth, while direct blood examination, hemoculture and xenodiagnosis showed no infection in the other 40, or in the 52 offspring of rats infected with YBM. Anti-*T. cruzi* antibodies were found in appreciable quantities in infected mothers and in 44 out of 92 (47.8%) of the offspring, with titers that fluctuated between 1:32 and 1:2048 respectively. Histopathological studies of rats sacrificed at the end of gestation showed acute myocarditis and myositis of varying intensity and extent, characterized by abundant inflammatory infiltrate, in some cases associated with nests of amastigotes. The placentas showed moderate cellular infiltrate without parasites in the vascular stroma and amniotic fluid. The offspring of mothers infected with Chagas' disease were reinoculated and showed an acute phase characterized by low parasitemia ( $p < 0.05$ ); after 60 days, the beginnings of chronic myocarditis and myositis could be observed, of a similar intensity to that observed in offspring born to infected mothers that were subsequently infected. These results confirm that *T. cruzi* can be transmitted vertically in Wistar rats; that a small number of offspring contract chagasic infection congenitally; that anti-*T. cruzi* antibodies can pass from the mother and that these can modify the immune response in the offspring; that the pathogenicity of the strains of *T. cruzi* plays an important role in congenital transmission independently of origin or geographical location.

*Recibido: 26-11-2002. Aceptado: 10-06-2003.*

## INTRODUCCIÓN

Después del descubrimiento de *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico de la tripanosomiasis americana o enfermedad de Chagas, se sugirió que la transmisión del parásito de la madre al feto podía estar ocurriendo congénitamente (1) o a través de la leche materna (2). En 1949, Dao (3) observó, por primera vez en Venezuela, *T. cruzi* en sangre periférica de un niño recién nacido de madre chagásica y, desde entonces, se han publicado numerosos casos en diferentes países de América Latina (4-9), donde la prevalencia de la infección en mujeres embarazadas oscila entre 2 y 51% en centros urbanos y de 23 a 81% en áreas endémicas para la enfermedad de Chagas (10); sin embargo, la significación epidemiológica de estos mecanismos de transmisión no han sido lo suficientemente establecidos.

Recientemente, Bittencourt (11) señaló que la transmisión vertical de la infección chagásica se produce en cualquier fase de la infección materna y sostiene que el riesgo de transmisión de *T. cruzi* es mayor en la fase aguda por la presencia de parásitos circulantes en la madre gestante. Señala la autora que las formas sanguíneas alcanzan al embrión por vía hematogénea, luego del pasaje por un mecanismo activo a través de la placenta. En las células de Hofbauer los tripomastigotes se transforman en amastigotes, los cuales se multiplican activamente y en seguida se transforman hasta ser liberados nuevamente como tripomastigotes, después de la ruptura celular y luego atraviesan el trofoblasto produciendo la infección del feto. Este pasaje, probablemente se debe a una placentitis provocada durante la multiplicación de los parásitos o por la penetración activa hacia la circulación fetal. En algunos casos, los fetos pueden contaminarse al aspirar porciones de líquido amniótico infectado con parásitos (12) o por la vía bucal en

humanos a través de la leche materna durante la lactancia (2, 13).

Mayer y Rocha-Lima (14) formularon la hipótesis de la transmisión placentaria al encontrar nidos de leishmanioses de *T. cruzi* en las placentas de cobayos experimentalmente infectados, sin observar alteraciones en las crías. A partir de ese momento, otras investigaciones han demostrado en animales de laboratorio la transmisión de *T. cruzi* tanto por vía transplacental como durante el amamantamiento a un reducido número de crías, cuando las madres son inoculadas con grandes cantidades de formas sanguíneas. Aunque el espectro patológico observado en las crías con infección congénita es muy parecido al que predomina en el hombre, no se corresponde con lo que realmente ocurre en la naturaleza (15-20).

En este trabajo, se consideró de importancia epidemiológica investigar si la transmisión vertical del parásito se da en el modelo experimental rata albina (*Rattus norvegicus*) cepa Wistar, cuando se inocula por vía intradérmica un número relativamente bajo de tripomastigotes metacíclicos de *T. cruzi* de diferente origen y antes del apareamiento de las ratas. En estos animales el curso de la infección aguda fue seguido durante y después de la gestación mediante un estudio parasitológico, inmunológico e histopatológico en las ratas madres infectadas y en su progenie. Además, se investigó el efecto de una reinoculación homóloga de formas metacíclicas de *T. cruzi* sobre las crías nacidas de madres con infección chagásica aguda.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Cepas de *T. cruzi*

Se utilizaron dos cepas de *T. cruzi*, una obtenida por xenodiagnóstico y hemocultivo a partir de una paciente de 2 años en fase aguda de la enfermedad de Chagas (M/HOM/VE/92/YBM) y la otra de un perro

naturalmente infectado (M/CAN/VE/94/Pr). Ambas cepas, aisladas por el Dr. Nestor Añez, proceden de áreas endémicas para la enfermedad de Chagas, localizadas en el piedemonte oriental de la Cordillera de los Andes en el Estado Barinas, Venezuela, y caracterizadas desde un punto de vista biológico y bioquímico por Moreno y col. (21).

### Grupos experimentales e inoculación

En el presente estudio se usaron un total de 30 ratas Wistar hembras de 3 meses de nacidas y 250 g de peso, las cuales fueron separadas en tres grupos. Dos grupos de 9 animales cada uno fueron inoculados por vía intradérmica (ID), un grupo con aproximadamente  $1 \times 10^4$  tripomastigotes metacíclicos (tpm) de la cepa YBM y el otro con un inóculo similar de formas metacíclicas de la cepa Pr. Los parásitos fueron obtenidos de las excretas postprandiales de ninfas del V estadio de *Rhodnius prolixus*, las cuales habían sido experimentalmente infectadas por ingesta sanguínea sobre ratones NMRI donadores con altas parasitemias infectados con esas cepas. Las excretas fueron homogenizadas en solución fisiológica salina y cuantificadas, siguiendo el método modificado por Brener (22). El tercer grupo de 12 ratas sanas fue utilizado como grupo control. Estos animales fueron inyectados por vía intradérmica con 0,1 mL de solución fisiológica salina.

Entre los 10 y 12 días post-inoculación (pi), a todos los grupos de ratas les fue determinado el ciclo estral, luego fueron apareadas con los machos en una relación de 2 hembras/1 macho por jaula. Las ratas infectadas y las controles sanas ya preñadas, fueron mantenidas en jaulas individuales en el bioterio experimental alimentadas con ratarina comercial y agua *ad libitum*.

### Evaluación parasitológica

En los dos grupos de ratas infectadas con las cepas de *T. cruzi* YBM y Pr, la para-

sitemia fue cuantificada (22) durante el período de gestación y después del parto normal, utilizándose cada vez 5 mm<sup>3</sup> de sangre, extraída con capilares heparinizados por punción del plexo retro-orbital a los 12, 18, 24, 30, 45 y 60 días pi.

Inmediatamente después del parto, 2 ratas madres infectadas con la cepa YBM y dos ratas de las infectadas con la cepa Pr, fueron sacadas de las jaulas sin tocar las crías y sustituidas por ratas sanas recién paridas. A los 30 y 40 días después del nacimiento, a todas las crías se les practicó un examen parasitológico directo en las muestras de sangre obtenida de la cola de cada animal.

### Hemocultivo y xenodiagnóstico

A las crías que resultaron negativas al examen de sangre se les practicaron exámenes parasitológicos indirectos a fin de detectar parasitemias ocultas o subpatentes. Para tal fin, 0,3 mL de sangre obtenida por cardiopuntura de cada animal, fue mezclada con citrato de sodio al 3,8%, esta suspensión sanguínea fue inoculada en tubos con medio de cultivo NNN más solución fisiológica salina como fase líquida. Los hemocultivos, mantenidos en estufa a 26°C, fueron revisados a los 15 y 30 días después de la inoculación.

Para el xenodiagnóstico se utilizó, por cada animal, 10 ninfas del IV estadio de *R. prolixus*; las crías juveniles fueron inmovilizadas por una cubierta de malla de plástico y colocadas sobre un recipiente que contenía en su interior las ninfas. Una vez que las ninfas se alimentaron hasta la repleción, los recipientes con los insectos fueron debidamente identificados y mantenidos a 26°C y 75% humedad relativa en el insectario experimental. A los 30 días después de la ingesta sanguínea los triatomos fueron examinados individualmente, obteniéndose el material fecal por compresión abdominal de cada insecto; las heces fueron homogeniza-

das con solución salina y examinadas al microscopio con el objeto de detectar formas flageladas de *T. cruzi*.

### **Estimación de la respuesta inmune humoral**

Este estudio serológico se efectuó con la finalidad de detectar anticuerpos (Ac) específicos anti-*T. cruzi* en los sueros de las madres infectadas y en su progenie. El suero sanguíneo de cada animal fue obtenido a partir de la sangre, que fue extraída por punción del plexo retro-orbital con capilares heparinizados; la sangre fue mantenida en nevera a 4°C por una hora para permitir su coagulación. Una vez retraído el coágulo, los sueros fueron separados por centrifugación, colocados en viales de plástico y almacenados a -21°C hasta su uso. Los Ac anti-*T. cruzi* fueron detectados en los sueros de las madres infectadas y de las crías juveniles con más de 40 días de nacidas mediante la técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI) (23). El antígeno utilizado correspondió a las formas de cultivo de *T. cruzi* YBM y Pr colectados en fase exponencial de crecimiento en el medio de cultivo NNN.

### **Examen del líquido amniótico y estudio histopatológico**

Se llevó a cabo en 3 ratas inoculadas con la cepa YBM y en 3 ratas con la cepa Pr, con 30 días de infección chagásica y a término de la gestación, y en 2 ratas gestantes sanas. Los animales fueron sacrificados por sobreenestesia con éter dietílico. De cada rata se extrajo cuidadosamente el útero grávido separándolo por debajo del antro, al nivel del fondo de la vagina y extrayendo con él los cuernos uterinos con los fetos y los respectivos oviductos y ovarios. El útero con sus anexos se extendió sobre una cápsula de Petri para ser lavado con solución fisiológica salina, a fin de eliminar los restos de sangre proveniente de las venas uterinas.

Con una pipeta Pasteur se hizo una pequeña insición sobre la membrana uterina a nivel de los fetos y se extrajo una muestra de líquido amniótico la cual fue examinada bajo el microscopio para la búsqueda de tripomastigotes. Las insiciones fueron ampliadas para extraer los fetos con sus placentas.

El corazón cortado frontalmente, fragmentos de músculo esquelético y las placentas de las ratas madres infectadas y controles sanas, fueron fijados en formalina neutra al 10% durante 48 horas e incluidos en Paraplast (Monoject Scientific, St. Louis, MO. USA). Los cortes histológicos de 6  $\mu$ m de espesor de cada uno de los órganos antes mencionados se realizaron en un microtomo American Optical Spencer y se colorearon por el método de Giemsa-Pappenheim-colofonio (24) y hematoxilina-eosina (HE), para evidenciar la infección tisular y las alteraciones histopatológicas. Igualmente, fueron sacrificadas por sobreenestesia con éter dietílico las crías juveniles de 45 días de nacidas provenientes de madres chagásicas, las crías sanas amamantadas sobre ratas infectadas y las crías controles de madres sanas. El corazón completo y fragmentos de la musculatura esquelética fueron procesados para el estudio histopatológico, como se describió antes.

### **Efecto de la reinoculación homóloga con *T. cruzi***

Con el objeto de investigar el posible efecto de la inoculación de parásitos homólogos sobre las crías de madres chagásicas, se utilizó en este experimento 10 ratas machos juveniles de 45 días de nacidas, provenientes de madres infectadas con la cepa Pr de *T. cruzi* y 5 machos juveniles nacidos de madres sanas. Estos animales fueron inoculados por la vía ID con aproximadamente  $1 \times 10^4$  tpm, derivados de ninfas de *R. prolixus*. El curso de la infección aguda en cada uno de los animales inoculados fue seguido mediante la detección de parasitemias pa-

tentes (22) en muestras de 5 mm<sup>3</sup> de sangre obtenida de la cola de cada animal a los 12, 18, 24, 30, 45 y 60 días pi. Las diferencias entre la parasitemia obtenida de las crías nacidas de madres chagásicas y las crías nacidas de madres sanas fueron determinadas por el Test de t de Student. A los 60 días pi, todos los animales fueron sacrificados por sobreenestesia con éter dietílico y el corazón completo y fragmentos de músculo esquelético fueron removidos y procesados para el estudio histopatológico en cortes coloreados con Giemsa-Colofonio y HE.

## RESULTADOS

### Evaluación parasitológica de las ratas madres

Los exámenes parasitológicos directos realizados a las muestras de sangre de las 12 ratas infectadas con las cepas YBM y Pr de *T. cruzi* durante el curso de la infección aguda y en el período de gestación, revelaron parasitemias patentes entre los 18 y 45 días pi, detectándose a los 24 y 30 días pi (12 y 18 días de la gestación) niveles de parasitemias de hasta  $28 \pm 5$  trips./mm<sup>3</sup> de sangre en las ratas infectadas con la cepa Pr y  $17 \pm 3$  trips./mm<sup>3</sup> de sangre en las inoculadas con la cepa YBM. En la observa-

ción correspondiente a los 45 días pi, se constató una disminución en los niveles de la parasitemia y solamente dos ratas infectadas con la cepa Pr presentaron una muy baja parasitemia de  $2 \pm 1$  trips./mm<sup>3</sup> de sangre. En las muestras de sangre revisadas a los 60 días pi no se observaron parásitos (Fig. 1).

### Evaluación parasitológica de las crías

Los exámenes de sangre realizados a las crías a los 30 días y a los 40 días de nacidas, mostraron un número relativamente escaso de animales infectados. Cuatro crías machos (9,1%) de un total de 44 (19 machos y 25 hembras) provenientes de ratas inoculadas con la cepa Pr y amamantadas hasta el destete por sus madres biológicas, presentaron parasitemias patentes en niveles que oscilaron entre 432 y 240 trips./mm<sup>3</sup> de sangre, mientras que en las 40 crías restantes y las 13 crías de madres sanas (6 machos y 7 hembras) que fueron amamantadas sobre madres infectadas, no se evidenció presencia de parásitos en la sangre. Los exámenes de sangre efectuados a las 52 crías juveniles (24 machos y 28 hembras) provenientes de las ratas infectadas con la cepa YBM y amamantadas hasta el destete por sus madres biológicas y por nodrizas, y las 12 crías de madres

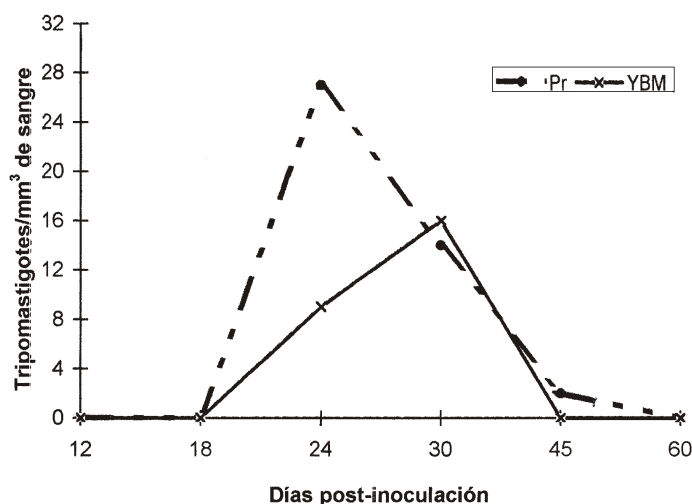


Fig. 1. Curvas de parasitemia en ratas infectadas con *Trypanosoma cruzi*.

sanas (5 machos y 7 hembras) amamantadas por las madres infectadas, resultaron negativas.

En los hemocultivos y xenodiagnósticos realizados a las 117 crías juveniles provenientes de ambos grupos de ratas infectadas y sanas amamantadas por madres infectadas, no se detectaron formas flageladas de *T. cruzi* (Tabla I).

#### Evaluación de la respuesta inmune humoral

Ac específicos anti-*T. cruzi* fueron apreciados en el 100% de los sueros de las ratas infectadas con cada una de las cepas de parásitos. Los títulos oscilaron entre

1:256 y 1:2048. En la progenie, los Ac anti-*T. cruzi* fueron detectados en el 43,2% (19/44) de los sueros obtenidos de las crías de madres infectadas con la cepa Pr y en el 44,2% (23/52) de los sueros separados de las crías provenientes de ratas infectadas con la cepa YBM; en ambos grupos de crías los títulos variaron entre 1:32 a 1:512. Igualmente, el 41,7% (5/12) y el 46,2% (6/13) de los sueros de las crías de madres sanas que fueron amamantadas por ratas infectadas con la cepas Pr y YBM, mostraron discretos niveles de Ac que oscilaron entre 1:16 y 1:64. Los sueros procedentes de las ratas sanas y de sus crías no presentaron reactividad (Tabla II).

**TABLA I**  
PARÁMETROS BIOLÓGICOS EVALUADOS EN LAS RATAS WISTAR INOCULADAS CON FORMAS METACÍCLICAS DE *T. cruzi* Y EN SU DESCENDENCIA

Parámetros	Cepas de <i>T. cruzi</i>	
	YBM	Pr
N de ratas infectadas	9	9
Parasitemia en las ratas infectadas	17 ± 3 (trips./mm <sup>3</sup> )	28 ± 5 trips./mm <sup>3</sup> )
N de ratas con parto normal	6/9	6/9
N total de crías	52 (24 m y 28 h)	44 (19 m y 25 h)
N total de crías sanas amamantadas por mch*	12 (5 m y 7 h)	13 (6 m y 7 h)
Parasitemia en las crías de mch	0/52	4/44 (9,1%)
Parasitemia en las crías de ms** amamantadas por mch	0/12	0/13
Positividad de los hemocultivos	0/64	0/53
Positividad de los xenodiagnósticos	0/64	0/53

trips. = tripomastigotes. \*mch = madres chagásicas. \*\*ms = madres sanas. m = machos; h = hembras.

**TABLA II**  
VARIACIÓN EN LOS TÍTULOS DE ANTICUERPOS (Ac) ANTI-*T. cruzi* EN RATAS GESTANTES INFECTADAS Y EN SU PROGENIE

	Cepas de <i>T. cruzi</i>		Títulos de Ac
	YBM	Pr	
N total de ratas gestantes	9 (100%)	9 (100%)	1:256 - 1:2048
N total de crías nacidas de mch*	52 (44,2%)	44 (43,2%)	1:32 - 1:512
N total de crías nacidas de ms**	12 (41,7%)	13 (46,2%)	1:16 - 1:64

\* mch = madres chagásicas. \*\* ms = amamantadas por madres chagásicas. # IFI = Inmunofluorescencia Indirecta.

### Evaluación parasitológica del líquido amniótico

El examen directo de las muestras de líquido amniótico, obtenidas del saco uterino de las ratas madres infectadas con las cepas YBM y Pr de *T. cruzi* y sacrificadas a término de la gestación, no mostraron parásitos.

### Alteraciones histopatológicas

El estudio histopatológico de los cortes de corazón y de los fragmentos del músculo esquelético de las ratas chagásicas sacrificadas a término de la gestación, así como de los tejidos obtenidos de las crías con infección chagásica congénita, reveló moderada miocarditis y miositis aguda de variable intensidad, con áreas de inflamación focalizadas de naturaleza linfoplasmohistiocitario y discreta parasitosis en la masa muscular (Fig. 2AB). El examen microscópico de los cortes de las placentas no mostró parasitismo en las células trofoblásticas ni alteraciones histopatológicas apreciables, sólo se observaron focos inflamatorios agudos a nivel de las vellosidades, constituyendo cuadros de vellositis de variable intensidad. Algunos cortes del corazón y músculo esquelético de las 82 crías juveniles, nacidas de madres chagásicas y de las 25 crías de madres sanas amamantadas por madres infectadas, mostraron discretos focos inflamatorios y ausencia de parasitismo tisular. Los cortes del corazón, músculo esquelético y las placentas de madres sanas no presentaron alteraciones histopatológicas.

### Evaluación de la reinoculación homóloga en las crías

El seguimiento del curso de la infección en las crías nacidas de madres con infección chagásica aguda y reinoculadas con formas metacíclicas de *T. cruzi* Pr, mostró infecciones patentes evidenciadas por la presencia de parásitos en la sangre de estos animales entre los 18 y 45 días pi. A partir

de los 24 días pi, los niveles de parasitemia de las crías infectadas provenientes de madres chagásicas fueron significativamente menores que los detectados en las crías infectadas nacidas de madres sanas ( $p < 0.05$ ) (Fig. 3). A los 60 días pi, el estudio histopatológico del corazón y fragmentos de músculo esquelético de las crías reinoculadas con *T. cruzi*, reveló ausencia de parasitismo, presencia de epicarditis focal, destrucción de algunos vasos sanguíneos, fibras musculares con hialinización y formación de fibrosis, originado así una miocarditis y miositis con características de cronicidad similar en intensidad y extensión a la observada en las crías nacidas de madres sanas que fueron infectadas.

### DISCUSIÓN

La rata albina (*R. norvegicus*) como modelo experimental ha sido ampliamente utilizada en el estudio de la infección chagásica y siendo un animal susceptible a la infección por *T. cruzi*, desarrolla una miocarditis aguda con intensa parasitosis cardíaca, alta parasitemia y mortalidad nula, pasando luego a una fase de latencia con sobrevida comparable a la de los controles normales (25, 26).

Las investigaciones experimentales sobre la transmisión congénita de *T. cruzi* en estos animales fueron iniciadas por Apt y col. (27), quienes informaron que a pesar de obtener infección en las ratas madres, no observaron infección congénita en sus crías, lo que podría deberse a la resistencia natural de la rata a la infección por *T. cruzi*. Shaw y Quadagno (28) señalan que en ratas hembras gestantes, la infección por *T. cruzi* causa poco o ningún efecto sobre la capacidad reproductiva y las ratas chagásicas pueden parir crías aparentemente normales. En este mismo orden de ideas, investigaciones más recientes llevadas a cabo por Dávila y col. (18) en ratas endogámicas



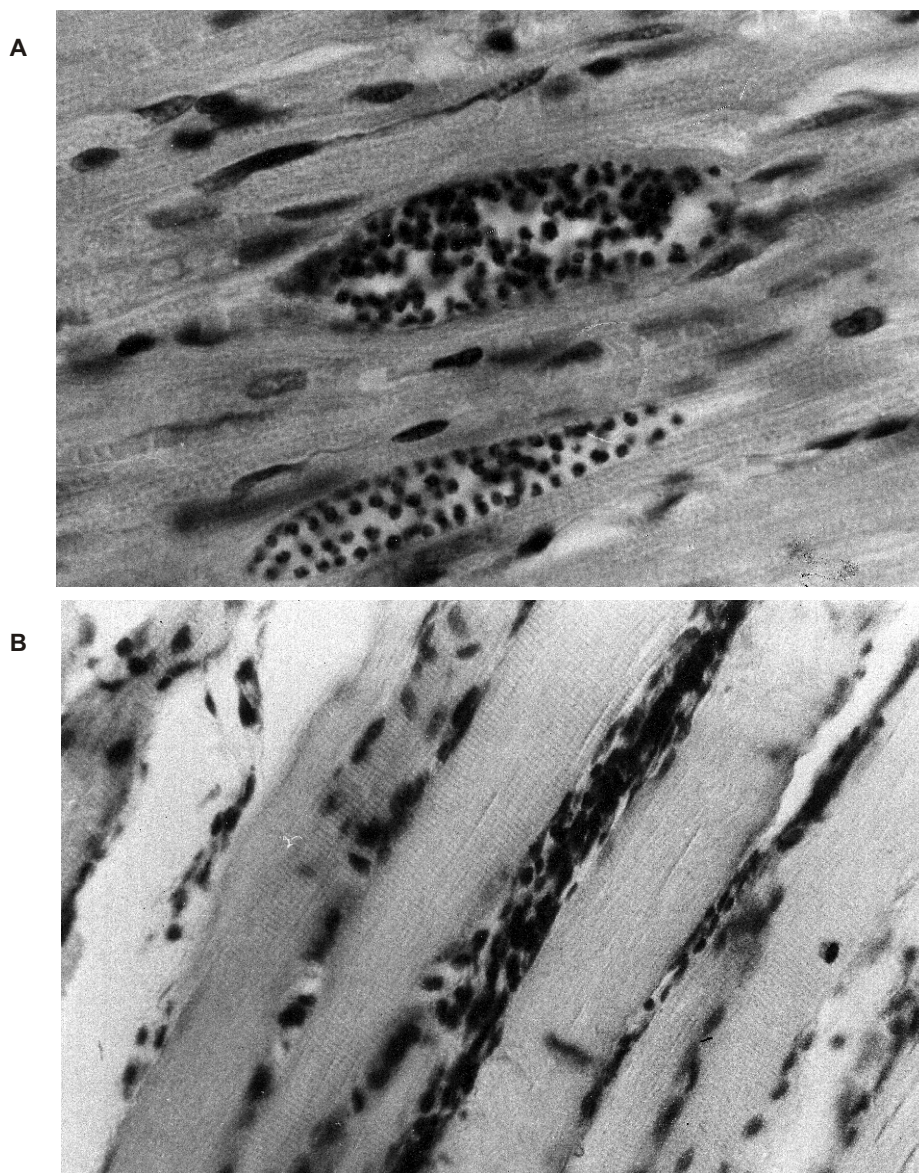


Fig. 2. Lesiones histopatológicas en ratas Wistar juveniles infectadas congénitamente con *Trypanosoma cruzi* Pr. A.- Nidos de amastigotes en el miocardio y áreas de inflamación focalizadas de naturaleza mononuclear. B.- Miositis aguda focal de moderada intensidad (Giemsa-Colofonio, 1000X, 400X).

infectadas con  $1 \times 10^6$  tripomastigotes sanguícolas de *T. cruzi* durante la gestación, demostraron que 5/67 (7,5%) de las crías procedentes de madres infectadas presentaban parasitemias patentes y 5/15 hemocultivos obtenidos de crías estaban positivos, concluyendo que la transmisión materna ocurre en este modelo animal. Por otro

lado, en ratones C3H (29) y monos (30) también se ha observado transmisión congénita a un número reducido de crías.

En el presente trabajo se demuestra que la inoculación de un número relativamente bajo de formas metacíclicas de *T. cruzi* de diferente origen, por la vía ID, produce infecciones de variable intensidad en

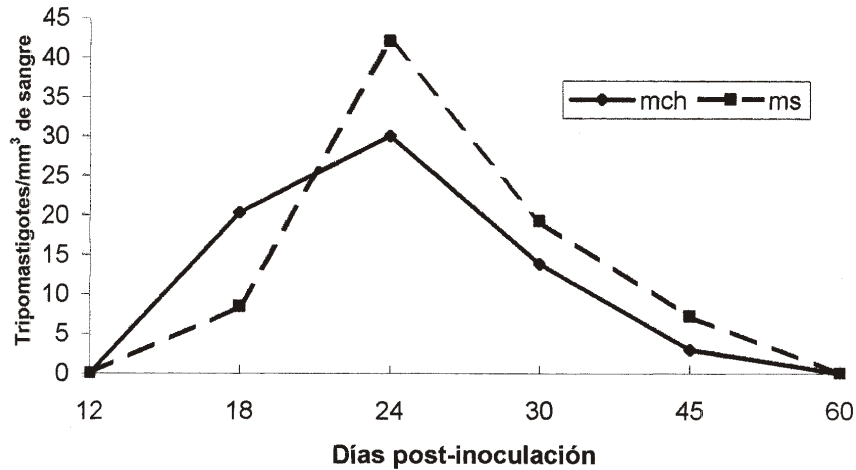


Fig. 3. Curvas de parasitemia en ratas juveniles reinoculadas con *Trypanosoma cruzi* Pr. (mch: crías de madres chagásicas reinoculadas; ms: crías de madres sanas infectadas).

el modelo experimental rata Wistar, caracterizada por bajas parasitemias, apreciables títulos de Ac anti-*T. cruzi* y moderadas alteraciones histopatológicas en el corazón, músculo esquelético y placentas de las ratas sacrificadas a término de la gestación. En las crías nacidas y amamantadas por las madres biológicas infectadas con la cepa Pr de *T. cruzi*, se evidenció la transmisión transplacentaria del parásito a un número significativo de crías machos (9,1%), mientras que las crías provenientes de madres infectadas con la cepa YBM de *T. cruzi* de origen humano, resultaron negativas, a pesar de ser considerada por Moreno y col. (21) como una cepa de alta virulencia y patogenicidad. Estos resultados confirman las observaciones publicadas por Andrade y col. (31) y Delgado y Santos-Buch (17), quienes señalaron que cepas de *T. cruzi* de diferente origen, presentan distinto tropismo por la placenta, por lo que la transmisión congénita depende de la cepa del parásito y de la capacidad fagocítica de los macrófagos de las vellosidades placentarias. La virulencia y patogenicidad de las cepas de *T. cruzi* juega un papel importante en la transmisión congénita, independientemente del origen y de la región geográfica (17, 31).

La leche materna ha sido considerada como un posible vehículo del agente causal de la infección chagásica en humanos (2, 13) y en animales experimentales (19, 20). Sin embargo Bittencourt y col. (32) concluyeron que la transmisión de *T. cruzi* a través de la lactancia raramente ocurre aún en casos con enfermedad de Chagas agudo. Miles (20) también reportó que la transmisión de *T. cruzi* por la leche materna es extremadamente rara, debido a la dificultad de la transmisión oral. Tal aseveración ha sido corroborada por Pinto y col. (33) quienes, estudiando la transmisión congénita de la infección chagásica en ratones, no encontraron evidencias del pasaje de *T. cruzi* a través de la lactancia. En este trabajo, las crías de madres sanas que fueron amamantadas hasta el destete por ratas chagásicas, no presentaron infecciones patentes evidenciables por los métodos de diagnóstico parasitológico utilizados, lo que confirma las observaciones señaladas por estos investigadores.

En humanos como en animales experimentales con infección chagásica se han observado anticuerpos específicos anti-*T. cruzi* (25, 26, 34, 35). En este estudio, utilizando la técnica de inmunofluorescencia

indirecta, se detectaron anticuerpos anti-*T. cruzi* en el 100% de los sueros de las ratas madres infectadas con las cepas Pr y YBM de *T. cruzi*, y en el 43,2% y 44,2% de su progeñie. Este hallazgo, confirmaría el pasaje de anticuerpos maternos anti-*T. cruzi* vía transplacentar y a través de la leche a su descendencia. Investigaciones llevadas a cabo en ratones y ratas nacidos de madres chagásicas, demostraron que los anticuerpos maternos transmitidos durante la gestación y a través de la lactación le confieren protección parcial contra infecciones por *T. cruzi* (29, 36, 37).

El examen directo de las muestras de líquido amniótico obtenidas del saco uterino de las ratas con infección chagásica aguda no mostraron tripomastigotes, sin embargo, no se descarta la presencia de formas flageladas en este medio. Nilo y col. (38) describen el hallazgo de tripomastigotes en estudio citoquímico de líquido amniótico de una mujer múltipara cursando un embarazo fisiológico de 32 semanas de gestación, con ruptura prematura de membranas y síntoma de parto prematuro. Estas observaciones han sido recientemente corroboradas en este laboratorio (EAM, observaciones no publicadas) al examinar el líquido amniótico de ratones NMRI con infección chagásica aguda y a término de la gestación. El hallazgo de tripomastigotes en el líquido amniótico es un hecho importante que diagnostica la infección chagásica congénita (12, 38).

Las alteraciones histopatológicas en los tejidos de las ratas chagásicas sacrificadas a término de la gestación y en las crías con infección chagásica congénita fueron similares. Se observó invasión temprana de parásitos al corazón y musculatura esquelética, instauración de una miocarditis y miositis aguda de intensidad variable con el establecimiento de un proceso inflamatorio de naturaleza linfoplasmohistiocitario focal y/o difuso acompañado en algunos casos de

nidos de parásitos; tales hallazgos coinciden con los resultados publicados por Scorza (25) y Moreno y col. (26). Ninguno de los cortes histológicos de las placentas examinadas mostraron pseudoquistes o parásitos aislados, solamente se pudo apreciar un moderado infiltrado celular y algunas células gigantes. No obstante, la presencia de tripomastigotes sanguícolas en algunas crías de madres con infección chagásica aguda, demuestra que los parásitos alcanzaron los fetos por vía hematogena desde su pasaje a través de la placenta. Carraro-Abrahão y col. (39) han observado en placentas de ratones suizos infectados con la cepa RAL de *T. cruzi*, un intenso parasitismo y grandes nidos de amastigotes en el citoplasma de las células gigantes. En placentas humanas se ha reportado la presencia de una placentitis chagásica con las vellosidades del epitelio trofoblástico necrotizado, con 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* y nidación placentaria sin infección fetal (11, 40).

Los resultados de éste trabajo demostraron de manera evidente la transmisión transplacentaria de *T. cruzi* a un reducido número de crías de ratas Wistar cuyas madres fueron inoculadas con la cepa Pr. Por el contrario las crías de las madres infectadas con la cepa YBM no mostraron transmisión vertical, evidenciándose la variabilidad biológica de las diferentes cepas de *T. cruzi* como ha sido mostrado en la literatura. Recientemente se han utilizado técnicas moleculares para demostrar que diferentes cepas y clones de *T. cruzi* presentan diferencias en tropismo hacia los tejidos del hospedador vertebrado, estos autores han formulado el "modelo clonal histotrópico" para la patogénesis de la enfermedad de Chagas

(41-43). De conformidad con lo anterior la cepa Pr de *T. cruzi* tendría mayor tropismo placentario, mientras que la cepa YBM tendría un bajo o inexistente tropismo placentario, lo cual explicaría la diferencia en la transmisión vertical en los dos grupos de ratas estudiados.

En cuanto al efecto de la reinoculación homóloga de *T. cruzi* Pr sobre las crías nacidas de madres infectadas, los resultados mostraron cierta resistencia en el desarrollo de la infección aguda, la cual fue evidenciada en parte por los bajos niveles de parasitemia registrados. El estudio histopatológico de los corazones y fragmentos de la musculatura esquelética, reveló la implantación de una miocarditis y miositis con característica de cronicidad similar en intensidad y extensión a la observada en las crías controles infectadas. Estos hallazgos concuerdan con la opinión de varios autores en el sentido de que los anticuerpos maternos anti-*T. cruzi* transferidos por vía transplacentar y por la leche materna, le confieren a la progenie un cierto grado de protección contra las infecciones por *T. cruzi* (28, 29, 36, 37).

Finalmente se concluye que la asociación rata Wistar-*T. cruzi*, es un modelo experimental adecuado para reproducir el cuadro evolutivo de la transmisión congénita de la enfermedad de Chagas.

#### 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-909-98-03A; C-910-98-03C; C-1011-00 - 03A, C-1012-00-03B y C-1049-00-03C. Al Insecuario de Cría "Dr. Herman Lent" del Departamento de Biología de la Facultad de Ciencias, por el suministro de las ninfas de *R. prolixus*. Al Prof. Iane Woodward del Departamento de Idiomas, Facultad de Humanidades

y Educación de la Universidad de los Andes.

#### REFERENCIAS

1. **Chagas C.** Nova entidade morbida do homem. Resumo geral dos estudos etiológicos e clínicos. Mem Inst Oswaldo Cruz 1911; 3: 219.
2. **Mazza S, Montaña A, Benitez C, Janzi EZ.** Transmisión de *Schizotrypanum cruzi* al niño por leche de la madre con enfermedad de Chagas Mis Est Pat Reg Arg 1936; 28:41-46.
3. **Dao L.** Otros casos de enfermedad de Chagas en el Estado Guárico (Venezuela): formas agudas y crónicas; observación sobre enfermedad de Chagas congénita. Rev Policlín Caracas 1949; 17:17-32.
4. **Pifano F.** Algunos aspectos de la enfermedad de Chagas en Venezuela. Arch Venez Med Trop Parast Med 1960; 3:73-99.
5. **Howard J E.** Enfermedad de Chagas congénita. Bol Chil Parasitol 1957; 12:42.
6. **Bittencourt A L.** Incidência da transmissão congénita da doença de Chagas em abortos. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 1972; 14:257-259.
7. **Schmuñis GA, Szarfman A.** La enfermedad de Chagas congénita. Medicina (B. Aires) 1977; 37:47-53.
8. **Azogue EC, La Fuente C, Darras CH.** Congenital Chagas' disease in Bolivia: epidemiological aspects and pathological findings. Trans R Soc Trop Med Hyg 1985; 79: 176-180.
9. **Ponce C, Ponce E.** Transmisión congénita de la enfermedad de Chagas en Honduras. Parasitología al Día 1995; 19:199.
10. **Bittencourt AL.** Possible risk factors for vertical transmission of Chagas' disease. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 1992; 34:403-408.
11. **Bittencourt AL.** Transmissão Vertical da Doença de Chagas: en Brener Z., Andrade Z.A., Barral- Netto M. Eds: *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas, 2.<sup>a</sup> Edição. Guanabara Koogan., 2000. p. 16.
12. **Bittencourt AL, Freitas LA, Araujo MOG, Jakomo K.** Pneumonitis in congenital

- Chagas disease. A study of 10 cases. Am J Trop Med Hyg 1981; 30:38-42.
13. **Medina-Lopes MD, Macedo V.** *Trypanosoma cruzi* no calostro humanos. Rev Soc Bras Med Trop 1983; 16:170.
  14. **Mayer M, Rocha-Lima H.** Zum Verhalten von *Schizotrypanum cruzi* in warm blutern und Arthropoden. Arch F U Schiffs -u Tropenhyg 1914; 18: 257-292.
  15. **Villela EA.** A transmissão intrauterina da molestia de Chagas. Encefalite congenita pelo *Trypanosoma cruzi*. Folha Med 1923; 4:41-43.
  16. **Mazza S.** Frecuencia e importancia de la infección natural en perros y gatos por *Trypanosoma cruzi* y cuestión de la herencia del mismo en los primeros animales. 1er. Tomo. Enfermedad de Chagas. Buenos Aires, Argentina: Imp Universidad 1936. p. 412.
  17. **Delgado MA, Santos-Buch CHA.** Transplacental transmission and fetal parasitosis of *Trypanosoma cruzi* in outbred white Swiss mice. Am J Trop Med Hyg 1978; 27:1108-1115.
  18. **Davila HO, Revelli SS, Moreno HS, Valenti JL, Musso C, Poli HO, Morcini JC, Bottasso HO.** Infection with *Trypanosoma cruzi* during pregnancy in rats and a decrease in chronic myocardial lesions in their infected offspring. Am J Trop Med Hyg 1994; 50: 506-511.
  19. **Nattan-Larrier L.** Sur le passage des trypanosomes dans le lait. Rev Pathol Comp Hyg Gen 1913; 3:282-285.
  20. **Miles MA.** *Trypanosoma cruzi* milk transmission of infection and immunity from mother to young. Parasitology 1972; 65:1-9.
  21. **Moreno EA, Gonzalez N, Guillen B, Rivera I, Alarcon ME, Lugo de YA, Añez N.** Biological and isoenzyme characteristics of venezuelan strains of *Trypanosoma cruzi*. Am J Trop Med Hyg 1997; 57 (Suppl. 3): 155.
  22. **Brener Z.** Observações sobre a imunidade e as superinfecciones em camundongos experimentalmente inoculados com *Trypanosoma cruzi* e submetidos a tratamento. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 1962; 4: 119-123.
  23. **Camargo ME.** Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of american trypanosomiasis, technical modification employing preserved culture forms of *Trypanosoma cruzi*. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 1966; 8: 227-234.
  24. **Bray R, Garnham PCC.** The Giemsa colophonium method for staining protozoa in tissue section. Indian J Malariol 1962; 16: 152-155.
  25. **Scorza C.** 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, Facultad de Ciencias, Universidad de los Andes, Venezuela 1982.
  26. **Moreno EA, González N, Scorza C, Lugo de YA, Añez N.** Efecto de inóculos bajos en la infección experimental por *Trypanosoma cruzi*. Bol Dir Malariol San Amb 1999; 39: 1-9.
  27. **Apt W, Naquira C, Tejada A, Strozzi L.** Transmisión congénita del *Trypanosoma cruzi*. II. En ratas con infección aguda y crónica. Bol Chil Parasitol 1967; 23:9-15.
  28. **Shaw GL, Quadagno D.** *Trypanosoma lewisi* and *T. cruzi*: Effect of infection on gestation in the rat. Exp Parasitol 1975; 37:211-217.
  29. **Marques de Araujo S, Chiari E.** *Trypanosoma cruzi* infection in offspring born to chagasic C<sub>3</sub>H/He mice mothers. Mem Inst Oswaldo Cruz 1996; 91: 211-216.
  30. **Sullivan JJ, Bishop HS, Klippel-Means L, Rock L, Ware D.** Congenitally transmitted *Trypanosoma cruzi* among laboratory-reared offspring of naturally infected squirrel monkeys. Am J Trop Med Hyg 1994; 51:170.
  31. **Andrade SG.** The influence of the strain of *Trypanosoma cruzi* in placental infections in mice. Trans R Soc Trop Med Hyg 1982; 76:123-128.
  32. **Bittencourt AL, Sadigursky M, Silva A, Menezes CA, Marianetti MM, Guerra SC, Sherlock I.** Evaluation of Chagas' disease transmission through breast-feeding. Mem Inst Oswaldo Cruz 1988; 83:37-39.

33. **Pinto PLS, Campos R, Santana EJ, Moreira AAB, Amato-Neto V, Duarte MYS, Tiago G G.** Estudio experimental sobre a transmissão da doença de Chagas por meio do leite. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 1989; 31(supl.7). S15.
34. **Brener Z, Krettli AU.** Immunology of Chagas' disease. In *Modern Parasite Biology: Celular, Immunological and Molecular aspects*. DE. D. J - Wyler, W. H. Freedman & Co. New York, USA 1990; 247-256.
35. **Lana M, Vieira LM, Machado-Cohelo L, Chiari E, Velos VM, Tafuri WM.** Humoral immune response in dogs experimentaly infected with *Trypanosoma cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1991; 86: 471-473.
36. **Carlier Y, Rivera MT, Truyen C, Ontivero M, Flament J, Van Marek E, Maertelaer V.** Chagas' disease: decreased resistance to *Trypanosoma cruzi* acquired infection in offspring of infected mice. *Am J Trop Med Hyg* 1992; 46:116- 122.
37. **Kolodny MH.** The transmission of immunity in experimental trypanosomiasis (*Trypanosoma cruzi*) from mother rats to their offspring. *Am J Hyg* 1939; 30:19-39.
38. **Nilo ME, Alvarado J, Ramirez M, Espejo E.** Hallazgo de tripomastigoto en estudio citoquímico de líquido amniótico. *Parasitología al día* 2000; 24: 49-51.
39. **Carrarao-Abrahão AA, Lopes RA, Salas MA, Ribeiro RD, Prado JrJC, Albuquerque S, Garcia TAR.** Placental alterations of Swiss mice infected with RAL strain of *Trypanosoma cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2000; 95 (suppl. II): 122.
40. **Salfelder K.** Las Protozoonosis en el hombre. (Atlas a color). Caracas, Venezuela: 1° Ed. Oscar Todtmann Editores C.A. 1985. p. 28.
41. **Vago AR, Andrade LO, Leite AA, d'Ávila Reis D, Macedo AM, Adad SJ, Tostes SJr, Moreira MCV, Philo GB, Pena SDJ.** 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* 2000; 156(5): 1805-1809.
42. **Vago AR, Macedo AM, Oliveira RP, Andrade LO, Chiari E, Galvão LMC, d'Ávila Reis D, Pereira MES, Simpson AJG, Tostes S, Pena SDJ.** Kinetoplast DNA signatures of *Trypanosoma cruzi* strains obtained directly from infected tissues. *Am J Pathol* 1996; 149(6):2153-2159.
43. **Macedo AM, Oliveira RP, Pena SDJ.** Chagas disease: role of parasite genetic variation in pathogenesis. *Exp. Rev. Mol. Med.* 5 March, 2002. <http://www-ermm.ebcu.cam.ac.uk/02114118h.htm>