

EFFECTOS DE LA INFECCIÓN CHAGÁSICA AGUDA EN RATAS WISTAR GESTANTES

Effects of Acute Chagasic Infection on Gestating Wistar Rats

Elio A. Moreno^{1*}, María A. Araujo¹, Maritza E. Alarcón¹, Ana Lugo de Yarbuh¹, Sonia Araujo¹ y Rafael Borges²

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

²Departamento de Estadística, Facultad de Economía.

Universidad de los Andes. Mérida 5101, Venezuela. Teléf. 0274-2401244, Fax: 0274-2401286. E-mail: emorenob@ula.ve

RESUMEN

Se investiga en ratas albinas (*Rattus norvegicus*), cepa Wistar, inoculadas por vía intraperitoneal con 5×10^4 tripomastigotes sanguíneos de *Trypanosoma cruzi*, y preñadas 10 días después de la inoculación, los efectos de la infección aguda sobre la gestación, utilizando diferentes pruebas de diagnóstico. Los resultados revelaron diferencias significativas ($P < 0,01$) entre los valores de parasitemia promedio de los grupos de ratas vírgenes B y ratas gestantes D, durante la primera y segunda semana de gestación, registrándose a los 12 días de la gravidez niveles de parasitemias de hasta 55 ± 3 y 27 ± 9 trips/mm³ de sangre. Anticuerpos anti-*T. cruzi* fueron detectados en los sueros de las ratas infectadas, mostrando diferencias significativas ($P < 0,05$) cuando se compara la interacción grupo-tiempo. Presencia de formas flageladas de *T. cruzi* en los tubos de cultivo inoculados con líquido amniótico de 3 (50%) de 6 ratas sacrificadas a término de gestación. Instauración de una miocarditis y miositis aguda de variable intensidad acompañada de nidos de amastigotes de *T. cruzi* a nivel del corazón, músculo esquelético y fibras musculares lisas del útero grávido. Las placentas mostraron una placentitis moderada sin parasitismo a nivel del estroma veloso, placas coriónica y desidual. Las glándulas mamarias presentaron un infiltrado celular discreto sin parasitosis en los alveólos, conductos excretores y tejido conectivo inter e intralobulillar. Las células alveolares exhibieron un citoplasma basofílico y abundante secreción. El análisis morfométrico, reveló diferencias significativas ($P < 0,01$) en el tamaño de fetos y placentas obtenidos de ratas infectadas D y controles sanas C. La infección chagásica aguda produjo en la rata gestante alteraciones parasitológicas, inmunológicas, histopatológicas y morfométricas importantes, las cuales fueron potenciadas por los efectos paralelos inducidos por la gravi-

dez; la presencia de formas flageladas de *T. cruzi* en el líquido amniótico diagnostica la infección fetal congénita; *T. cruzi* no causó interrupción de la gestación y los fetos a término de la gravidez fueron aparentemente normales.

Palabras clave: *Trypanosoma cruzi*, infección chagásica, rata, gestación.

ABSTRACT

White Wistar rats (*Rattus norvegicus*) were intraperitoneally inoculated with 5×10^4 blood form trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* and impregnated 10 days after inoculation. The effects of acute infection on gestation were examined using different diagnostic tests. Results showed significant differences ($P < 0.01$) level in parasitemia values between group B virgin rats and group D gestating rats, during the first and second week, with levels of parasitemias 12 days after impregnation of 55 ± 3 and 27 ± 9 tryps/mm³. Anti-*T. cruzi* antibodies were found in the serum of infected rats, showing differences ($P < 0.05$) level comparing group-time interaction. Flagellate forms of *T. cruzi* were present in culture tubes inoculated with amniotic fluid from 3 (50%) of 6 rats sacrificed at the end of gestation. There was also myocarditis and acute myositis of varying intensity accompanied by many nest of *T. cruzi* amastigotes around the heart, in skeletal muscle and smooth muscle fiber in the gravid uterus. There was moderate placentitis without parasitism in the villous stroma and chorionic and decidua plates. Mammary glands showed discrete cellular infiltrate without parasitosis in the alveoli, excretory ducts and in inter and intralobular connective tissue. Alveolar cells showed basophilic cytoplasm and abundant secretion. Morphometric analysis of fetuses and placenta from infected rats D and healthy controls C showed significant differences ($P < 0.01$) level in size and weight. In conclusion, the gestating rats acute chagasic infection produces important parasitological, immunological,

histopathological and morphometric changes: these are exacerbated by the concurrent effects of pregnancy. Flagellate forms of *T. cruzi* in the amniotic liquid are evidence of congenital fetal infection. *T. cruzi* did not interfere with gestation and at term of pregnancy the fetuses were apparently normal.

Key words: *Trypanosoma cruzi*, chagasic infection, rat, gestation.

INTRODUCCIÓN

La tripanosomiasis americana es una infección causada por *Trypanosoma cruzi*, protozooario perteneciente al Orden Kinetoplastida, Familia Trypanosomatidae. El hombre se infecta por contaminación con las formas metacíclicas del parásito contenidas en las heces postprandiales de numerosas especies de hemípteros de la subfamilia Triatominae [13]. En algunos casos la infección chagásica se produce de la madre al hijo durante el embarazo, otras veces a través de transfusiones de sangre, trasplantes de órganos, accidentes en el laboratorio y por las vías sexual y oral [2, 5, 22]. En general, la infección se inicia con una fase aguda con síntomas no específicos y con parasitemias patentes, seguida por una fase latente o indeterminada asintomática, con serología positiva que puede durar toda la vida y un 20 a 30% de los individuos infectados evolucionan a una fase crónica progresiva, desarrollando la cardiopatía chagásica y/o lesiones digestivas irreversibles [40].

La transmisión vertical de *T. cruzi* puede ocurrir en cualquier fase de la enfermedad maternal, aunque el riesgo es mayor en la fase aguda de la infección por el gran número de parásitos circulantes en la sangre [4]. La infección chagásica causa en el feto retardo en el crecimiento intrauterino, prematuridad, hepato y esplenomegalia, compromiso variable del sistema nervioso central, el miocardio, deformaciones, abortos, mortinatos y en algunos casos es asintomática [5]. La placenta presenta una placentitis chagásica con las vellosidades del epitelio trofoblástico necrotizado, intenso parasitismo y células inflamatorias abundantes [5, 35].

En animales experimentalmente infectados con *T. cruzi*, no se ha demostrado que la infección sea una causa de aborto. No obstante, se han observado nidos de amastigotes en las placentas de cobayos infectados con *T. cruzi* sin producir alteraciones en las crías [18]; transmisión transplacentaria de *T. cruzi* en perras preñadas con infección experimental aguda y crónica, observándose parasitemias patentes y nidos de amastigotes en diferentes órganos de algunas crías [36]; intenso parasitismo en el endometrio y placentas de ratones infectados con *T. cruzi*, pero nunca en tejidos embrionarios y fetales [9,25]; presencia de amastigotes en las glándulas mamarias de ratones infectados con *T. cruzi* [31]; transmisión transplacentaria y mantenimiento de la capacidad reproductiva en ratas y ratones con infección chagásica [11, 15, 24, 34]. Recientemente, Moreno y Quintero [26] estudiando ratas Wistar gestantes crónicamente infectadas con *T. cruzi*, encontraron nidos

de amastigotes a nivel de la musculatura cardíaca, esquelética y en el estroma de una placenta, asociados a una discreta miocarditis, miositis y vellositis con características de cronicidad. Señalan los autores que la presencia de formas amastigotas en la placenta sugiere la posibilidad de transmisión transplacentaria del parásito al feto en esta fase de la infección chagásica.

El objetivo de este trabajo fue investigar los efectos de la infección chagásica aguda sobre el modelo experimental rata Wistar (*Rattus norvegicus*) durante el período de gestación, mediante un estudio: parasitológico, inmunológico e histopatológico en las ratas sacrificadas a término de la gravidez, así como un estudio morfométrico en los fetos y placentas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Parásitos

Se utilizó la cepa Y de *T. cruzi* de referencia internacional (M/HOM/BR/53/Y) aislada por Pereira da Silva y Nussen-zweig [30], mediante xenodiagnóstico realizado a un paciente en la fase aguda de la enfermedad de Chagas y cedida por la Cátedra de Parasitología de la Universidad de Carabobo. Los parásitos han sido mantenidos en el laboratorio de Parasitología Experimental a través de pasajes sucesivos en medios de cultivo *in vitro*, triatominos (*Rodnius prolixus*) y ratones NMRI.

Obtención de las formas sanguíneas de *T. cruzi*

Los tripomastigotes sanguíneos de *T. cruzi* fueron obtenidos con jeringa heparinizada por cardiopuntura a partir de ratones infectados experimentalmente y con altas parasitemias. La sangre fue mezclada con solución amortiguadora de fosfato salino a pH 7,2 (PBS) y los tripanosomas fueron cuantificados en 5 µL de la suspensión, distribuidos uniformemente entre lámina y laminilla (22×22 mm) y examinados al microscopio de luz con objetivo de 40x siguiendo el método modificado por Brener [7]. El número de parásitos fue ajustado para contener un inóculo aproximado de 5×10^4 tripomastigotes sanguíneos en un volumen de 0,1 mL de la suspensión.

Inoculación y apareamiento

El lote de 24 ratas de 2½ meses de nacidas, obtenidas en el bioterio de cría de la Universidad de los Andes (BIOULA), fueron divididas en cuatro grupos experimentales. Las ratas de los grupos B (n = 6) y D (n = 6), previa anestesia con éter dietílico, fueron individualmente inyectadas por vía intraperitoneal (IP) con el inóculo de parásitos antes calculado, para lo cual se utilizó una jeringa de 1 mL con aguja No. 26G×1/2. Las ratas sanas de los grupos A (n = 6) y C (n = 6) usadas como controles, fueron inyectadas por la misma vía IP con 0,1 mL de solución fisiológica. Todos los animales fueron mantenidos en el bioterio experimental bajo condiciones controladas de temperatura y humedad relativa y alimentadas con dieta comercial (ratarina^R) y agua *ad libitum*.

A los 10 días post-inoculación (pi), las ratas de los grupos C y D en la etapa de *estrus* y/o *pro-estrus* de su ciclo estral, fueron apareadas con machos en una relación 2/1 por jaula. Al siguiente día del apareamiento, las ratas fueron examinadas mediante un leve lavado vaginal con solución fisiológica y una vez comprobada la presencia de espermatozoides en la suspensión del lavado, las ratas fueron separadas de los machos y colocadas en jaulas individuales con suficiente alimento concentrado y agua.

Evaluación de la infección

El curso de la infección chagásica en las ratas infectadas vírgenes y las ratas infectadas ya preñadas, fue evaluado antes del apareamiento y a los 6; 12 y 20 días de la gravidez, a través de pruebas de diagnóstico parasitológico e inmunológico con el objeto de detectar parasitemias patentes y anticuerpos específicos anti-*T. cruzi*. En las ratas sacrificadas a término de la gestación, se investigó la presencia de formas flageladas de *T. cruzi* en el líquido amniótico y las alteraciones histopatológicas en el corazón, músculo esquelético popliteo, útero, placentas y en el sexto par de glándulas mamarias abdominales. Así mismo, se hizo una evaluación morfométrica de los fetos y placentas. A las ratas controles del grupo C, se les practicaron exámenes macroscópicos así como las determinaciones del tamaño y peso de los fetos y placentas.

Obtención y procesamiento de la sangre

En cada uno de los grupos experimentales, las muestras de sangre fueron tomadas individualmente por ruptura del plexo venoso de la órbita ocular, con un trozo de capilar, estando el animal ligeramente anestesiado con éter dietílico. De la sangre recién colectada en viales de plástico, 5 µL fueron retirados para investigar parasitemias patentes. Los viales con el resto de la sangre, fueron colocados 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.

Detección de parásitos circulantes

La parasitemia patente fue estimada por observación directa de las formas sanguíneas en las muestras de sangre (5 µL) recién extraída, examinándose en fresco entre lámina y laminilla 100 campos microscópicos con un aumento de 400x [7]. El número de parásitos contados en los 100 campos, se multiplicó por el factor de corrección del microscopio y los resultados fueron expresados como trips./mm³ de sangre.

Determinación de los anticuerpos específicos anti-*T. cruzi* en los sueros

Los anticuerpos presentes en la sangre fueron detectados mediante las técnicas de Aglutinación Directa previo tratamiento de los sueros problemas con 2-Mercapto-Etanol (t-AD-2ME) [37] e Inmunofluorescencia Indirecta (t-IFI) [8]. Los anti-

genos homólogos utilizados correspondieron a formas flageladas de *T. cruzi*, colectados en fase exponencial de crecimiento en el medio de cultivo NNN-USAMRU [39] más solución fisiológica salina al 0,85% como fase líquida. Para la t-IFI, se utilizó como conjugado antiglobulina de rata marcada con fluoresceína (Sigma). La reacción se consideró positiva cuando presentaba títulos de 1:32 o más.

Estimación de tripanosomas en el líquido amniótico

Al término de la gestación, las ratas infectadas preñadas y las ratas sanas preñadas fueron sacrificadas por sobre anestesia con éter dietílico. Igualmente, fueron sacrificadas las ratas vírgenes infectadas y vírgenes sanas. La necropsia se realizó disecando el útero grávido, separándolo por debajo del antro al nivel del fondo de la vagina y extrayéndolo con los cuernos uterinos conteniendo los fetos y sus órganos anexos. Sobre una cápsula de Petri fue extendido el útero para ser lavado con solución fisiológica evitando así la contaminación con sangre proveniente de las venas uterinas; con una pipeta Pasteur se hizo una pequeña incisión sobre el saco uterino que recubre al feto, obteniéndose muestras de líquido amniótico, unas para ser examinadas directamente bajo el microscopio y otras para conformar un pool/rata, el cual fue inoculado en tubos conteniendo el medio de cultivo NNN-USAMRU.

Los fetos y las placentas de las ratas sacrificadas fueron removidos de los sacos uterinos, cuidadosamente limpiados con papel absorbente y colocados sobre una cápsula de Petri para su estudio macroscópico. Antes de su fijación en formol neutro, ambos grupos de fetos y placentas fueron cuidadosamente medidos con una regla milimetrada y pesados individualmente.

Estudio histopatológico

De cada una de las ratas sacrificadas a término de la gestación, se extrajo el corazón completo cortado frontalmente en dos partes iguales y fragmentos de músculo esquelético, útero grávido y del sexto par de glándulas mamarias. De las ratas vírgenes infectadas y sanas, sólo se disecó el corazón y fragmentos de músculo esquelético y útero normal. Los órganos fueron fijados en formalina neutra al 10% durante 48 horas e incluidos en Paraplast (Monoject Scientific, St. Louis MO, EUA). Los cortes de 6 µm de espesor se hicieron en un microtomo American Optical spencer "820" y fueron teñidos por el método de Giemsa-Pappenheim-colofonio [6] y Hematoxilina y Eosina (HE).

Análisis estadístico

Los resultados de parasitemias y los títulos de anticuerpos obtenidos durante la fase aguda de la infección, fueron procesados mediante un análisis de varianza para efectos fijos y un contraste de inferencia simultánea. Igualmente, las medidas del largo, ancho y pesos de los fetos y placentas fueron analizados utilizando el contraste de la t-student [14].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Algunos autores han planteado que la rata albina (*R. norvegicus*), cepa Wistar, infectada experimentalmente con *T. cruzi*, reproduce con gran semejanza las fases aguda y crónica de la enfermedad de Chagas humana [12, 23, 32, 33]. En el presente estudio se investigó los efectos de la infección chagásica aguda sobre el modelo experimental durante el período de gestación. Para tal fin, fueron tomadas en consideración las variables señaladas en la TABLA I.

Estimación de la parasitemia

Los resultados obtenidos sobre la evolución de la infección expresados por la presencia de parásitos en la sangre en las ratas del grupo B y las ratas del grupo D, revelaron que la parasitemia promedio de las ratas gestantes fue significativamente menor ($P < 0,01$) que la observada en las ratas vírgenes infectadas, entre la primera y segunda semana de la gravidez (TABLA II). Los máximos niveles de parasitemia detectados a los 12 días en las ratas del grupo D fueron de 27 ± 3 trips./mm³ en comparación con los 55 ± 9 trips./mm³ observados en las ratas del grupo B. En el muestreo realizado al término de la gestación (20-21 días), no se detectaron tripanosomas circulantes en la sangre en ambos grupos de ratas (FIG. 1). Esta disminución de la parasitemia en las ratas pre-

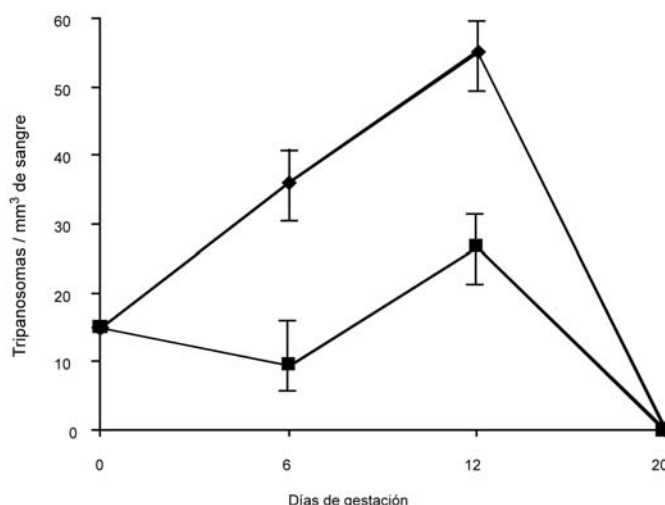


FIGURA 1. PARASITEMIAS DETECTADAS DURANTE EL PERÍODO DE GESTACIÓN EN RATAS WISTAR INFECTADAS CON TRIPOMASTIGOTES SANGUÍCOLAS DE *T. cruzi* (◆ Grupo B) (■ Grupo D) / PARASITEMIAS IN WISTAR RATS INFECTED WITH BLOODSTREAM TRYPOMASTIGOTES OF *T. cruzi*, OBSERVED DURING THE GESTATION PERIOD.

TABLA I
PARÁMETROS UTILIZADOS EN LA EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS DE LA INFECCIÓN CHAGÁSICA AGUDA EN LAS RATAS WISTAR GESTANTES / THE EFFECTS OF ACUTE CHAGASIC INFECTION ON GESTATING WISTAR RATS WAS EVALUATED ACCORDING TO THE FOLLOWING PARAMETERS

Parámetro(s)	Días de gestación	Grupo(s)
¹ Parasitemias	0, 6, 12, 21	B-D
² Anticuerpos anti- <i>T. cruzi</i> *	0, 6, 12, 21	B-D
³ Líquido amniótico	21	D
⁴ Alteraciones histopatológicas	21	A, B, C, D
⁵ Alteraciones morfométricas**	21	D

1. En 5 µL de sangre según el método de Brener [7]. 2. Técnicas de aglutinación directa (t-TAD-2ME) [37] e Inmunofluorescencia Indirecta (t-IFI) [8].

3. Examen directo y cultivo. 4. Órganos (corazón, músculo esquelético, útero grávido, placentas, glándulas mamarias).

5. Tamaño y peso de fetos y placentas.

*. Análisis de varianza para efectos fijos y un contraste de inferencia múltiple [14]. **. Contraste de t-student [14].

TABLA II
SIGNIFICACIÓN Y DIFERENCIAS ENTRE LAS MEDIAS DE PARASITEMIA EN RATAS WISTAR CON INFECCIÓN CHAGÁSICA AGUDA DURANTE LA GESTACIÓN / SIGNIFICATION AND DIFFERENCES BETWEEN THE MEDIAS IN PARASITEMIAS IN WISTAR RATS WITH ACUTE CHAGASIC INFECTION, DURING THE GESTATING PERIOD

	Grupo		Tiempo		Interacción grupo-tiempo
	P-valor	Diferencias	P-valor	Diferencias	
Parasitemia	0,0032*	B-D	0,0000*	T0-T3 T1-T3 T2-T3	0,0072*

*($P < 0,01$).

ñadas refleja los efectos paralelos que sobre el modelo animal tiene la gravidez. No obstante, estos resultados contrastan con los publicados por Krampitz y Disko [15], quienes utilizando ratones hembras de las cepas NMRI y Tubigen de 3 y 4 meses de edad e infectadas con *T. cruzi* Y, encontraron que la parasitemia era más intensa en las hembras grávidas. Esta disparidad de resultados posiblemente se deben a factores relacionados con la patogenicidad de la cepa de *T. cruzi*, forma de los parásitos, tamaño del inóculo, vía de inoculación y la especie animal empleado.

Evaluación de la respuesta humoral

La respuesta humoral en ratas albinas, experimentalmente infectadas con *T. cruzi*, ha sido evidenciada por diferentes investigadores [3, 16, 24,38]. Los anticuerpos aglutinantes detectados con la t-AD-2ME fueron positivos a partir de los 10 días pi, tanto en las ratas vírgenes infectadas como en las ratas infectadas preñadas, observándose un aumento progresivo en los títulos en la medida que evolucionó la infección chagásica aguda, apreciándose las mayores diluciones (1: 2048) y (1: 4096) en los sueros de las ratas infectadas gestantes entre los 12 y 20 días pi. El mismo comportamiento fue observado para los títulos de anticuerpos polivalentes anti-*T. cruzi* detectados por la reacción de IFI (FIG. 2). El análisis estadístico efectuado a los títulos de anticuerpos obtenidos con la t-AD, no mostró una interacción significativa entre grupo y tiempo ($P > 0,05$). No obstante, al analizar el modelo sin interacción, se evidenció diferencias significativas tanto para los grupos como para los tiempos ($P < 0,01$). En cuanto al análisis de los valores promedios de los títulos obtenidos con la t-IFI, se observó una interacción significativa entre grupo y tiempo ($P < 0,05$) y una diferencia significativa para los grupos como para los tiempos ($P < 0,01$) (TABLA III). Esta diferencia en los niveles de anticuerpos en las ratas preñadas probablemente sea debido a los efectos paralelos inducidos por el embarazo los cuales potencian los efectos patológicos producidos por el parasitismo, modificando así la respuesta inmunológica a la infección. Por otro

lado, Carlier y col. [10], estudiaron la respuesta inmune humoral y celular en ratones hembras crónicamente infectadas con *T. cruzi*, durante la gestación. Los autores concluyeron que la gravidez está asociada a la disminución de ciertos parámetros inmunológicos humorales y celulares, los cuales son insuficientes para modificar el curso de la infección. En este mismo orden de ideas, otros investigadores han señalado que estos anticuerpos anti-*T. cruzi* de origen maternal son transmitidos vía transplacentaria y a través de la leche a una gran parte de sus crías, los cuales pudieran modular su respuesta inmunológica [17, 24].

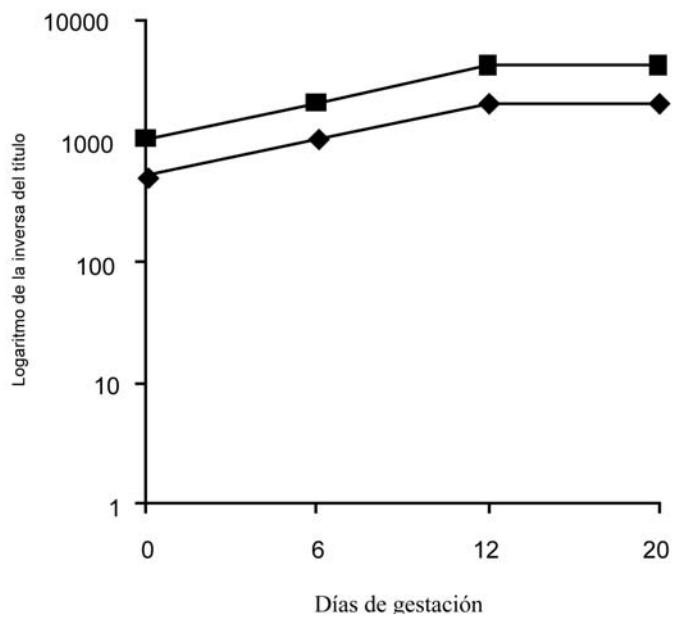


FIGURA 2. TÍTULOS DE ANTICUERPOS ANTI-*T. cruzi* DETECTADOS EN RATAS WISTAR DURANTE LA GESTACIÓN, MEDIANTE LA TÉCNICA DE INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA (IFI) (◆ Grupo B) (■ Grupo D) / TITERS OF ANTI-*T. cruzi* ANTIBODIES IN WISTAR RATS DETECTED DURING THE GESTATION PERIOD, THROUGH INDIRECT IMMUNOFLUORESCENCE ASSAY (IIA).

TABLA III
SIGNIFICACIÓN Y DIFERENCIAS ENTRE LAS MEDIAS DE LOS TÍTULOS DE ANTICUERPOS ANTI-*T. cruzi* EN RATAS WISTAR CON INFECCIÓN CHAGÁSICA AGUDA DURANTE LA GESTACIÓN / SIGNIFICATION AND DIFFERENCES BETWEEN THE MEDIAS OF THE TITERS OF ANTI-*T. cruzi* ANTIBODIES IN WISTAR RATS WITH ACUTE CHAGASIC INFECTION, DURING THE GESTATION

	Grupo		Tiempo		Interacción grupo-tiempo
	P-valor	Diferencias	P-valor	Diferencias	
¹ TAD	0,0000**(msi)	B-D	0,0000**(msi)	T0-T2	0,1099(ns)
				T0-T3	
				T1-T3	
² IFI	0,0040**	B-D	0,0001**	T0-T1	0,0219*
				T0-T2	
				T0-T3	

* Diferencia significativa ($P < 0,05$). ** Diferencia significativa ($P < 0,01$). (ns) Diferencia no significativa ($P > 0,05$). (msi) Modelo sin interacción.
¹Técnica de Aglutinación Directa (t-AD2ME). ²Técnica de Inmunofluorescencia Indirecta (t-IFI).

Detección de parásitos en el líquido amniótico

El examen parasitológico directo realizado a cada una de las muestras de líquido amniótico extraído de los sacos uterinos de cada feto en las ratas sacrificadas a término de la gestación, no mostró tripomastigotes circulantes. Sin embargo, bajo las condiciones experimentales, en 3 (50%) de 6 ratas cuyas muestras del pool de líquido amniótico que fue inoculado en tubos con medio de cultivo NNN-USAMRU, se desarrollaron abundantes formas flageladas de *T. cruzi* a los 15 y 30 días después de la inoculación. Este hallazgo, es una evidencia de que el parásito alcanzó el líquido amniótico por vía hematogena infectando de esta manera algunos fetos. La presencia de tripanosomas en este medio es una prueba que diagnostica la infección chagásica congénita a su progenie. Esta afirmación ha sido señalada en ratones hembras NMRI infectadas con *T. cruzi* [25] y en humanos [5, 29].

Observaciones histopatológicas

El estudio histopatológico de los órganos extraídos de las ratas infectadas sacrificadas al término de la gestación y de las ratas vírgenes infectadas, reveló de manera general en ambos grupos, procesos inflamatorios de variable intensidad acompañados en algunos casos de parasitismo tisular (TABLA IV). En el análisis minucioso de las secciones del corazón y músculo esquelético de las ratas infectadas gestantes y vírgenes infectadas, se evidenció el establecimiento de un proceso inflamatorio de naturaleza linfoplasmohistiocitario focal y/o difuso en algunas áreas de la masa muscular, acompañado de numerosos mastocitos intactos o degranulados y nidos de amastigotes de reciente formación, tanto en las fibras cardíacas como en las esqueléticas, indicando la instauración de una

miocarditis y miositis aguda (FIG. 3). La coexistencia de nidos de amastigotes con infiltrado inflamatorio fue considerada por Molina y col. [21] como un argumento que soporta el papel de los parásitos en la producción de la inflamación local; en el presente estudio, estos dos tipos de procesos coexisten en el mismo período de tiempo y en la misma área muscular. Los parásitos de la cepa Y de *T. cruzi* considerada por Pereira da Silva y Nussenzweig [30] como "reticulotrópica" en el ratón, presentaron en las ratas vírgenes infectadas y en la infectadas preñadas un marcado mitotropismo con moderado parasitismo en el corazón, discreto en el músculo esquelético y musculatura lisa del útero grávido. Tales resultados son similares a los publicados por Scorza [32] y Moreno y col. [23] en ratas machos infectados con diferentes cepas de *T. cruzi*. En los cortes de útero grávido de una rata infectada se observó un nido de amastigotes y abundante infiltrado linfocitario en el miometrio (FIG. 4); mientras que en las secciones de útero de las ratas vírgenes infectadas, sólo se evidenció un discreto infiltrado inflamatorio sin parasitismo tisular. La presencia de formas amastigotes en las fibras musculares lisas del miometrio, sugiere la posibilidad de infección en las crías durante su desarrollo intrauterino [27]. Por otro lado, se ha señalado que la infección láctica es otro posible modo de transmisión de *T. cruzi* [15, 19, 20]. En los cortes de glándulas mamarias no se observaron nidos de parásitos en los alveólos, conductos excretores ni en el tejido conectivo inter e intralobulillar. Las células alveolares mostraron un citoplasma altamente basófilico, lo que refleja la síntesis inicial del calostro. No obstante, Ribeiro y col. [31], haciendo un estudio histopatológico de las glándulas mamarias de ratones infectados con *T. cruzi*, observaron amastigotes en los alveólos, conductos excretores, tejido conectivo, histiocitos, tejido adiposo, glándulas sebáceas, fibras musculares estriadas y en

TABLA IV
HISTOPATOLOGÍA DE DIFERENTES TEJIDOS DE RATAS WISTAR CON INFECCIÓN CHAGÁSICA AGUDA, DURANTE EL PERÍODO DE GESTACIÓN / HISTOPATHOLOGY OF DIFFERENT TISSUES OF WISTAR RATS WITH ACUTE CHAGASIC INFECTION, DURING THE GESTATING PERIOD

Tejido	Aspecto	Grupos		Patología
		B	D	
Corazón	Inflamación	focal	Focal y/o difusa	-
	Parasitosis	presente	presente	Miocarditis
	Mastocitos	presente	presente	-
Músculo esquelético	Inflamación	focal	focal	-
	Parasitosis	escasa	escasa	Miositis
	Mastocitos	escasos	escasos	-
Útero	Inflamación	discreta (Miometrio)	intensa (Miometrio)	-
	Parasitosis	ausente	presente	-
Glándula mamaria	Inflamación	ausente	discreta	-
	Parasitosis	ausente	no se observó	-
Placenta	Inflamación	ausente	discreta en estroma y membranas (coriónica y desidual)	Placentitis
	Parasitosis	ausente	no se observó	-

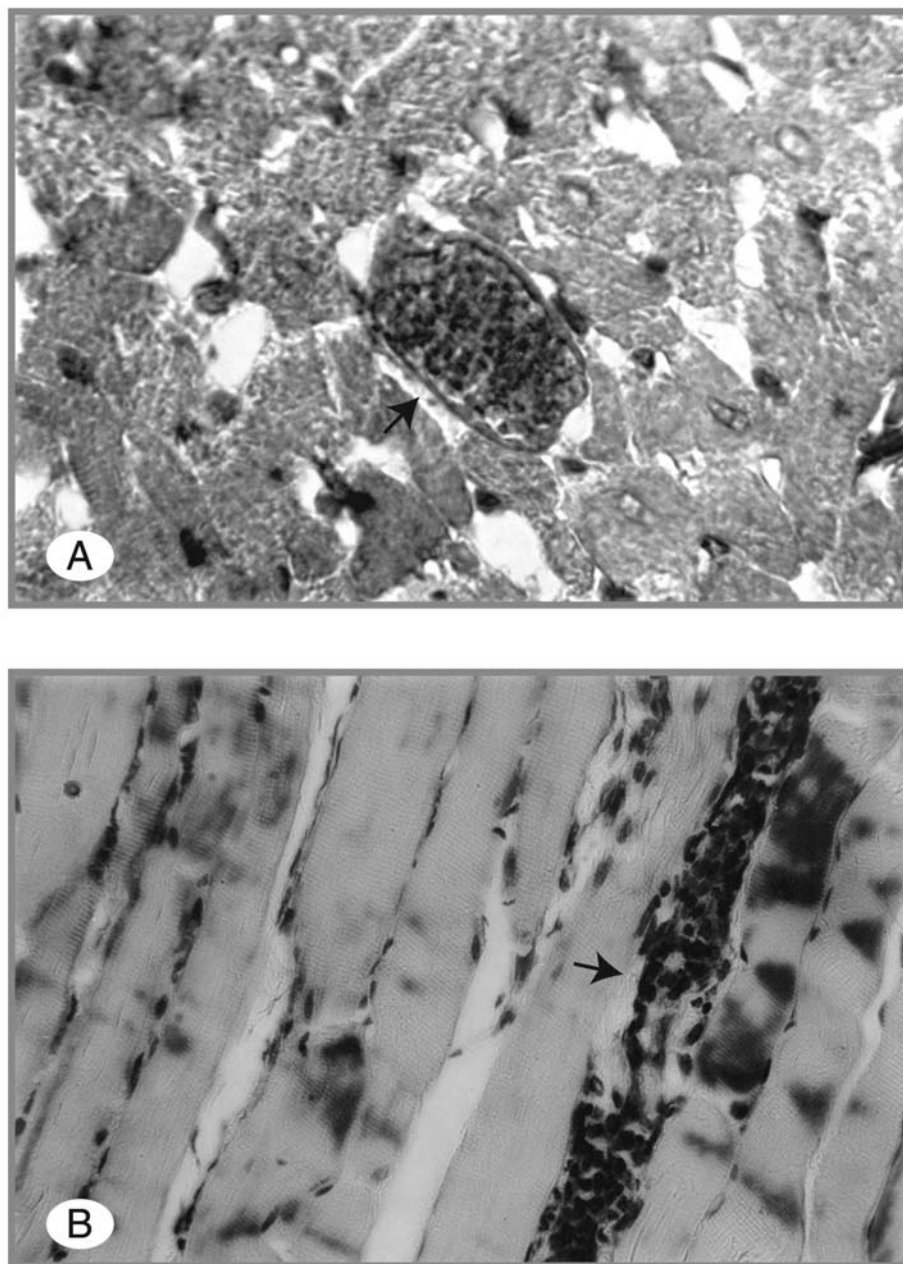


FIGURA 3. SECCIONES DE CORAZÓN (A) Y MÚSCULO ESQUELÉTICO (B) DE UNA RATA INFECTADA CON *T. cruzi* CON 21 DÍAS DE GESTACIÓN, MOSTRANDO UN NIDO DE AMASTIGOTES Y MIOSITIS FOCAL (GIEMSA-COLOFONIO, 1000X; 400X) / SECTIONS OF HEART (A) AND SKELETAL MUSCLE (B) FROM WISTAR RAT INFECTED WITH *T. cruzi*, WITH 21 DAYS OF GESTATION; SHOWED A NEST OF AMASTIGOTES WITH FOCAL MYOSITIS (GIEMSA-COLOFONIO, 1000X; 400X).

el lumen de los conductos, sugiriendo que la transmisión del parásito a través de la leche procedente de una madre infectada, puede ocurrir. En el presente trabajo, el estudio minucioso de las secciones de glándulas mamarias de las ratas infectadas sacrificadas a término de la gestación, no mostró parasitismo ni alteraciones histopatológicas apreciables. Sin embargo, no se descarta la presencia de parásitos en este órgano.

El análisis histopatológico de las secciones de placentas provenientes de ratas infectadas, mostró moderada placentitis, caracterizada por la presencia de infiltrado celular de variable

intensidad alrededor de los vasos y abundantes células gigantes dispersas en las vellosidades placentarias. No se observó parasitismo a nivel del estroma, placas coriónica y desidual. Los resultados sugieren que los parásitos invadieron transitoriamente estos órganos, pero fueron rápidamente eliminados por los mecanismos inmunológicos del animal. Esta aseveración ha sido recientemente confirmada por Moreno y col. [27], quienes estudiando la reactivación de la infección chagásica en ratas gestantes mediante técnicas inmunohistoquímicas, encontraron en el corazón de una rata, un nido de amastigotes

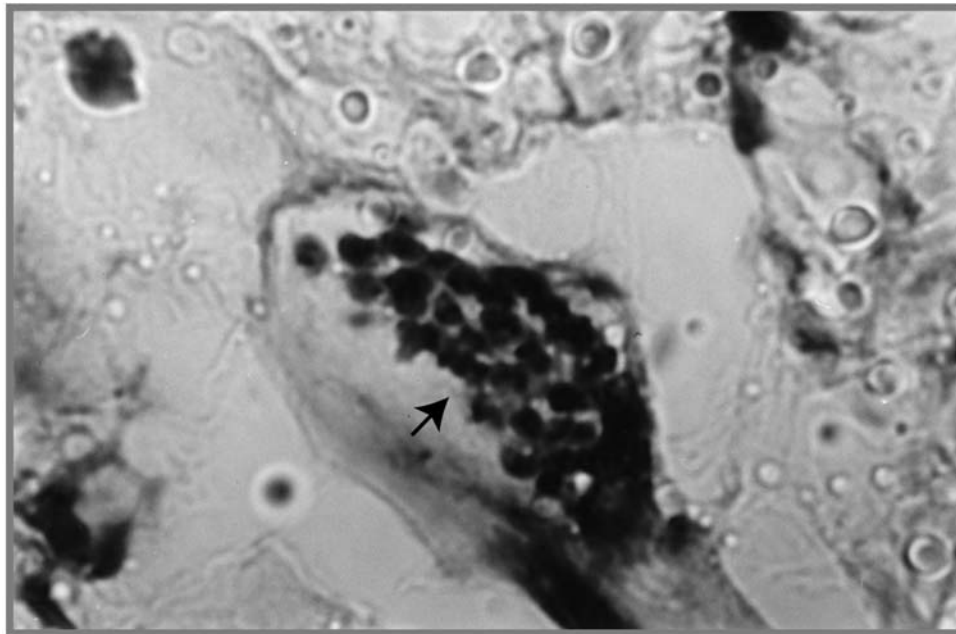


FIGURA 4. SECCIÓN DE ÚTERO GRÁVIDO DE UNA RATA INFECTADA CON *T. cruzi* CON 21 DÍAS DE GESTACIÓN, MOSTRANDO UN NIDO DE AMASTIGOTES EN EL TEJIDO MUSCULAR LISO (GIEMSA-COLOFONIO, 1000X) / SECTION OF GRAVID UTERUS FROM WISTAR RAT INFECTED WITH *T. cruzi*, WITH 21 DAYS OF GESTATION; SHOWED AN NEST OF AMASTIGOTES IN THE UTERINE SMOOTH MUSCLE (GIEMSA-COLOFONIO, 1000X).

de reciente formación y abundantes depósitos antigénicos en la musculatura cardíaca, esquelética, musculatura lisa del útero grávido, cerebro y placentas, demostrándose de esta manera la presencia de parásitos en estos tejidos. Por otra parte, la presencia de formas flageladas en los cultivos del líquido amniótico de algunas ratas con infección chagásica aguda, demostró que los parásitos pueden alcanzar los fetos por vía hematogena desde su pasaje a través de la placenta. La presencia de nidos de amastigotes de *T. cruzi* en las placentas han sido observados en ratones hembras NMRI infectadas con *T. cruzi* antes de la gestación, igualmente, formas flageladas del parásito en la sangre de algunas crías [25]. Andrade [1] refiere presencia de parasitismo de variable intensidad en la parte vascular de las placentas de ratones infectados con diferentes cepas de *T. cruzi*, lo que sugiere que las cepas de parásitos pueden ser un factor importante en la transmisión congénita de *T. cruzi*. Igualmente, Carrara-Abrão y col. [9], han observado en placentas de ratones suizos infectados con la cepa RAL de *T. cruzi*, intenso parasitismo con grandes nidos de amastigotes en el citoplasma de las células gigantes. Por otro lado, en placentas humanas se ha referido 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 [5]. Por otro lado, los tejidos de las ratas controles no presentaron alteraciones histopatológicas atribuibles a infecciones parasitarias.



FIGURA 5. FETO Y PLACENTA HEMOCORIAL DE UNA RATA INFECTADA CON *T. cruzi* A TÉRMINO DE LA GESTACIÓN / FETUS AND HEMOCHORIAL PLACENTA FROM WISTAR RAT INFECTED WITH *T. cruzi* TO TERMINUS OF THE GESTATION.

Evaluación del tamaño y peso de los fetos y placentas

El estudio macroscópico de los 53 fetos y placentas obtenidos de las ratas infectadas gestantes y los 55 fetos y placentas de las ratas sanas, no mostró alteraciones morfológicas apreciables (FIG. 5). El análisis de los valores absolutos de las medias del tamaño (largo y ancho) de los fetos extraídos de

TABLA V
SIGNIFICACIÓN Y DIFERENCIAS ENTRE LAS MEDIAS SEGÚN CONTRASTE t-student DEL TAMAÑO Y PESO DE LOS FETOS Y PLACENTAS, DE LOS GRUPOS C y D / SIGNIFICATION AND DIFFERENCES BETWEEN THE MEDIAS ACCORDING TO THE CONTRAST t-student OF THE SIZES AND WEIGHT OF THE FETUSES AND PLACENTAS, OF THE GROUPS C AND D

Características	Estadístico t	Grados de libertad	p-valor
Largo de los fetos	7,6434	101	0,000**
Ancho de los fetos	2,1491	101	0,034*
Peso de los fetos	-0,2531	100	0,8007 (ns)
Tamaño de las placentas	5,9564	101	0,000**
Peso de las placentas	7,0992	101	0,000**

* Diferencia significativa (P < 0,05). ** Diferencia significativa (P < 0,01). (ns) Diferencia no significativa (P > 0,05).

las ratas infectadas y de las ratas controles sanas, revelaron diferencias significativas (P < 0,01) apreciables (TABLA V), mientras que los pesos no mostraron diferencias significativas (P > 0,05). No obstante, a pesar de estas alteraciones morfo-métricas, *T. cruzi* no causó interrupción de la gestación y en las ratas infectadas sacrificadas a término de la gravidez, se observaron fetos aparentemente normales. Similares resultados fueron publicados por Shaw y Quadagno [34] quienes investigaron el efecto de la infección por *T. lewisi* y *T. cruzi* en ratas preñadas. Los autores concluyeron que *T. lewisi* causa la interrupción de la gestación cuando las ratas son infectadas tempranamente, mientras que *T. cruzi* causa poco o ningún cambio patológico en las ratas durante el período de gestación. Por otro lado, las placentas de las ratas infectadas mostraron diferencias significativas (P < 0,01) en cuanto al tamaño y peso con respecto a las placentas de las ratas sanas. Esta alteración morfo-métrica probablemente se deba a la placentitis provocada por la multiplicación del parásito. Por el contrario, Carrarao-Abraham y col.[9] observaron disminución significativa en el tamaño y volumen de las placentas de ratones infectados con la cepa RAL de *T. cruzi* comparados con las del grupo control. Los autores refieren que esta disminución probablemente sea debida a una disminución en la producción de lactógeno I y II placentar. En humanos, las placentas infectadas muestran un importante aumento de peso, observándose pálidas, amarillentas y a veces edematosas, con un aspecto similar al encontrado en la sífilis, en la toxoplasmosis o en la eritroblastosis fetal [5,28].

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este trabajo, mediante la inoculación de un número reducido de formas sanguícolas de *T. cruzi* en el modelo experimental rata Wistar antes del apareamiento, y el seguimiento de la evolución de la infección chagásica aguda durante la gestación, evidenciaron la presencia de importantes alteraciones parasitológicas, inmunológicas, histopatológicas y morfo-métricas de los fetos y placentas, las cuales fueron potenciadas por los efectos paralelos inducidos por la gravidez. Igualmente, la presencia de formas flage-

ladas del parásito en el líquido amniótico de algunos sacos uterinos y la presencia de amastigotes en la musculatura lisa del útero grávido de una rata, sugiere la infección fetal, lo que diagnostica la transmisión congénita de *T. cruzi* a su progenie. *T. cruzi* no causó interrupción de la gestación y los fetos a término de la gravidez fueron aparentemente normales.

RECOMENDACIONES

Es importante investigar en otros modelos animales infectados experimentalmente con diferentes cepas de *T. cruzi* a fin de obtener nuevos resultados que permitan generalizar las observaciones señaladas. Se recomienda repetir estos experimentos con aislados representativos de *T. cruzi* I y *T. cruzi* II (a, b, c, d, e) para poder concluir que no se producen alteraciones en el embarazo producto de la infección con *T. cruzi* en el curso de la infección chagásica. Igualmente, es recomendable mantener en los modelos experimentales las condiciones naturales mínimas de la infección tales como, inóculos bajos, formas metacíclicas de *T. cruzi* obtenidas de triatomíneos hematófagos como vectores naturales, vías de inoculación subcutánea o intradérmica a fin de tener una mayor semejanza con la transmisión vectorial. Estas condiciones van a permitir tener una aproximación más real del fenómeno estudiado.

AGRADECIMIENTO

Al Consejo de Desarrollo Científico, Humanístico y Tecnológico de la Universidad de los Andes por el financiamiento a través del Proyecto C-1184-03-03-A. Al FONACIT Proyecto S1-2002000500.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] ANDRADE, S.G. The influence of the strain of *Trypanosoma cruzi* in placental infections in mice. **Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.** 76: 123-28. 1982.

[2] AMATO N, V.; LOPES, M.E.; UMEZAWA, E.S.; DE SOUZA, A.R.M.; PINTO D, J. Outras formas de trans-

- missão do *Trypanosoma cruzi*. **Rev. Pat. Trop.** 29: 115-129. 2000.
- [3] APT, W.; NAQUIRA, C.; TEJADA, A.; STTOZZI, L. Transmisión congénita del *Trypanosoma cruzi*. II. En ratas con infección aguda y crónica. **Bol. Chil. Parasitol.** 23: 9-15. 1968.
- [4] BITTENCOURT, A.L. Posible risk factors for vertical transmission of Chagas' disease. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.** 34: 403-408. 1992.
- [5] BITTENCOURT, A.L. Transmissão Vertical da Doença de Chagas. En: Brener, Z.; Andrade, Z.A.; Barral-Neto, M. (Eds) **Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas**. 2nd Ed. Guanabara Koogan, Brasil. 16-20 pp. 2000.
- [6] BRAY, R.; GARNHAM, P.C.C. The Giemsa colophonium method for staining protozoa in tissue section. **Indian J. Malariol.** 16: 152-155. 1962.
- [7] BRENER, Z. Observações sobre a imunidade a superinfecções em camundongos experimentalmente inoculados con *Trypanosoma cruzi* e submetidos a tratament. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.** 4: 119-123. 1962.
- [8] CAMARGO, M.E. Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of american trypanosomiasis, technical modification employing preserved culture forms of *Trypanosoma cruzi*. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.** 8: 227-234. 1966.
- [9] CARRARAO-ABRAHÃO, A.A.; LOPES, R.A.; SALAS, M.A.; RIBEIRO, R.D.; PRADO, JR.J.C.; ALBUQUERQUE, S. Placental alterations of swiss mice infected with RAL strain of *Trypanosoma cruzi*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** 95 (Suppl. II): 122. 2000.
- [10] CARLIER, Y.; RIVERA, M.T.; TRUYENS, C.; GOLDMAN, M.; LAMBERT, P.; FLAMENT, J.; BAUWENS, D.; VRAY, B. Pregnancy and humoral immune response in mice chronically infected by *Trypanosoma cruzi*. **Infect. Immun.** 55: 2496-2501. 1987.
- [11] DAVILA, H.O.; REVELLI, S.S.; MORENO, H.S.; VALENTI, J.L.; MUSSO, O.C.; POLI, H.O.; MORCINI, J.C.; BOTTASSO, H.O. 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. 1994.
- [12] GOTTFBERG, C.; DONIS, J.H.; TORRES, A.; FUENMAYOR, A.J.; DAVILA, D. Heart rate changes in rats with acute chagasic myocarditis. **Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.** 82: 851. 1988.
- [13] KOLLIEN, A.H.; SCHAUB, G.A. The development of *Trypanosoma cruzi* in Triatominae. **Parasitol. Today.** 16: 381-387. 2000.
- [14] KLEINBAUM, D.; KUPPER, L.; MULLER, L.; NIZAN, A. **Applied regression analysis and other multivariable method**. 3ra. Ed. Duxbury Press. An International Thomson Publishing Company, Boston. 24-28, 423-483 pp. 1998.
- [15] KRAMPITZ, H.E.; DISKO, R. Retardation of parasitemia prolongation of life or survival of lactating mice in infections with *Trypanosoma cruzi*. **Nature.** 209: 526. 1966.
- [16] KOLODNY, M. The transmission of immunity in experimental trypanosomiasis (*Trypanosoma cruzi*) from mother rats to their offspring. **Am. J. Hyg.** 30: 19-39. 1939.
- [17] MARQUES DE A, S.; CHIARI, E. *Trypanosoma cruzi* infection in offspring born to chagasic C₃H/He mice. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** 91: 211-216. 1916.
- [18] MAYER, M.; ROCHA-LIMA, H. Zum Verhalten von *Schizotrypanum cruzi* in warm blutern und Arthropoden. **Arch. F. U. Schiffs-u Tropenhyg.** 18: 257-292. 1914.
- [19] MEDINA-LOPES, M.D.; MACEDO, V. *Trypanosoma cruzi* no calostro humanos. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** 16: 170. 1983.
- [20] MILES, M.A. *Trypanosoma cruzi*-milk.transmission of infection and immunity from mother to young. **Parasitol.** 65: 11-21.1972.
- [21] MOLINA, H.A., CARDON, R.L.; RIMONDI, M.T. The neuromuscular pathology of experimental Chagas' disease. **J. Neurol. Sci.** 56: 17-31. 1987.
- [22] MORAES-SOUZA, H. Transmissão transfusional da doença de Chagas. **Rev. Pat. Trop.** 29 (Supl.): 91-100. 2000.
- [23] MORENO, E.A.; GONZÁLEZ, N.; SCORZA, C.; LUGO DE Y.A.; AÑEZ, N. Efecto de inóculos bajos en la infección experimental por *Trypanosoma cruzi*. **Bol. Dir. Malariol. San. Amb.** 39: 1-9. 1999.
- [24] MORENO, E.A.; RIVERA, I.; MORENO, S.C.; ALARCÓN, M.; LUGO DE Y.A. Transmisión vertical de *Trypanosoma cruzi* en ratas Wistar durante la fase aguda de la infección. **Invest. Clin.** 44: 241-254. 2003a
- [25] MORENO, E.A.; QUINTERO, A.C.; ARAUJO, S. Efectos de la infección chagásica aguda en ratones NMRI durante la gestación. **Acta Cient. Vzolana.** 54 (Supl. 1): 227. 2003.
- [26] MORENO, E.A.; QUINTERO, A. Transmisión congénita de *Trypanosoma cruzi* en ratas Wistar durante la fase crónica de la infección. Mérida: Univ. de los Andes [Tesis de Licenciatura]. 88 pp. 2004.
- [27] MORENO, E.A.; MÉNDEZ, M.J.; ALARCÓN, M.E.; ARAUJO, S.; LUGO DE Y.A.; MORENO, S.C. Reactiva-

- ción de la infección chagásica en ratas Wistar gestantes. **Kasmera**. 33:51-63. 2005.
- [28] MUÑOZ, C.P. Transmisión congénita de parásitos. En: Attias-Negheme. (Eds). **Parasitología Clínica**. 4ta Ed. Publicaciones Técnicas Mediterráneo, Santiago, Chile. 509-522 pp. 1998.
- [29] NILO, M.E.; ALVARADO, J.; RAMIREZ, M.; ESPEJO, E. Hallazgo de tripomastigoto en estudio citoquímico de líquido amniótico. **Parasitol. al día**. 24: 49-51. 2000.
- [30] PEREIRA DA S, L.H.; NUSSENZWEIG, V. Sobre una cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. **Fol. Clin. Biol**. 20:191-207. 1953.
- [31] RIBEIRO, R.D.; LOPES, R.A.; GARCIA, T.A.R.; CAMPOS, A. Histopathological study of mammary gland in *Trypanosoma cruzi*-infected mice. **Parasitol. Res**. 74: 290-292. 1988.
- [32] 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. Mérida: Univ. de los Andes. [Trabajo de Ascenso]. 101 pp. 1982.
- [33] SCORZA, C. Inducción de modificaciones histopatológicas cardíacas en fase latente de la infección chagásica estudio experimental en ratas Distar. Mérida: Univ. de los Andes. [Trabajo de Ascenso]. 90 pp. 2001.
- [34] SHAW, G.; QUADAGNO, D. *Trypanosoma lewisi* and *T. cruzi*: Effect of infection on gestation in the rat. **Exp. Parasitol**. 37: 211-217. 1975.
- [35] SHIPPEY, S.H.; ZAHN, C.M.; CISAR, M.M.; WU, J.; SATIN, A.J. Use of the placental perfusion model to evaluate transplacental pasaje of *Trypanosoma cruzi*. **Am. J. Obstet. Gynecol**. 192: 586-591. 2005.
- [36] SOUZA-CAMPOS, E. Tripanosome americana congénita do cao. **Med. Prat**. 2: 57-70. 1932.
- [37] STORNI, P.D.; BOLSI, F.L.; YANOVSKY, J.V. Reacción de aglutinación directa para diagnóstico de la enfermedad de Chagas. Utilización sistemática del 2-Mercapto-etanol para la eliminación de las aglutininas inespecíficas. **Med. (B. Aires)**. 35: 67-71. 1975.
- [38] VILLARREAL, J.C. Evaluación de las proteínas de la membrana del glicosoma de *T. cruzi* como antígeno, frente al isotipo de IgG en sueros de personas chagásicas e IgM en sueros de ratas Wistar. Mérida: Univ. de los Andes. [Trabajo de Grado]. 76 pp. 2003.
- [39] WALTON, B.C.; BROOKS W.H.; ARJONA L. Serodiagnosis of american leishmaniasis by indirect fluorescent antibody test. **Am. J. Trop. Med. Hyg**. 21: 296-299. 1972.
- [40] WORLD HEALTH ORGANIZATION. Control of Chagas'disease. **Tech. Rep. Ser**. 905. 1-109. 2002.