

# EFFECTOS DE LA INFECCIÓN AGUDA POR DIFERENTES CEPAS DE *Trypanosoma cruzi* EN FETOS DE RATAS

## Effects of the Acute Infection by Different *Trypanosoma cruzi* Strains in Rats Fetuses

Ana Lugo de Yarbuh<sup>1</sup>, Sonia Araujo<sup>1\*</sup>, Maritza Alarcón<sup>1</sup>, Elio Moreno<sup>1</sup>, Antonio De Ascensão<sup>2</sup> y Hernán J. Carrasco<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Parasitología Experimental (LAPEX), Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de los Andes, Mérida, Venezuela. \*E-mail: lana@ula.ve. <sup>2</sup>Laboratorio de Biodiversidad, Facultad de Ciencias, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela. <sup>3</sup>Laboratorio de Biología Molecular de Protozoarios, Instituto de Medicina Tropical, Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela.

### RESUMEN

En el presente estudio se analizó el desarrollo intrauterino de los fetos de ratas Wistar, que recibieron una inyección por vía intraperitoneal de  $2 \times 10^5$  tripomastigotes sanguícolas de las cepas Planalto (IP1) y ASM (IP2) de *Trypanosoma cruzi*. A los 12 días post-infección fueron apareadas; a los 20 días de preñez fueron sacrificadas y los fetos fueron extraídos de los sacos uterinos para ser evaluados. Ratas sanas preñadas (SP) y vírgenes (CI1, CI2) fueron usadas como controles. Los resultados indican que la parasitemia fue significativamente ( $P < 0,05$ ) mayor en las ratas preñadas en comparación con las ratas vírgenes CI1 y CI2 infectadas con diferentes cepas de *T. cruzi*. En las ratas IP1 se observaron 19 fetos con peso y longitud promedio de  $2,86 \pm 2,19$  g y  $2,63 \pm 1,17$ ; en una de las ratas se desarrolló un solo feto en el cuerno uterino izquierdo, en otra rata se observó inflamación del cuerno izquierdo, restos fetales, placentales y 6 fetos de aspecto normal en el cuerno derecho; en dos ratas se desarrollaron 8 y 4 fetos, respectivamente, de aspecto normal. En las ratas preñadas IP2, se desarrollaron 28 fetos con peso y longitud promedio de  $2,77 \pm 0,77$  g y  $3,31 \pm 1,99$  cm; en una rata los 4 fetos (57,14%) del cuerno uterino derecho presentaron malformaciones morfológicas sobre el lado dorsal del cuerpo, estrechamiento alrededor de la parte posterior y gran desarrollo de la base de la pata anterior derecha y en el cuerno izquierdo se observaron 3 fetos con aspecto normal; en otra rata se encontraron 2 fetos muertos y denso líquido amniótico en el cuerno uterino derecho y 5 fetos con aspecto normal en el cuerno izquierdo, y en dos ratas se observaron 8 y 6 fetos con aspecto normal, respectivamente. En las SP se desarrollaron 21 fetos con características físicas normales, con peso y longitud promedio de  $6,16 \pm 0,99$

g y  $2,88 \pm 0,65$  cm de longitud. La relación peso fetal/longitud fetal (g/cm) en los grupos de ratas preñadas IP1 e IP2 fue significativamente menor en comparación con los fetos de las ratas SP ( $P < 0,00001$ ). La comparación del peso fetal y diámetro de las placentas entre las ratas IP1, IP2 y SP resultó significativa ( $P < 0,001$ ). En conclusión, la infección por diferentes cepas de *T. cruzi* en las ratas preñadas produce restricción patológica del crecimiento fetal, anomalías morfológicas estructurales y funcionales en los fetos y muerte fetal. Los fetos de las ratas SP no mostraron ninguna anomalía.

**Palabras clave:** *Trypanosoma cruzi*, rata Wistar, retardo del crecimiento fetal, anomalías morfológicas fetales.

### ABSTRACT

In the present study was analyzed the intrauterine development of Wistar rats fetuses that received an injection of  $2 \times 10^5$  bloodstream trypomastigotes of Planalto (IP1) and ASM (IP2) *Trypanosoma cruzi* strains. The rats with 12 days post-infection were mated; at day 20 the pregnant rats were sacrificed and its fetuses were extracted from the uterine horns in order to be evaluated. Healthy pregnant rats (HP) and virgin rats (CI1, CI2) were used as controls. The results showed that parasitemia was significantly ( $P < 0.05$ ) higher in pregnancy rats in comparison with the virgins rats CI1 and CI2 infected with different *T. cruzi* strains. The rats IP1, showed 19 fetuses with weight and measure average of  $2.86 \text{ g} \pm 2.19$  and  $2.63 \pm 1.17$  cm of length. One rat showed 1 fetus in the left uterine horn, other rat showed the left uterine horn with inflamed aspect and with fetal and placental rests, and 6 fetuses of normal aspect into right uterine horn; in two rats were observed 8 and 4 fetuses of normal aspect. The pregnant rats IP2, developed 28 fetuses with weight and measure average of  $2.77 \pm 0.77$  g and  $3.31 \pm 1.99$  cm; in

one rat, the 4 fetuses (57.14%) of right uterine horn presented morphological malformations on the dorsal side of the body, tightness around the body and development his anterior right footpad with big size and the left uterine horn of same rat was observed 3 fetuses with normal aspect; other rat showed 2 fetuses dead and dense amniotic liquid into right horn, and 5 fetuses with normal aspect in the left uterine horn, in two rats were developed 8 and 6 fetuses with normal aspect respectively. The HP development 21 fetuses with normal aspect of weight and measure average of  $6.16 \pm 0.99$  g and  $2.88 \pm 0.65$  cm of length. The relation weight/length fetal (g/cm) in infected pregnant rats groups IP1 and IP2 was significantly less in comparison with fetuses of HP rats ( $P < 0.00001$ ). The comparison of the fetal weight and placental diameters of IP1, IP2 and HP rats were significant ( $P < 0.001$ ). In conclusion, acute infection with different *T. cruzi* strains in pregnant rats, produces pathologic restriction of fetal growth, functional structural morphological anomalies in the fetuses and death of some fetuses. The fetuses of HP rats did not show any anomaly.

**Key words:** *Trypanosoma cruzi*, Wistar rats, fetal growth retardation, fetal morphological anomalies.

## INTRODUCCIÓN

La tripanosomiasis americana es una zoonosis muy compleja causada por *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* [9]. La enfermedad es endémica en algunas regiones del continente latinoamericano, donde la transmisión del parásito por las diferentes especies de triatominos puede efectuarse, en una gran variedad de hospedadores vertebrados, tanto en áreas rurales endémicas como en zonas libres de la infección chagásica [18]. Además de este mecanismo de transmisión vectorial, *T. cruzi* también puede ser transmitido a través de otras vías, tales como por trasplantes de órganos, transfusión de sangre y por la vía transplacentaria [10]. Esta vía de transmisión congénita de *T. cruzi* puede ocurrir durante cualquier etapa de la enfermedad de Chagas maternal, sin embargo, se ha observado alto riesgo de transmisión durante la fase aguda, la cual depende de factores individuales específicos, dado que cada madre gestante es susceptible de modificar la capacidad de controlar la transmisión de *T. cruzi* a nivel placentario o sistémico.

Diversos estudios han referido características epidemiológicas, biológicas y genéticas de las cepas de *T. cruzi*, como causas que provocan la transmisión congénita, destacando el efecto de los parásitos sobre los tejidos placentales de madres con infecciones precoces o tardías así como, con la duración del estímulo antigénico durante el desarrollo fetal intrauterino y con la respuesta inmunológica del recién nacido [13, 24]. Así mismo, el efecto de la infección sobre las placentas y los fetos pudiera deberse a las alteraciones en el complejo proceso biológico regulado por las hormonas durante la preñez, sin embargo, se desconocen los mecanismos propios de la madre que protegen del parásito el desarrollo fetal, encontrándose

que, solo una pequeña proporción de los recién nacidos de madres infectadas desarrollan la infección congénita, mientras que en otros embarazos de la misma madre, los hijos nacen libres de infección por *T. cruzi* [12].

Se ha considerado que la interacción materno-fetal en la infección por *T. cruzi*, se relaciona con la respuesta inmune supresora desarrollada por las altas parasitemias, por lo que la transferencia de antígenos de *T. cruzi* de la madre al feto, favorecería la capacidad de la progenie de responder a la infección al modular su sistema inmune [7, 32].

En relación a los recién nacidos infectados, se ha encontrado que no existe un perfil clínico único, por lo que diversas patologías se producen durante el desarrollo intrauterino de embriones de madres con enfermedad de Chagas, presentándose signos de calcificaciones cerebrales y microcefalia, así como alteraciones en las respuestas serológica y parasitológica, las cuales han sido atribuidas a la duración del estímulo antigénico y a la virulencia de las cepas de *T. cruzi*, factores que condicionan las manifestaciones clínicas, las cuales van desde niños con nacimiento prematuro y con importante morbilidad [4, 29].

Estudios experimentales de transmisión congénita realizados en ratones (*Mus musculus*) y en ratas (*Ratus norvegicus*) infectadas con diferentes cepas de *T. cruzi*, han mostrado el desarrollo de signos clínicos, pérdida fetal masiva, infertilidad e infección placentar y las han asociados con altas parasitemias y con la presencia de formas flageladas de *T. cruzi* en el líquido amniótico, considerando la virulencia y tropismo placentario de *T. cruzi*, como expresión del comportamiento biológico de los aislados de *T. cruzi*, favoreciendo la infección de los tejidos fetales y placentales de los animales y anomalías funcionales o moleculares en los fetos [3, 21]. En base a las consideraciones antes mencionadas en este estudio se propuso evaluar el desarrollo de fetos de rata Wistar con infección chagásica aguda, producida por dos cepas de *T. cruzi*, aisladas de diferentes fuentes y áreas geográficas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Cepas de *Trypanosoma cruzi*

Se utilizaron tripomastigotes sanguícolas de las cepas I/PAS/Ve/00/Planalto, aislada de un insecto heteróptero de la familia Reduviidae, *Panstrongylus geniculatus* capturado en una vivienda de una zona urbanizada en la ciudad de Caracas, Venezuela, y la cepa M/HOM/Ve/92/ASM aislada de un caso con infección chagásica. La caracterización molecular de las formas flageladas aisladas de los vectores fue realizada mediante ADN específico por Reacción de Cadena de Polimerasa (PCR) [14] y el genotipo TcI, mediante el método Randon Amplification of Polymorphic DNA (RAPD) con el primer A2 [8].

### Infección experimental y apareamiento de las ratas

Un total de 30 ratas hembras albinas cepa Wistar de 3 meses de nacidas y con 250 g de peso, fueron separadas en 5

grupos de 6 ratas cada uno: ratas preñadas infectadas con la cepa Planalto (IP1); ratas preñadas infectadas con la cepa ASM (IP2); ratas controles vírgenes infectadas con la cepa Planalto (CI1); ratas vírgenes infectadas con la cepa ASM (CI2); y ratas sanas preñadas (SP) fueron utilizadas.

La infección de las ratas fue realizada con tripomastigotes de *T. cruzi* contenidos en la sangre de ratones machos NMRI que presentaron altas parasitemias patentes, los cuales fueron sometidos a una cardiopuntura. Luego la sangre fue mezclada con solución salina estéril al 0,85% y el inóculo fue preparado estimando el número de parásitos en una cámara de Neubauer por examen directo microscópico (400x). La muestra fue diluida en solución salina para obtener  $2 \times 10^5$  parásitos en 0,05 mL de suspensión [5].

Un grupo de 24 ratas fueron inoculadas por inyección intraperitoneal de 0,05 mL de la suspensión de tripanosomas; los animales fueron separados en dos grupos: 12 ratas para ser preñadas y 12 ratas como control vírgenes infectadas. Para obtener la preñez, el grupo de 12 ratas con 12 días post-infección (pi) con las diferentes cepas de *T. cruzi*, así como a 6 ratas sanas, les fue examinado el ciclo estral, revisando una muestra del contenido vaginal coloreado con azul de metileno. La presencia de células nucleadas cornificadas y epiteliales en el moco vaginal dio evidencia de la condición de proestrus o estrus del ciclo estral [19]. Luego, las ratas fueron separadas colocando 2 ratas hembras con 1 macho por jaula durante tres días. La presencia de espermatozoides en el fluido vaginal fue indicativo de que ocurrió el apareamiento. Las SP fueron inyectadas con solución salina fisiológica. Los animales fueron mantenidos en condiciones controladas de temperatura ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ), humedad relativa (54%  $\pm$  5%) y alimentadas con Ratarina® comercial y agua *ad libitum*.

**Evaluación de la parasitemia patente**

La determinación de la parasitemia patente (PP) en las ratas infectadas preñadas IP1 e IP2, fue realizada en muestras de 5 mm<sup>3</sup> de sangre, colectadas de la punta de la cola de cada rata a los 12; 19; 24 y 34 días post-infección (pi) y con 0; 6; 12 y 20 días de gestación, respectivamente; la PP en las ratas vírgenes infectadas CI1 y CI2 fue revisada en los mismos días pi que las ratas preñadas.

**Extracción y revisión de los fetos**

A los 20 días de gestación, las ratas de los grupos IP1, IP2 y SP fueron sacrificadas y abiertos sus sacos uterinos de cada cuerno (mediante incisión longitudinal del lado mesometrial) para evaluar macroscópicamente los fetos, placentas y cordones umbilicales. Los fetos fueron lavados con solución fisiológica y revisados para determinar el peso (g), longitud fetal (cm), diámetro de las placentas (cm), longitud (cm) de los cordones umbilicales y características anatómicas externas.

**Análisis de los resultados**

Se determinaron las diferencias entre los niveles de parasitemia patente en los grupos de ratas infectadas por *T.*

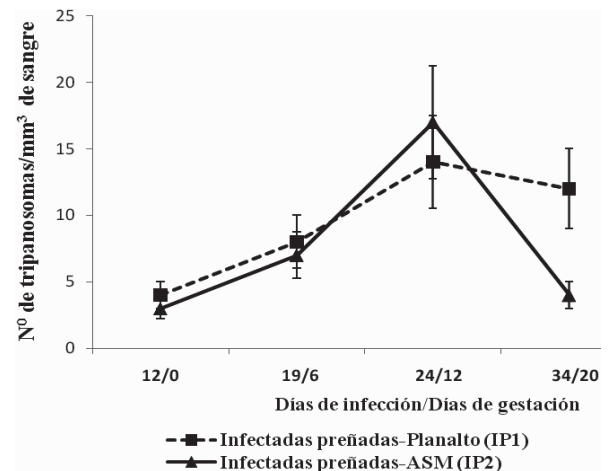
*cruzi*. Se realizó un análisis de varianza no paramétrico de un factor mediante la prueba Kruskal y Wallis (H) [16], para determinar las diferencias entre las variables fetales, placentales y cordón umbilical, en los grupos de ratas infectadas preñadas y sanas preñadas.

**Normas sobre el manejo de los animales**

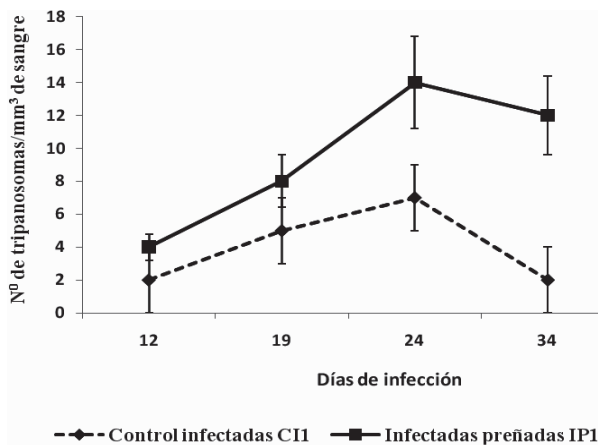
Los animales utilizados en el estudio fueron tratados siguiendo las normas establecidas para el manejo de animales experimentales en el laboratorio, por el comité de Bioética y Seguridad del Fondo Nacional de Ciencias y Tecnología en su capítulo 2 y Bioética animal en Venezuela [11].

**RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

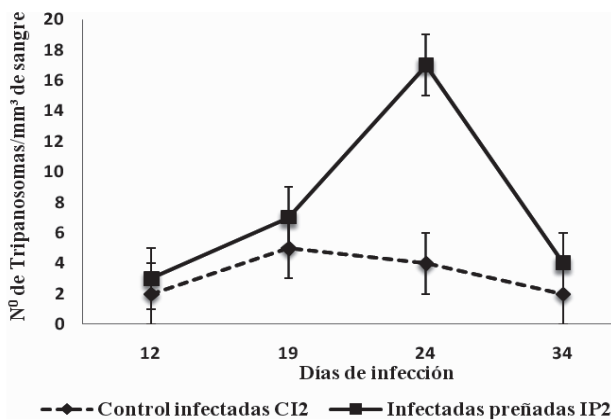
Los niveles más altos de PP fueron detectados a los 24 días pi, de  $14,0 \pm 4,3$  y  $17,0 \pm 4,3$  tripomastigotes/mm<sup>3</sup> de sangre en las ratas IP1 e IP2, respectivamente y con 12 días de preñadas, a partir de este tiempo las PP disminuyeron a  $12 \pm 5,1$  y  $4 \pm 3,6$  tripomastigotes/mm<sup>3</sup> de sangre, a los 34 días pi y con 20 días de gestación, cuando fueron sacrificadas. En las ratas controles vírgenes CI1 y CI2, los valores más altos de PP a los 24 días pi, fueron de  $7,0 \pm 2,2$  y  $4,9 \pm 0,8$  tripomastigotes/mm<sup>3</sup> de sangre, respectivamente. El curso de la PP en los grupos infectados se presenta en las FIGS. 1, 2 y 3. La comparación de las PP entre los grupos de ratas preñadas IP1 e IP2 resultó significativa ( $P < 0,05$ ). Las diferencias encontradas en las PP entre las ratas preñadas IP1 y vírgenes CI1 y entre las preñadas IP2 y vírgenes CI2 resultaron significativas ( $P < 0,05$ ).



**FIGURA 1. PARASITEMIA PATENTE EN RATAS WISTAR A LOS 12, 19, 24 Y 34 DÍAS DE INFECCIÓN CON LAS CEPAS Planalto (IP1) (---■---) Y ASM (IP2) (—▲—) DE *T. cruzi*, DETECTADAS A LOS 0, 6, 12 Y 20 DÍAS DE PREÑADAS  $\pm$  DESVIACIÓN ESTÁNDAR/ PATENT PARASITEMIA IN WISTAR RATS AT DAY 12, 19, 24 AND 34 OF INFECTION WITH PLANALTO (IP1) (---■---) AND ASM (IP2) *T. cruzi* STRAINS, DETECTED AT DAY 0, 6, 12 AND 20 OF PREGNANCY  $\pm$  STANDARD DEVIATION.**



**FIGURA 2. PARASITEMIA PATENTE EN RATAS WISTAR A LOS 12, 19, 24 Y 34 DÍAS DE INFESTADAS CON LA CEPA PLANALTO (IP1), DETECTADA A LOS 0, 6, 12 Y 20 DÍAS DE PREÑADAS (-■-) Y EN LAS RATAS CONTROLES VÍRGENES (C11) (---◆---) ENTRE 12 Y 34 DÍAS DE INFECCIÓN ± DESVIACIÓN ESTÁNDAR / PATENT PARASITEMIA IN WISTAR RATS AT DAY 12, 19, 24 AND 34 INFECTED WITH PLANALTO (IP1) *T. cruzi* STRAIN, DETECTED AT DAYS 0, 6, 12 AND 20 OF PREGNANCY (-■-) AND IN CONTROL VIRGIN RATS (C11) (---◆---) BETWEEN 12 AND 34 DAYS OF INFECTION ± STANDARD DEVIATION.**



**FIGURA 3. PARASITEMIA PATENTE EN RATAS WISTAR A LOS 12, 19, 24 Y 34 DÍAS DE INFECTADAS CON LA CEPA ASM (IP2) DETECTADA A LOS 0, 6, 12 Y 20 DÍAS DE PREÑADAS (-■-) Y EN LAS RATAS CONTROLES VÍRGENES (C12) (---◆---) ENTRE 12 Y 34 DÍAS DE INFECCIÓN ± DESVIACIÓN ESTÁNDAR / PATENT PARASITEMIA IN WISTAR RATS AT DAY 12, 19, 24 AND 34 OF INFECTED WITH ASM (IP2) *T. cruzi* STRAIN, DETECTED AT DAYS 0, 6, 12 AND 20 OF PREGNANCY (-■-) AND IN CONTROL VIRGIN RATS (C12) (---◆---) BETWEEN 12 AND 34 DAYS OF INFECTION ± STANDARD DEVIATION.**

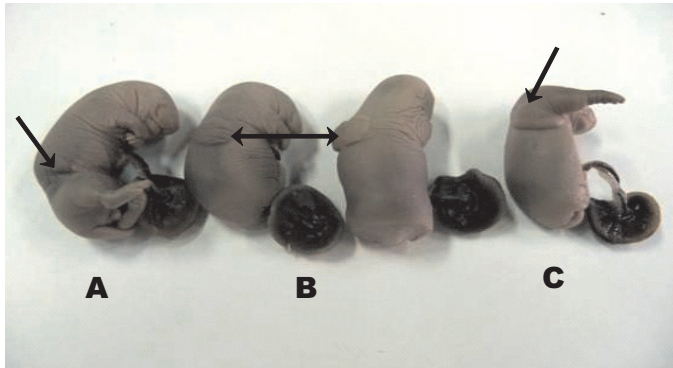
Varios factores han sido asociados con el efecto del incremento de la parasitemia en mujeres que transmitieron el parásito a sus fetos y los han relacionado, con la disminución de producción del interferón  $\gamma$  y del factor- $\alpha$  de necrosis tumoral en respuesta a los antígenos del parásito, causas comunes que provocan cambios en la estructura vascular con vasoconstricción del sistema útero-placenta, afectando el flujo placentario materno-fetal, limitando el aporte de nutrientes y oxígeno para el feto y severas patologías como el retardo en la organización, maduración y crecimiento de los tejidos [1, 2, 30]. En este estudio se observó que, a pesar que las ratas IP2 infectadas con la cepa ASM presentaron una mayor parasitemia, la que produjo mayores efectos en las variables analizadas fue la cepa Planalto, la PP en la sangre de las IP1 se mantuvo alta por más días de forma constante, afectando el desarrollo de los fetos, los cuales se encuentran con un sistema inmunológico inmaduro y con una carga hormonal materna en la circulación fetal [15]. Adicionalmente, de 12 ratas infectadas con dos cepas de *T. cruzi*, se preñaron 8 (66,6%), mientras que todas las ratas sanas resultaron preñadas, lo que sugiere afección uterina debido a la liberación de citocinas y hormonas en la sangre de madres con el aumento de la parasitemia materna, por lo que la especificidad del sistema inmune en el reconocimiento de los determinantes antigénicos del parásito, podría explicar los diferentes patrones en las parasitemias frente a las diferentes cepas de *T. cruzi* [20].

**Evaluación del desarrollo fetal y hallazgos clínicos en los fetos**

En relación con el desarrollo de los fetos en las ratas IP1 con 20 días de preñadas, se observó un total de 19 fetos en sus sacos uterinos. En una de las ratas se desarrolló un solo feto en el cuerno izquierdo del útero, mientras que en otra rata se desarrollaron 8 fetos de aspecto normal, en la tercera rata se observó el cuerno izquierdo del útero con aspecto inflamado y restos de fetos y placentas en los sacos uterinos y 6 fetos en el cuerno uterino derecho y en la cuarta se observaron 4 fetos de aspecto normal. En una rata IP2 con 20 días de preñadas se desarrollaron 28 fetos. En una se identificaron 4 fetos (57,14%) en el cuerno uterino derecho con malformaciones corporales, representadas por un estrechamiento alrededor de la parte inferior del cuerpo, protuberancias únicas o dobles sobre la región dorsal del cuerpo y gran desarrollo de la base de la pata anterior derecha (FIGS 4. A-C) y en el cuerno uterino izquierdo de la misma rata, se desarrollaron 3 fetos de aspecto anatómico normal; en otra rata se encontraron 2 fetos muertos (28,54%) en el cuerno uterino derecho y con el líquido amniótico sanguinolento y 5 fetos en el cuerno uterino izquierdo con apariencia normal y en dos ratas se desarrollaron 6 y 8 fetos respectivamente de aspecto normal. Las características de los fetos de las ratas IP1, IP2 y SP se muestran en la TABLA I.

La evaluación de los fetos de las ratas IP1 determinó un peso y longitud promedio de  $2,86 \pm 2,19$  g y  $2,63 \pm 1,17$  cm, con placentas de  $0,56 \pm 0,31$  g de peso y  $1,50 \pm 0,20$  cm de diámetro y cordones umbilicales de  $1,75 \pm 0,57$  cm de longi-





**FIGURA 4. FETOS DEL CUERNO UTERINO DERECHO DE RATA CON 20 DÍAS DE GESTACIÓN Y 34 DÍAS DE INFECTADA CON LA CEPA ASM DE *T. cruzi* CON ANOMALÍAS EN EL CUERPO: (A) CONSTRICCIÓN ALREDEDOR DE LA PARTE POSTERIOR DEL CUERPO, (B) PROTUBERANCIAS SOBRE LA REGIÓN DORSAL ANTERIOR DEL CUERPO Y (C) GRAN DESARROLLO DE LA BASE DE LA PATA ANTERIOR DERECHA (400X)/ FETUSES OF RIGHT UTERINE HORN PRESENTED IN RAT WITH DAY 20 OF GESTATION AND 34 DAYS OF INFECTION WITH ASM *T. cruzi* STRAIN WITH ANOMALIES ON ITS BODY: (A) TIGHTNESS AROUND THE BODY, (B) PROTUBERANCE ON THE DORSAL SIDE OF THE BODY AND (C) DEVELOPMENT OF ITS ANTERIOR RIGHT FOOTPAD WITH BIG SIZE. (400X).**

tud, mientras que en las ratas IP2, el peso y longitud promedio fetal fue de  $3,31 \pm 1,99$  g y  $2,77 \pm 0,77$  cm, con placentas de  $0,56 \pm 0,12$  g de peso y  $1,08 \pm 0,53$  cm de diámetro y cordones umbilicales de  $1,20 \pm 0,71$  cm de longitud. En las ratas controles no infectadas SP, se observó un total de 21 fetos con desarrollo intrauterino de aspecto normal, con peso y longitud promedio de  $6,16 \pm 0,99$  g y  $2,99 \pm 0,65$  cm, con placentas de  $0,83 \pm 0,17$  cm de diámetro y cordón umbilicales de  $0,97 \pm 0,86$  cm de longitud (TABLA II).

Los resultados del análisis de varianza no paramétrico de un factor mediante la prueba Kruskal y Wallis (H) mostraron, que el peso fetal fue significativamente diferente en los grupos de ratas IP1 e IP2 infectadas con las cepa Planalto y ASM, respectivamente y ratas sanas preñadas (SP) ( $P < 0,00001$ ), el diámetro de la placenta y la longitud del cordón umbilical mostraron diferencias significativas entre los grupos infectados IP1 y las ratas sanas SP ( $P < 0,00001$  y  $P < 0,0001$ , respectivamente) y entre los grupos infectados IP1 e IP2 ( $P < 0,0001$  y  $P < 0,01$ , respectivamente), no se encontraron diferencias significativas en las variables diámetro de la placenta y longitud del cordón umbilical entre los grupos infectados con la cepa ASM y las ratas sanas SP.

**TABLA I**  
**NÚMERO DE FETOS DE RATAS INFECTADAS CON CEPAS DE *T. cruzi* Y ANORMALIDADES FETALES, PLACENTALES Y UTERINAS/ NUMBER OF FETUSES OF RATS INFECTED WITH *T. cruzi* STRAINS AND FETAL, PLACENTAL AND UTERINES ANOMALIES.**

Número de Rata	Número de fetos	Cepa Planalto (IP1)		Anomalías encontradas
		Cuerno izquierdo del útero	Cuerno derecho del útero	
1	1	1 feto normal	-	-
2	8	5 fetos normales	3 fetos normales	-
3	6	-	6 fetos normales	Sacos uterinos del cuerno izquierdo inflamado con restos de fetos y de placentas
4	4	3 fetos normales	1 feto normal	-
Cepa ASM (IP2)				
Número de Rata	Número de fetos	Cuerno izquierdo del útero	Cuerno derecho del útero	Anomalías encontradas
1	7	3 fetos normales	4 fetos anormales	Feto 1. Estrechamiento alrededor de la parte inferior del cuerpo. Feto 2. Una protuberancia sobre el lado dorsal del cuerpo. Feto 3. Dos protuberancias sobre el lado dorsal del cuerpo. Feto 4. Base de la pata anterior derecha muy desarrollada.
2	7	5 fetos normales	2 fetos muertos	Líquido amniótico sanguinolento en el saco uterino derecho.
3	6	3 fetos normales	3 fetos normales	-
4	8	5 fetos normales	3 fetos normales	-

Ratas sanas preñadas (SP): 21 fetos normales

TABLA II

VALORES PROMEDIOS  $\pm$  DESVIACIÓN ESTÁNDAR Y PRUEBA DE KRUSKAL-WALLIS (H) CON SUS RESPECTIVOS NIVELES DE SIGNIFICACIÓN (P) PARA LOS PARÁMETROS FETALES Y PLACENTARIOS DE RATAS INFECTADAS CON DIFERENTES CEPAS DE *T. cruzi* Y DE RATAS SANAS PREÑADAS/ AVERAGE  $\pm$  STANDARD DEVIATION AND KRUSKAL-WALLIS (H) ANALYSIS WITH SIGNIFICATION LEVELS (P) FOR FETAL AND PLACENTAL PARAMETERS OF INFECTED RATAS WITH DIFFERENT *T. cruzi* STRAINS AND OF HEALTH PREGNAT RATS.

Variabes analizadas	Ratas preñadas sanas (Control) (n = 21 fetos)	Ratas preñadas infectadas con cepa ASM (n = 28 fetos)	Ratas preñadas infectadas con cepa PLANALTO (n = 19 fetos)	Kruskal-Wallis (H)
Longitud fetal (cm)	2,99 $\pm$ 0,65	2,77 $\pm$ 0,77	2,63 $\pm$ 1,17	2,0720
Peso fetal (g)	6,16 $\pm$ 0,99	3,31 $\pm$ 1,99	2,86 $\pm$ 2,19	35,1331***
Peso de placenta (g)	0,57 $\pm$ 0,11	0,56 $\pm$ 0,12	0,56 $\pm$ 0,31	2,2349
Diámetro de placenta (cm)	0,83 $\pm$ 0,17	1,08 $\pm$ 0,53	1,50 $\pm$ 0,20	20,3589***
Longitud del cordón (cm)	0,97 $\pm$ 0,68	1,20 $\pm$ 0,71	1,75 $\pm$ 0,57	13,6940*
Peso fetal/Longitud fetal (g/cm)	2,11 $\pm$ 0,43	1,07 $\pm$ 0,58	1,01 $\pm$ 0,71	32,9168***
Peso fetal/Peso de placenta (g/g)	11,10 $\pm$ 2,18	5,73 $\pm$ 3,74	4,86 $\pm$ 3,30	31,2464***
Peso fetal/Longitud del cordón (g/cm)	10,67 $\pm$ 9,72	3,08 $\pm$ 2,64	1,45 $\pm$ 0,91	32,7116***
Longitud fetal/Longitud del cordón (cm/cm)	4,92 $\pm$ 4,20	3,18 $\pm$ 1,72	1,49 $\pm$ 0,36	23,7087***
Longitud fetal/Diámetro de placenta (cm/cm)	7,62 $\pm$ 1,60	3,90 $\pm$ 3,92	1,80 $\pm$ 1,29	26,5801***
Diámetro de placenta/ Longitud del cordón (cm/cm)	1,48 $\pm$ 1,43	1,12 $\pm$ 0,75	0,92 $\pm$ 0,22	0,0283
Índice ponderal (g/cm <sup>3</sup> )	30,05 $\pm$ 21,52	12,45 $\pm$ 5,72	19,37 $\pm$ 23,62	17,9779**

Diferencia significativa: \*P<0,001 \*\*P<0,0001 \*\*\* P< 0,00001 n: número de fetos. (g) gramos, (cm) centímetro, (cm<sup>3</sup>) centímetro cúbico.

Se encontraron diferencias significativas en el índice ponderal (g/cm<sup>3</sup>), entre las ratas IP1 y SP (P<0,01) y entre IP2 y SP (P<0,00001), mientras que no se observaron diferencias entre los grupos infectados IP1 e IP2 (TABLA III). Este resultado indica que la restricción del crecimiento en los fetos de los grupos infectados es asimétrica, provocada por la reducción del flujo sanguíneo y transporte de glucosa a través de la placenta, la cual es regulada por las citocinas maternas, hecho crucial en el desarrollo fetal [15].

Se encontraron niveles de significancia (P<0,00001) en la relación, peso fetal/longitud fetal (g/cm), peso fetal/peso de placenta (g/g), peso fetal/longitud del cordón (g/cm), longitud fetal/longitud del cordón (cm/cm) y longitud fetal/diámetro de placenta (cm/cm) (P<0,001) entre los grupos de ratas infectadas IP1 y sanas SP y entre las infectadas IP2 y sanas SP, mientras que la longitud fetal, el peso de la placenta y la relación diámetro de la placenta/longitud del cordón umbilical, fueron las únicas variables que no presentaron diferencias significativas entre los grupos IP1, IP2 y SP (TABLA III).

Las relaciones peso fetal/longitud fetal, peso fetal/peso de la placenta, peso fetal/longitud de cordón y longitud fetal/diámetro de la placenta en los grupos de ratas infectadas preñadas IP1 e IP2 con las cepas Planalto y ASM, respectivamente, fueron significativas en relación al grupo de ratas sanas SP (P<0,00001) y peso fetal/longitud del cordón umbilical entre las ratas IP1 e IP2 (P<0,05) (TABLA III).

En infecciones experimentales por *T. cruzi*, la muerte fetal ha sido asociada con la parasitemia materna, calcificación intracraneal, infiltrado inflamatorio y necrosis isquémica en los órganos fetales, así como con el desarrollo de una respuesta inmune generada por la presencia del parásito, la cual limita el intercambio materno-fetal e induce resorción, probablemente debido a enfermedad de Chagas congénita [22, 23]. El hallazgo de fetos muertos en el líquido amniótico sanguinolento en cuernos uterinos de una rata infectada con la cepa ASM, así como, la inflamación intrauterina y restos fetales y placentales en los sacos uterinos de rata infectada con la cepa Planalto, estarían relacionados con el pasaje de parásitos de la madre a los fetos, causando lesiones e inflamación placentaria con predominio de neutrófilos, necrosis isquémica, depósitos de fibrina y trombosis vascular, que causan disminución en la transferencia de nutrientes de la madre al feto, limitando el crecimiento intrauterino de los embriones, como ocurre en los fetos de ratones BALB/infectadas con *T. cruzi* [26, 27].

Los resultados de este estudio, relacionados con el retardo en el desarrollo intrauterino de 47 fetos de las ratas IP1 e IP2 y la presencia de manifestaciones clínico patológicas, estructurales y funcionales desarrolladas en el 57,14% de los fetos de rata IP2, fueron similares a los encontrados en los fetos de ratones de la cepa NMRI infectadas con *T. cruzi* cepa Y [24, 28], los cuales mostraron miocarditis, miositis y antígenos específicos en la fibra muscular esquelética, hipoglucemia fetal

TABLA III

**PRUEBA DE KRUSKAL-WALLIS (H) PARA LAS COMPARACIONES ENTRE LAS RATAS PREÑADAS SANAS Y RATAS PREÑADAS INFECTADAS CON LAS CEPAS ASM Y PLANALTO DE *T. cruzi* QUE MOSTRARON DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS (P) Y SUS RESPECTIVOS NIVELES DE SIGNIFICACIÓN/ KRUSKAL-WALLIS (H) ANALYSIS FOR COMPARISONS BETWEEN THE HEALTHY PREGNANT RATS AND INFECTED PREGNANT RATS WITH ASM AND PLANALTO *T. cruzi* STRAINS THAT SHOWED SIGNIFICANT DIFFERENCES (P) AND SIGNIFICATION LEVELS.**

Variable analizadas	Ratas preñadas sanas/ Ratas preñadas infectadas cepa ASM	Ratas preñadas sanas/ Ratas preñadas infectadas cepa PLANALTO	Ratas preñadas infectadas cepa ASM/ Ratas preñadas infectadas cepa PLANALTO
Peso fetal (g)	28,2351*	24,7069*	0,0011
Diámetro de placenta (cm)	0,7035	29,2225*	5,6397**
Longitud del cordón (cm)	1,2131	15,2223***	5,5896**
Peso fetal/Longitud fetal (g/cm)	28,8829*	20,2173*	0.1880
Peso fetal/Peso de placenta (g/g)	23,9037*	23,1111*	0,2821
Peso fetal/Longitud del cordón (g/cm)	18,3454*	27,4706*	4,6071****
Longitud fetal/Longitud del cordón (cm/cm)	2,0288	22,0833*	13,1065*****
Longitud fetal/Diámetro de placenta (cm/cm)	11,5206*****	29,1979*	1,6921
Índice ponderal (g/cm <sup>3</sup> )	18,1718*	7,4089**	0,6433

Diferencia significativa: \*P<0,00001 \*\*P<0,01 \*\*\*P<0,0001 \*\*\*\*P<0,05 \*\*\*\*\*P<0,001. (g) gramos, (cm) centímetro, (cm<sup>3</sup>) centímetro cúbico.

e infiltración masiva de las placentas, debido a la activación del complemento por los parásitos en la interface materno-fetal, provocando muerte de los fetos [31].

Algunos autores han relacionado las alteraciones fetales con factores embriotróficos producidos por el oviducto, que inhiben la división celular y retardan el crecimiento fetal, por otro lado, la circulación de los parásitos en la sangre maternal a través de la placenta, provoca disminución de los niveles del factor de crecimiento epidérmico, que causa restricción patológica del peso fetal y morbilidad perinatal, debido al anormal funcionamiento en las placentas de mujeres con enfermedad de Chagas [6, 17]. Los mecanismos que afectan la implantación y normal desarrollo de embriones, en madres con enfermedad de Chagas, así como el desarrollo de diversas alteraciones en sus fetos se considera que dependen de la capacidad materno-fetal para desarrollar una respuesta inmune específica eficaz en el control de la multiplicación de *T. cruzi* [25], el cual se caracteriza por presentar diferencias en el comportamiento biológico en la relación parásito-hospedador, dada la gran variabilidad en los patrones de infectividad y patogenicidad de las cepas de *T. cruzi*.

## CONCLUSIONES

Las infecciones producidas por aislados con genotipo TcI, obtenidos de diferente fuente y áreas geográficas, desarrollaron en las ratas preñadas, infección más rápidamente y con elevadas parasitemias que los grupos controles vírgenes.

Las diferentes cepas de *T. cruzi* afectaron el desarrollo intrauterino de los fetos de rata, como lo revelan la pérdida del

peso fetal, las relaciones peso fetal/longitud fetal, peso fetal/peso de placenta, peso fetal/longitud del cordón, longitud fetal/longitud del cordón y longitud fetal/diámetro de placenta. Restos fetales y placentales así como, fetos muertos en el líquido amniótico sanguinolento, inflamación uterina y anomalías estructurales sobre el cuerpo de los fetos de rata con alta parasitemia fueron observados.

Se adelantan estudios en la detección de aspectos parasitológicos, inmunológicos y moleculares, en las protuberancias encontradas en el cuerpo de los fetos, en los tejidos cardíaco, digestivo y muscular esquelético fetales, placentarios y uterinos de las ratas con infección chagásica aguda producida por *T. cruzi*.

Estos resultados, constituyen un aporte a futuras investigaciones utilizando cepas de aislados venezolanos, que permitan el esclarecimiento de las complejas interacciones y mecanismos involucrados en la resistencia o susceptibilidad a la infección congénita, en áreas rurales endémicas y especialmente en zonas urbanas no endémicas para la enfermedad de Chagas, donde el parásito circula entre la población humana, vectores intradomiciliarios, reservorios silvestres y animales domésticos.

Finalmente, se recomienda la utilización de formas metacíclicas del parásito y las vías de inoculación intradérmica o subcutánea, en infecciones experimentales de animales en gestación, a fin de clarificar la influencia de cepas de *T. cruzi* venezolanas, sobre la presentación clínica en áreas no endémicas para la enfermedad de Chagas congénita.

## AGRADECIMIENTO

Al Consejo de Desarrollo Científico, Humanístico y Tecnológico (CDCHT) de la Universidad de los Andes, proyecto C-1487-07-03-A y Fondo Nacional de Ciencias, Tecnología e Innovación (FONACIT) proyecto 200500827, por el apoyo a esta investigación.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ABDERKARIM, M.; LAMBOT, M.A.; STEWART, I.J.; DETOURNAY, O.; NOEL, J. CH.; CARLIER, Y.; TRUYENS, C. Acute *Trypanosoma cruzi* infection in mouse induced infertility or placental parasite invasion and ischemic necrosis associated with massive fetal loss. **Am. J. Pathol.** 161:673-680. 2002.
- [2] ACOSTA-SERRANO, A.; ALMEIDA, I.C.; FREITAS-JUNIOR, L.H.; YOSHIDA, N.; SCHENKMAN, S. The mucin-like glycoprotein superfamily of *Trypanosoma cruzi*: structure and biological roles. **Mol. Biochem. Parasitol.** 114:143-150. 2001.
- [3] ALARCÓN, M.; LUGO DE Y, A.; MORENO, E.; PAYARES, G.; ARAUJO, S.; COLMENARES, M. Presencia de *Trypanosoma cruzi* en tejidos de ratas Wistar infectadas experimentalmente y sus fetos. **Bol. Malarial. Salud. Amb.** XLVI (2):137-148. 2006.
- [4] BLANCO, S.; SEGURA, E.; CURA, E.; CHUIT, R.; TULIAN, L.; FLORES, I.; GARVARINO, G.; VILLALONGA, J.F.; GURTNER, R. Congenital transmission of *Trypanosoma cruzi*: An operational outline for detecting and treating infected infants in north-wester Argentina. **Trop. Med. Int. Health.** 5:293-301. 2000.
- [5] BRENER, Z. Observações sobre a imunidade a superinfecções em camundongos experimentalmente inoculados com *Trypanosoma cruzi* e submetidos a tratamento. **Inst. Med. Trop.** São Paulo. 4:119-123. 1962.
- [6] BOUFKER, H.; ALEXANDER, H.; CARLIER, Y.; TRUYENS, C. Infertility in murine acute *Trypanosoma cruzi* infection is associated with inhibition of pre-implantation embryo development. **Am. J. Pathol.** 169:1730-1738. 2006.
- [7] CARLIER, Y.; TRUYENS, C. Influence of maternal infection on offspring resistance towards parasites. **Parasitol. Today.** 11:94-99. 1999.
- [8] CARRASCO, H.J.; FRAME, I.; VALENTE, S.; MILES, M. Genetic exchange as a possible source of genomic diversity in sylvatic population on *Trypanosoma cruzi*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 54:418-424. 1996.
- [9] CHAGAS, C. Nova trypanosomiasis humana. Estudo sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi*, N. Gen. **Mem. Inst Oswaldo Cruz** 1:159-218. 1909.
- [10] DAO, L. Otros casos de enfermedad de Chagas en el estado Guárico (Venezuela): formas agudas y crónicas; observación sobre la enfermedad de Chagas congénita. **Rev. Policlin.** Caracas, Venezuela. 17:17-32. 1949.
- [11] DE JESÚS, R. Bioética animal en Venezuela. **Rev. Fac. Farmacia.** ULA. 43:15-18. 2002.
- [12] ERLEBACHER, A. Why isn't the fetus rejected? **Curr Opin Immunol.** 13:590-593. 2001.
- [13] FERNANDEZ-AGUILAR, S.; LAMBOT, M.A.; TORRICO, F.; ALONSO-VEGA, C.; CORDOVA, M.; SUAREZ, E.; NOEL, J.; CARLIER, Y. Las lesiones placentarias en la infección humana por *Trypanosoma cruzi*. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** 38:84-86. 2005.
- [14] GONZALEZ, N.; GALINDO, I.; GUEVARA, P.; SCORZA, J.V.; AÑEZ, N. Identification and detection of *Trypanosoma cruzi* by using a DNA amplification fingerprint obtained from the ribosomal intergenic spacer. **J. Clin. Microbiol.** 32:153-158. 1994.
- [15] KAMEI, Y.; TSUTSUMI, O.; YAMAKAWA, A.; OKA, Y.; TAKETANI, Y.; IMAKI, J. Maternal epidermal growth factor deficiency causes fetal hypoglycemia and intrauterine growth retardation in mice: possible involvement of placental glucose transporter GLUT3 expression. **Endocrinol.** 140:4236-4243. 1999.
- [16] KRUSKAL, W.; WALLIS, W.A. Use of ranks in one-criterion variance analysis. **J. Am. Statist Assoc.** 47(260):583-621. 1952.
- [17] LIN, S.; SARTORI, J.; MEZZANO, L.; DE FABRO, S. Epidermal growth factor (EGF) in the humans placental infections with *Trypanosoma cruzi*. **Placenta** 25:283-286. 2004.
- [18] MALLIMACI, M.; SIJVARGER, C.; DATES, A.; ALVAREZ, N. M; SOSA-ESTANI, S. Seroprevalencia de la enfermedad de Chagas en Ushuaia, Argentina una zona sin triatominos. **Rev. Panam. Salud Púb.** 9:169-171. 2001.
- [19] MARCONDES, F.K.; BIANCHI, F.J.; TANNO, A.P. Determination of the estrous cycle phases of rats: Some helpful considerations. **Braz. J. Biol.** 62:609-614. 2002.
- [20] MJIHDI, A.; LAMBOT, M.; STEWART, I.J.; DETOURNAY, O., NOËL, J.C.; CARLIER, Y.; TRUYENS, C. Acute *Trypanosoma cruzi* infection in mouse induces infertility or placental parasites invasion and ischemic necrosis associated with massive fetal loss. **Am. J. Pathol.** 161:673-780. 2002.
- [21] MORENO, E.; RIVERA, I.; MORENO, S.; ALARCÓN, M.; LUGO-Y, A. Transmisión vertical de *Trypanosoma cruzi* en ratas Wistar durante la fase aguda de la infección. **Invest. Clin.** 44:241-254. 2003.
- [22] MORENO, E.; ARAUJO, M.; ALARCÓN, M.; LUGO DE Y, A.; ARAUJO, S.; BORGES, R. Efecto de la infección



- chagásica aguda en ratas Wistar gestantes. **Rev. Científ FCV-LUZ**. XVI (5): 506-516. 2006.
- [23] PEHRSON, P.; WALHGREN, M.; BENGTTSSON, N. Intracranial calcification probably due to congenital Chagas' disease. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 3:449-452. 1982.
- [24] PÉREZ, M.C.; ALARCÓN, M.; GONCALVES, L.; LUGO DE Y, A.; MORENO, E.; ARAUJO, S.; VILLARREAL, J. Anomalías morfológicas y estructurales en fetos de ratones con infección aguda experimental por *Trypanosoma cruzi*. **Bol. Malariol. Salud. Amb.** XLVII (2):127-134. 2008.
- [25] PÉREZ, M.C.; GONVALVES, L.; ALARCÓN, M. Transmisión congénita por *Trypanosoma cruzi*: Aspectos de la respuesta inmune fetal. **Bol. Malariol. Salud. Amb.** XLIX (2):175-180. 2009.
- [26] SALA, M.G.; LOPES, R.A.; CARRARO, A.A.; MENEQUETTE, C. Efecto de la infección aguda por diferentes cepas de *Trypanosoma cruzi* sobre el crecimiento intrauterino de fetos de ratón. **Parasitol. Latinoam.** 73:69-73. 2006.
- [27] SCRIMSHAW, N.S.; SCHÜRCH, B. Causes and consequences of intrauterine growth retardation. **Eur. J. Clin. Nutr.** 52 (Suppl 1):S1-S103. 1998.
- [28] SOLANA, M.E.; CELENTANO, A.M.; TEKIEL, V.; JONES, M.; GONZÁLEZ- CAPPÀ, S.M. *Trypanosoma cruzi*: Effect of parasite subpopulation on murine pregnancy outcome. **J. Parasitol.** 88:102-106. 2000.
- [29] TORRICO, F.; VEGA, A.; SUÁREZ, E.; RODRÍGUEZ, P.; TORRICO-CRUZ, M.; DRAMAIX, M.; TRUYENS, C.; CARLIER, Y. 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. 2004.
- [30] TRUYENS, H.; ALONSO-VEGA, C.; RODRÍGUEZ, P.; BERTHE, A.; TORRICO, F.; CARLIER, Y. Congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* is associated with maternal enhanced parasitemia and decreased productions of interferon-gamma in response to parasite antigens. **J. Infect. Dis.** 189:1278-1281. 2004.
- [31] XU, C.; MAO, D.; HOLERS, V.; PALANCA, B.; CHENG, A.M.; MOLINA, N. A critical role for murine complements regulatory crry in fetomaternal tolerance. **Scie.** 21:498-501. 2000.
- [32] ZAIDENBERG, M. Enfermedad de Chagas congénita en la Provincia de Salta, Argentina años 1980-1997. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** 32(6):689-695. 1999.