

# EFECTO DE LA INFECCIÓN AGUDA CON *TRYPANOSOMA CRUZI* SOBRE EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL DE RATA GESTANTE

Ana Lugo de Yarbuh<sup>1</sup>, Johan Rondón<sup>2</sup>, Maritza Alarcón<sup>3</sup>, Elio Moreno<sup>4</sup>, Sonia Araujo<sup>5</sup>

**RESUMEN:** Este estudio analizó el efecto de la infección aguda con *Trypanosoma cruzi* sobre la histología del sistema nervioso central de ratas durante la gestación. Las ratas Wistar fueron infectadas por inoculación intraperitoneal de  $5 \times 10^4$  tripanosomas sanguícolas de la cepa M/HOM/Bra/53/Y. Para obtener la preñez durante el ascenso de la parasitemia, las ratas en estrus del ciclo menstrual fueron apareadas con los machos a los 12 días posinfección (pi). Ratas vírgenes/infectadas, vírgenes/sanas y sanas/preñadas fueron usadas como controles. Altos niveles de parasitemia patente (PP), de  $36 \pm 2,9$  a  $55 \pm 3,0$  tripanosomas/mm<sup>3</sup> de sangre en las ratas con 16 y 22 días de infección y con 6 y 12 días de gestación respectivamente fueron observados. La comparación de la PP entre las ratas infectadas/preñadas y vírgenes/infectadas fue significativa al 1 %. A los 30 días pi las ratas fueron sacrificadas y el cerebro (C) y las regiones cervical (RC), torácica (RT), lumbar (RL) y sacra (RS) de la ME fueron fijadas en formalina al 10 %, deshidratadas e incluidas con Paraplast. Los cortes de 7  $\mu$ m coloreados con hematoxilina y eosina mostraron reacción inflamatoria de células polimorfonucleares, mononucleares y plasmocitos en contacto con los cuerpos neuronales del C de las ratas infectadas/preñadas. La comparación entre el número de linfocitos en los hemisferios derecho (HD) e izquierdo (HI) de  $65 \pm 6,3$  y  $48 \pm 4,5$  linfocitos en las ratas infectadas/preñadas y de  $20 \pm 2,0$  y  $13 \pm 1,1$  linfocitos en las ratas sanas/preñadas fue significativa ( $P < 0,05$ ). La comparación del número de linfocitos en los HD y HI de las ratas vírgenes/sanas vírgenes/infectadas no reveló diferencias. La disminución de motoneuronas (MN) de  $35 \pm 3,4$  a  $16 \pm 1,7$  en la RC, de  $33 \pm 3,1$  a  $21 \pm 3,0$  en la RT y de  $31 \pm 3,8$  a  $10 \pm 1,8$  en la RL, de la ME de las ratas infectadas/preñadas fue significativa ( $P < 0,05$ ) en comparación con el número de MN en la ME de las ratas sanas/preñadas. La disminución de MN de  $53 \pm 4,9$  a  $35 \pm 3,4$  en la médula cervical y de  $37 \pm 3,3$  a  $22 \pm 1,9$  MN en la médula sacra fue observada, cuando se comparó con el número de MN en las ratas vírgenes/sanas y sanas/preñadas. El ensayo inmunocitoquímico de las secciones del C, usando Proteína Ácida Fibrilar Glial, inmunofluorescencia indirecta-Ioduro de Propídio y Peroxidasa-anti Peroxidasa, revelaron amastigotes y antígeno de *T. cruzi* en los hemisferios cerebrales de las ratas infectadas/preñadas. En conclusión, el incremento de la PP y la tripanosomiasis cerebral en las ratas, pudiera relacionarse con los cambios en la respuesta inmune de las ratas infectadas en gestación, favoreciendo la penetración de los parásitos al C. Es probable que la presencia del parásito en el C de las ratas, ocurre por la migración de leucocitos infectados con *T. cruzi*, a través de la barrera sanguínea cerebral. El desarrollo de condiciones inflamatorias en los tejidos cerebral y medular y la despoblación neuronal en la ME de las ratas infectadas/preñadas, podrían inducir desórdenes neuropatológicos en las madres preñadas.

**Palabras clave:** Ratas, Embarazo, *Trypanosoma cruzi*, Chagas agudo, Cerebro, Médula espinal, Motoneuronas.

**ABSTRACT:** This study analyzed the effect of acute infection with *Trypanosoma cruzi* on the histology of Central Nervous System (CNS) of rats during pregnancy. Wistar rats were infected by intraperitoneally inoculation of  $5 \times 10^4$  blood trypomastigotes of the M/HOM/Bra/53/Y strain. To obtain pregnancies during the ascending phase of parasitemia, rats in estrus of its menstrual

<sup>1</sup> Profesora Titular. Laboratorio de Parasitología Experimental, Facultad de Ciencias, Universidad de Los Andes, Mérida.

<sup>2</sup> Licenciado en Biología. Asistente del Laboratorio de Parasitología Experimental, Facultad de Ciencias, Universidad de Los Andes, Mérida.

<sup>3</sup> Profesora Agregada. Laboratorio de Parasitología Experimental, Facultad de Ciencias, Universidad de Los Andes, Mérida.

<sup>4</sup> Profesor Titular. Laboratorio de Parasitología Experimental, Facultad de Ciencias, Universidad de Los Andes, Mérida.

<sup>5</sup> Licenciada en Biología. Asistente del Laboratorio de Parasitología Experimental, Facultad de Ciencias, Universidad de Los Andes, Mérida.

Recibido: 22-09-08.  
Aceptado: 27-05-09.

cycle were matched with males at days 12 after infection (pi). Virgin/infected, virgin/healthy and healthy/pregnant rats were used as controls. High levels of patent parasitemia (PP) of  $36 \pm 2.9$  to  $55 \pm 3.0$  tripanosomas/mm<sup>3</sup> blood, were observed in rats between 16 and 22 infection days and between 6 and 12 pregnancy days respectively. The comparison of the PP between infected/pregnant rats and virgin/infected rats was significant at 1 %. At the 30 days pi rats were sacrificed. Brain (B) and regions cervical (CR), thoracic (TR), lumbar (LR) and sacra (SR) of Spinal cord (SC) samples were obtained and fixed in formalin to 10 %, dehydrated and embedded in Paraplast. The sections (7  $\mu$ m) stained with Hematoxylin and Eosin showed inflammatory reaction of polymorphonuclear and mononuclear cells and plasmocytes in contact with neurons of B of the infected/pregnant rats. The comparison between lymphocytes number in the right (HR) ( $65 \pm 6.3$ ) and left (HL) ( $48 \pm 4.5$ ) cerebral hemispheres of infected/pregnant rats and of  $20 \pm 2.0$  and  $13 \pm 1.1$  lymphocytes in healthy/pregnant rats was significant ( $P < 0.05$ ). The comparison between lymphocyte number in the HR y HL of the virgin/healthy rats and virgin/infected rats not showed differences. Motoneurons (MN) reduction of  $35 \pm 3.4$  to  $16 \pm 1.7$  in CR, of  $33 \pm 3.1$  to  $21 \pm 3.0$  in TR and of  $31 \pm 3.8$  to  $10 \pm 1.8$  in LR of the SC of infected/pregnant rats was significant ( $P < 0.05$ ), when they were compared with MN number in SC of healthy/pregnant rats. Reduction of MN of  $53 \pm 4.9$  to  $35 \pm 3.4$  in the CR and of  $37 \pm 3.3$  to  $22 \pm 1.9$  in the SR of the SC was observed, when they were compared with MN number between virgin/healthy and healthy/pregnant rats. The immunocytochemical assay of sections of B using Glial Fibrillar Acid Protein, Indirect immunofluorescence-Propidium Iodide and Peroxidase-anti-Peroxidase, showed infection with presence of amastigotes and *T. cruzi* antigen in the cerebral hemispheres of infected/pregnant rats. Therefore it might be conclude that the increase of the PP and the cerebral trypanosomiasis in rats could be related to the changes in the immune response of the infected rats during gestation, favoring brain penetration of parasites. It might be probable that the presence of the parasite in the B of these rats, took place by the transmigration of infected inflammatory leukocytes cross the blood-brain barrier. The development of focal lymphocytes infiltrates in the cerebral and medular tissues and loss of MN in the SC of the infected/pregnant rats might induce neuropathological disorders in the pregnant mother.

**Key words:** Rat, Pregnant, *Trypanosoma cruzi*, Acute Chagas' disease, Brain, Spinal cord, Motoneurons.

## INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana es una entidad clínica causada por *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*, protozoario hemoflagelado de la familia Trypanosomatidae, cuya reproducción intracelular destruye los tejidos en los hospedadores susceptibles<sup>(1)</sup>. Constituye por sí misma un problema de salud pública en los diversos países de América Latina, afectando entre 16 a 18 millones de personas aproximadamente, así como en poblaciones expuestas al riesgo de infección, las cuales se encuentran habitando principalmente las áreas rurales donde las condiciones ecológicas favorecen la infección de los insectos transmisores<sup>(2)</sup>.

En la naturaleza la principal vía de transmisión se presenta mediante el contacto directo del parásito con los insectos vectores de la familia Reduviidae, subfamilia Triatominae, los cuales se infectan durante la ingesta sanguínea sobre humanos y otros vertebrados al ingerir los tripomastigotes en la sangre periférica. Una vez en el tubo digestivo de los insectos, los tripomastigotes se transforman en amastigotes en el estómago, en epimastigotes en el intestino y al llegar al recto se

convierten en tripomastigotes metacíclicos, los cuales salen al exterior junto con las excretas posprandiales de los triatominos<sup>(3)</sup>. En el 50 % de las personas infectadas la puerta de entrada del parásito se evidencia mediante reacciones cutánea, pudiéndose desarrollar la fase aguda inicial una vez en el hospedador o pasar de manera inadvertida a una fase indeterminada y luego a una fase crónica la cual persiste de por vida en el hospedador.

En los últimos años el modo de transmisión de la enfermedad de Chagas ha mostrado importantes cambios debido a circuitos urbanos de transmisión de *T. cruzi* menos dependientes de los vectores transmisores, favorecido por la migración interna de personas infectadas desde áreas endémicas hacia zonas no endémicas, donde la transmisión de *T. cruzi* suele ocurrir a través de otros mecanismos alternos, provocando el desarrollo de meningoencefalitis aguda y tumores en el cerebro de pacientes que recibieron transfusiones de sangre infectada con *T. cruzi*<sup>(4)</sup>, por trasplantes de órganos, contaminación oral a través de la lactancia o por transmisión congénita<sup>(5)</sup>.

La enfermedad de Chagas investigada tanto en

humanos como en modelos mamíferos experimentales por un importante número de autores, han referido que la frecuencia de la infección y la destrucción de los tejidos comprometidos varía con la procedencia de las cepas de *T. cruzi*, tropismo celular, virulencia y patogenicidad<sup>(6)</sup>, provocando compromiso miocárdico, digestivo de madres chagásicas durante el embarazo<sup>(7)</sup> y en algunos casos la infección del sistema nervioso de pacientes inmunosuprimidos con formación de masas tumorales y agresión a las motoneuronas medulares<sup>(8)</sup>. Otras investigaciones han observado cambios inflamatorios discretos en el sistema nervioso central (SNC), con incremento de la parasitemia patente en un bajo porcentaje de mujeres durante el último trimestre de gestación y han considerado, que la tripanosomiasis cerebral pudiera ser incluida en el diagnóstico diferencial de las lesiones intracraneales, producidas por el ataque de *T. cruzi* a las células nerviosas y destruidas por los antígenos intracelulares, tanto en pacientes bajo terapias inmunosupresivas como en madres con infección crónica y en gestación<sup>(9,10)</sup>. En base a las investigaciones anteriormente comentadas nos planteamos en este estudio, evaluar si los efectos de la infección por *T. cruzi* sobre el SNC se potencian con la gestación, mediante el estudio de las alteraciones histopatológicas, en el cerebro y médula espinal de ratas preñadas con infección chagásica aguda en comparación con los tejidos nerviosos de ratas sanas preñadas.

## MÉTODOS

**Parásitos.** Se utilizaron tripomastigotes sanguíneos de la cepa M/HOM/Bra/53/Y (TcIb), aislada mediante el xenodiagnóstico de un caso chagásico agudo en Brasil<sup>(11)</sup>. Los parásitos fueron cedidos por la Cátedra de Parasitología de la Universidad de Carabobo y mantenidos en nuestro laboratorio por pasajes en medio de cultivo NNN-USAMRU<sup>(12)</sup>, triatomos y ratones NMRI.

**Inóculo.** Los parásitos fueron obtenidos a partir de ratones machos NMRI los cuales fueron infectados por inyección vía intraperitoneal con sangre de ratón infectada con *T. cruzi*. A los 10 días posinfección (pi) los ratones donadores que cursaban altas parasitemias patentes fueron ligeramente anestesiados y luego sangrados por cardiopuntura. La sangre fue mezclada con solución salina estéril al 0,85 % y los tripanosomas fueron cuantificados en  $5 \mu\text{L}$  de la suspensión. El número de parásitos fue contado y ajustado a fin de obtener un

inóculo de  $5 \times 10^4$  tripanosomas/0,1 mL de suspensión sanguínea<sup>(13)</sup>.

**Antígeno de *T. cruzi*.** Los tripanosomas fueron masificados en el medio de cultivo NNN a 26° C durante 15 días, luego fueron sonicados (Ultrasonic Processor VCX 130 PB), centrifugados a 603 g por 30 min y en la porción soluble fue determinada la concentración de proteínas (Folling-Lowry) hasta tener 15 000  $\mu\text{g}$  de proteínas/mL de suspensión antigénica para la inmunización de los conejos.

**Obtención de suero de conejo anti-*T. cruzi*.** Dos conejos machos (*Silvilagus floridianus*) de 2 kg de peso fueron inyectados por vía intramuscular con dosis de 0,5 mL de la suspensión antigénica de *T. cruzi*. En la primera inyección, fue mezclado 0,5 mL del antígeno con 0,5 mL de adyuvante incompleto de Freund's, las siguientes inyecciones consistieron del antígeno solamente. La sangre de los conejos fue extraída por cardiopuntura y luego de la retracción del coágulo, el suero de conejo anti-*T. cruzi* fue centrifugado a 5° C a 603 g por 30 min y usado en las reacciones inmunocitoquímicas.

**Grupos de ratas.** 24 ratas hembras albinas (*Rattus norvegicus*) de la cepa Wistar, de 200 g de peso fueron separadas en 4 grupos de 6 ratas cada uno: ratas vírgenes/sanas (control sano), ratas vírgenes/infectadas con *T. cruzi* (control infectado), ratas sanas/preñadas (control sano gestante) y ratas infectadas/preñadas.

**Infección experimental con *T. cruzi* y apareamiento.** Un total de 12 ratas fueron inoculadas por vía intraperitoneal con  $5 \times 10^4$  tripomastigotes sanguíneos. A los 10 días pi, el grupo de 6 ratas infectadas junto con 6 ratas del grupo control sanas/gestante, les fue determinado el ciclo estral examinando una muestra vaginal coloreada con azul de metileno. La presencia de células nucleadas y células epiteliales cornificadas en el moco vaginal, dio evidencia de que estaban en proestrus o estrus del ciclo estral<sup>(14)</sup>. Las ratas fueron colocadas en jaulas en una relación 2 hembras/1 macho durante 2 días y una vez comprobada la presencia de espermatozoides en el frotis vaginal, las hembras fueron separadas de los machos y mantenidas en condiciones controladas con ratarina y agua *ad libitum*.

**Separación del cerebro y de la médula espinal.** Las ratas infectadas con *T. cruzi* al término de la gestación y los grupos controles: ratas sanas/preñadas, vírgenes/infectadas y vírgenes/sanas, fueron sacrificadas. El cerebro (C) y fragmentos de las regiones cervical (RC), lumbar (RL), torácica (RT) y sacra (RS) de la médula espinal (ME) fueron extraídos de todos los animales,

fijados en formalina neutra al 10 %, deshidratados en alcohol isopropílico, alcohol-acetona 1:1, acetona-xilol 1:1, xilol, xilol-paraplast 1:1 a 60° C durante 12 h, incluidos en paraplast a 56° C por 12 h (Monoject Scientific, St. Louis, MO. EE.UU). Los tejidos fueron cortados en secciones de 7  $\mu$ m y coloreados con hematoxilina y eosina.

**Reacciones inmunocitoquímicas:** Los cortes de los hemisferios derecho (HD) e izquierdo (HI) del C y de la ME de las ratas infectadas/gestantes y de los grupos controles fueron desparafinados, hidratados e incubados con suero normal de cabra al 30 % en buffer fosfato salino y Tritón al 0,1 % por 30 min, lavados con PBS a pH 7,2 e incubados con suero de conejo anti-*T. cruzi* 1:300 en PBS a pH 7,2, y con el anticuerpo anti-IgG de rata marcado con Isotiocianato de Fluoresceína (FITC) (Sigma, St. Louis, EE.UU), diluido 1:500 en PBS<sup>(15)</sup>, incubados con yoduro de propidio (IP) (marcador nuclear) (Molecular probe, Inc. EE.UU) diluido 1:1 000 con PBS a pH 7,2, cubiertos con glicerina 9:1 en solución salina y cubreobjeto para la observación en el microscopio (CCD System, Olympus Optical CO., Japan).

**Proteína ácida fibrilar glial (GFAP -IFI-IP):** Un segundo grupo de cortes de los HD y HI y de las regiones de la ME fueron desparafinados, hidratados e incubados con el anticuerpo monoclonal anti-proteína ácida fibrilar glial (GFAP) (Sigma, St. Louis, EE.UU) diluido 1:80 durante 24 h a 4° C, antisuero de conejo anti-*T. cruzi*, suero de rata IgG conjugado con FITC diluido 1:500 en PBS a pH 7,2 durante 1 h y lavados con PBS a pH 7,2. Los núcleos de los cuerpos neuronales fueron marcados con yoduro de propidio diluido 1:1 000 durante 1 h y las preparaciones fueron lavadas con PBS y cubiertas con glicerina 9:1.

**Peroxidasa antiperoxidasa:** Un tercer grupo de cortes de los HD, HI del C y de las regiones de la ME desparafinados e hidratados, fueron incubados con peróxido de hidrógeno al 5 % en metanol durante 30 min, lavados con PBS a pH 7,2, incubados con suero de conejo anti-*T. cruzi* diluido 1:300, lavados con PBS e incubados con anti-rabbit IgG conjugado con peroxidasa (Sigma, St. Louis, EE.UU) diluido 1:200 en PBS a pH 7,2, luego fueron contrastados con 3,3 tetracloruro de diaminobencidina (DAB) durante 45 min, contracolorados con hematoxilina de Mayer durante 1 min y montados con Mar-TeX<sup>(16)</sup>.

**Análisis estadístico:** El análisis fue realizado usando una prueba de *t* Students' para estimar comparaciones entre el número de linfocitos en los hemisferios

cerebrales y un análisis de varianza para comparar el número de linfocitos en los hemisferios cerebrales y de MN en las regiones de la ME entre los grupos de ratas infectadas/preñadas y sanas preñadas, y entre las ratas vírgenes/sanas y sana/preñadas. Valores de  $P < 0,05$  fueron considerados significantes<sup>(17)</sup>.

Los animales utilizados en este estudio fueron tratados siguiendo el protocolo para el manejo de animales de experimentación en el laboratorio, según las instrucciones del capítulo 2 de las normas establecidas por el Comité de Bioética y Seguridad del FONACIT (www.fonacit.gob.ve) y del bioterio de cría de animales de la Universidad de Los Andes (BIOULA) en Mérida, Venezuela.

## RESULTADOS

**Parasitemia patente:** En las ratas infectadas/preñadas la estimación de parasitemia patente reveló aumento del número de parásitos de  $36 \pm 2,9$  a  $55 \pm 3,0$  tripanosomas/mm<sup>3</sup> de sangre periférica, a los 16 y 22 días pi y 6 y 12 días de gestación respectivamente, mientras que en la sangre de las ratas vírgenes/infectadas la parasitemia mostró valores de  $10 \pm 0,8$  y  $27 \pm 4,0$  a los 16 y 22 días pi (Tabla 1). La comparación de la parasitemia entre las ratas infectadas/preñadas y las ratas vírgenes/infectadas reveló diferencias significativas al 1 %.

Tabla 1

Valores promedios del número de tripomastigotes/mm<sup>3</sup> de sangre periférica de la cepa "Y" detectados en las ratas infectadas/preñadas y en las ratas vírgenes/infectadas entre 10 y 30 días posinfección

Días de infección/gestación	Grupos de ratas	
	Infectadas/preñadas	Vírgenes/infectadas
10/0	15 $\pm$ 1,3	15 $\pm$ 1,3
16/6	36 $\pm$ 2,9	10 $\pm$ 0,8
22/12	55 $\pm$ 3,0	27 $\pm$ 4,0
30/20	0	0

Análisis de varianza:  $\pm$  desviación estándar

*t* Students' s: Significancia al 1%:

Infectadas/preñadas vs. Vírgenes/infectadas

**Estudio histopatológico del cerebro y de la médula**

**espinal:** Los cortes de los hemisferios cerebrales de las ratas infectadas/preñadas mostraron alta densidad de infiltrado inflamatorio con predominio de células linfocíticas (Figuras 1A y B), con valores entre  $65 \pm 6,3$  y  $48 \pm 4,5$  linfocitos/100 campos microscópicos en los HD y HI respectivamente. La comparación entre los valores promedios de linfocitos en el C de las ratas infectadas/preñadas y las ratas sanas/preñadas, así como la comparación entre el número de linfocitos en el C de las ratas sanas/preñadas y vírgenes/sanas resultó significativa al 5 %. (Tabla 2).

**Evaluación de motoneuronas en la médula espinal:**

El estudio histopatológico de las regiones de la ME de las ratas infectadas/preñadas reveló infiltrado inflamatorio de células mononucleares y polimorfonucleares (Figura 2). Los valores promedio más bajos de MN fueron observados en los cortes histológicos en la ME de las

**Tabla 2**

**Valores promedios del número de linfocitos en los hemisferios cerebrales derecho e izquierdo de los grupos de ratas Wistar**

Grupos de ratas	Hemisferios cerebrales	
	Derecho	Izquierdo
Vírgenes/sanas	$60 \pm 5,8$	$24 \pm 2,3$
Vírgenes/infectadas	$62 \pm 6,1$	$37 \pm 3,2$
Sanas/preñadas	$20 \pm 2,0$	$13 \pm 1,1$
Infectadas/preñadas	$65 \pm 6,3$	$48 \pm 4,5$

Análisis de Varianza:  $\pm$  desviación estándar  
*t* Students: Significancia al 5 % ( $P < 0,05$ ):  
 Infectadas/preñadas vs. Sanas/preñadas

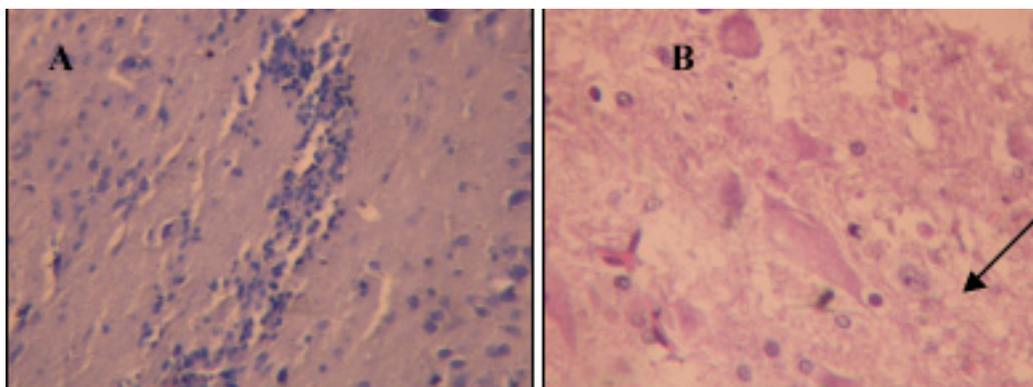


Figura 1. Cortes histológicos del hemisferio izquierdo del cerebro de rata Wistar con 30 días de infección con *T. cruzi* y 20 días de gestación que muestran: A) abundante infiltrado de células inflamatorias. B) linfocitos en contacto con cuerpo neuronal ( $\rightarrow$ ) (HE, 400X, 1000X).

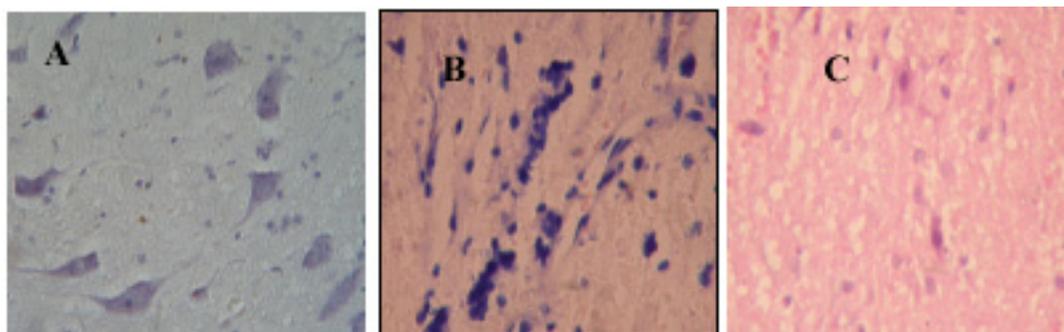


Figura 2. Cortes histológicos de las regiones de la médula espinal: A) cervical, B) torácica y C) lumbar de rata Wistar con 30 días de infección con *T. cruzi* y 20 días de gestación que muestran infiltrado celular inflamatorio (HE, 400X).

ratas infectadas/preñadas, representados por  $16 \pm 1,7$  en la RC,  $21 \pm 3,0$  en la RT,  $10 \pm 1,8$  en la RL y  $29 \pm 2,5$  en la RS, mientras que en las ratas sanas/preñadas el número de MN fue superior en la RC ( $35 \pm 3,4$ ), RT ( $33 \pm 3,1$ ) y RL ( $31 \pm 3,8$ ). El número de MN descendió de  $53 \pm 4,9$  a  $35 \pm 3,4$  en la ME cervical y de  $37 \pm 3,3$  a  $22 \pm 1,9$  en la ME sacra de las ratas vírgenes/sanas y las sanas/preñadas (Tabla 3). La comparación entre el número de MN en la ME de las ratas sanas/preñadas e infectadas/preñadas resultó significativa ( $P < 0,05$ ).

**Estudio inmunocitoquímico del cerebro y médula espinal.** La inmunotinción por IFI-PAP y el marcaje con GFAP-IFI-IP, revelaron amastigotes en el C y antígeno de *T. cruzi* en los cuerpos neuronales del cerebro, plasmocitos en contacto con cuerpos neuronales, despoblación neuronal y reacción antigénica alrededor de motoneuronas en la ME cervical, torácica y lumbar de las ratas infectadas/preñadas (Figuras 4 A, B y C y Figuras 5 A, B y C).

**Tabla 3**  
Valores promedios del número de motoneuronas en las regiones de la médula espinal de las ratas infectadas/preñadas y en los grupos de ratas controles

Grupos de ratas	Motoneuronas en las regiones de la médula espinal de las ratas			
	Cervical	Torácica	Lumbar	Sacra
Vírgenes/sanas	$53 \pm 4,9$	$38 \pm 2,7$	$33 \pm 3,5$	$37 \pm 3,3$
Vírgenes/infectadas*	$24 \pm 2,1$	$13 \pm 1,5$	$24 \pm 2,0$	$16 \pm 1,2$
Sanas/preñadas	$35 \pm 3,4$	$33 \pm 3,1$	$31 \pm 3,8$	$22 \pm 1,9$
Infectadas/preñadas**	$16 \pm 1,7$	$21 \pm 3,0$	$10 \pm 1,8$	$29 \pm 2,5$

\*30 días pi, \*\*30 días pi y 20 días de gestación  
± Desviación estándar

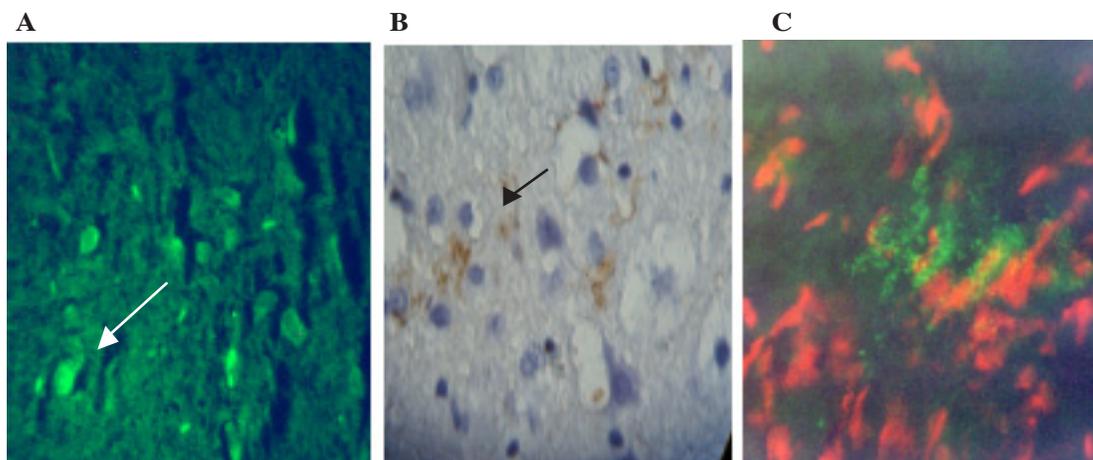


Figura 4. Cortes histológicas del hemisferio izquierdo del cerebro de rata Wistar con 20 días de gestación y 30 días de infección con *T. cruzi*, que muestra: A) amastigotes y cuerpos neuronales fluorescentes (→) (IFI 400X). B) Reacción antigénica sobre cuerpos neuronales del cerebro (PAP) (▶). C) Amastigotes fluorescentes junto a los cuerpos neuronales (GFAP-IFI-IP 1000X).

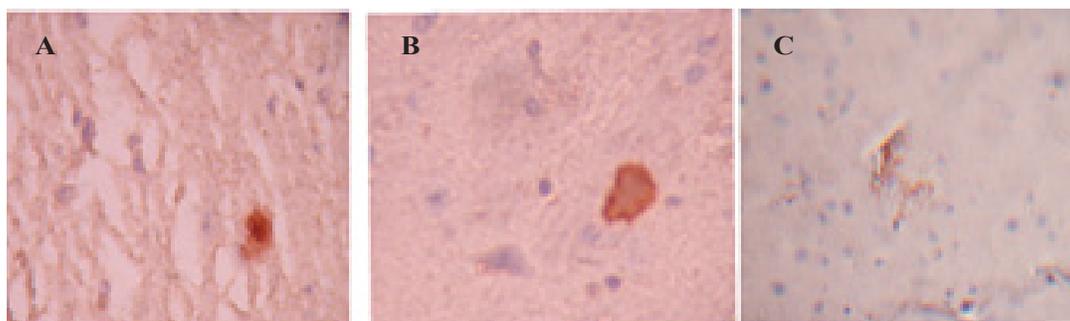


Figura 5. Cortes histológicos de las regiones A) Cervical, B) torácica y C) lumbar de rata Wistar con 20 días de gestación y 30 días de infección, que muestran infiltrado de células mononucleares y reacción antigénica en motoneuronas (PAP. 400X).

## DISCUSIÓN

La infección por *T. cruzi* en madres chagásicas que habitan en zonas endémicas afecta los tejidos muscular esquelético y cardíacos y provoca el aumento de la parasitemia durante el embarazo<sup>(18)</sup>. En el presente estudio fue frecuente la observación del desarrollo de procesos inflamatorios en los hemisferios cerebrales y en las regiones de la ME de ratas Wistar infectadas/preñadas, las cuales mostraron elevados niveles de parasitemias patentes, hecho que ha sido considerado como un factor marcador del curso de la infección aguda en las ratas durante la gestación<sup>(19)</sup> y asociado con la liberación de citocinas en la sangre circulante tales como el interferon- $\gamma$  y el factor- $\alpha$  de necrosis tumoral, productoras de moléculas parasíticas proinflamatorias, las cuales provocan daños durante la preñez<sup>(20,21)</sup>. En ese sentido, la activación celular en el SNC con elevación significativa de la infiltración de leucocitos en áreas de los lóbulos cerebrales de las ratas con 30 días de infectadas con *T. cruzi* y 20 días de gestación, se asocian con mecanismos de activación inmunológica en la madre gestante, en respuesta al parasitismo de los tejidos nerviosos y a la presencia de antígeno de *T. cruzi*, ocasionando daños estructurales en el cerebro de los animales experimentales<sup>(22)</sup>. Estas observaciones permiten considerar que en las ratas infectadas/preñadas, los parásitos junto a leucocitos activados, pueden cruzar y pasar al cerebro en bajas concentraciones en condiciones normales y en cantidades más grandes durante la presencia de desórdenes neuropatológicos asociados a procesos inflamatorios neuroinmunes<sup>(23)</sup>, en pacientes con esclerosis múltiple, infección viral y

bacterial o con enfermedades neurodegenerativas<sup>(24)</sup>.

Los efectos de la infección maternal con *T. cruzi* sobre la producción de factores inflamatorios y la presencia de antígenos del parásito en los cuerpos neuronales del cerebro y de las RC, RT y RL de la ME de las ratas infectadas/preñadas, representarían productos antigénicos liberados por los parásitos dispersos en los tejidos nerviosos, los cuales suelen ser adsorbidos sobre la superficie de las membranas de células no infectadas en respuesta a la proliferación de células plasmocíticas. Estas células son producidas mediante un mecanismo análogo al que ocurre en la inter-relación parásito-célula hospedadora en sistemas *in vitro*<sup>(25)</sup>. Resultados similares se han observado en otros sistemas de tejidos, en los cuales los antígenos de *T. cruzi* intracelulares también expresados en la membrana celular, son los responsables de la inmunorreactividad detectada en las células ocupadas por el antígeno, como la observada alrededor de los cuerpos neuronales cerebrales y medulares de las ratas infectadas/preñadas. Estos resultados sugieren que la acción directa del parásito favorece la destrucción de motoneuronas en la ME debido al desarrollo de una mayor patogenicidad de *T. cruzi* en las madres durante el curso de la gestación<sup>(26)</sup>. En consecuencia este proceso de despoblación neuronal produciría alteraciones patológicas del SNC de las ratas infectadas/preñadas, debido probablemente a la transferencia pasiva de células T específicas en respuesta a la activación de las células endoteliales del cerebro, favoreciendo la infiltración de *T. cruzi* en fagocitos mononucleares a través de las barreras sanguíneas cerebro-espinal, la

cual está formada por la apretada unión entre las células endoteliales activadas de la microvasculatura o a través de fluido cerebroespinal<sup>(27)</sup>.

En ese sentido, es importante considerar que cuando la infección por *T. cruzi* donde el SNC se encuentra comprometido, es posible que los parásitos alcancen el parénquima cerebral a través de los plexos coroideos, como ocurre en pacientes inmunocomprometidos con infecciones virales, en los casos que desarrollan SIDA<sup>(28,29)</sup> o en los casos con cardiopatía chagásica crónica, durante la cual se forman fragmentos de trombos en el ventrículo izquierdo los cuales migran junto con las formas sanguíneas de *T. cruzi*, causando fenómenos embólicos en la microvasculatura distante, como los vasos sanguíneos del cerebro produciéndose procesos embólicos cerebrovasculares<sup>(30)</sup>.

Esta última forma de propagación de *T. cruzi* pudiera estar ocurriendo en las madres que sufren infección de Chagas agudo en el último trimestre de gestación<sup>(31,32)</sup>, mediante la transferencia pasiva de células T específicas, las cuales sufren reacciones cruzadas con los componentes de los lóbulos cerebrales y médula espinal de las ratas infectadas, tal como ocurre entre *T. cruzi* y los componentes del nervio ciático en humanos y del sistema nervioso periférico en ratones con infección aguda, provocando procesos degenerativos e inflamatorios y severos daños estructurales en los tejidos nerviosos<sup>(33-35)</sup> de animales infectados.

## CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en la presente investigación aportan evidencias sobre la infección cerebral y medular por *T. cruzi*, atribuibles a la presencia de amastigotes e infiltrados inflamatorios en los tejidos nerviosos. Bajo estas condiciones inflamatorias del SNC, los linfocitos y otras células inflamatorias infectadas con *T. cruzi* en la sangre periférica de las ratas preñadas alcanzan el tejido nervioso a través de la barrera sanguínea, causando despoblación neuronal en la ME de las ratas preñadas. Estos resultados se suman a los hallazgos sobre las alteraciones histopatológicas sufridas por el SNC durante una infección con tripanosomatídeos en el modelo experimental rata Wistar durante la gestación. En tal sentido es importante establecer el comportamiento biológico de las diferentes cepas de *T. cruzi*, en la determinación de las manifestaciones clínicas cerebrales y abordar los estudios sobre las alteraciones específicas de las lesiones nerviosas, así como la oportuna detección de una infección aguda, en

mujeres con edad fértil en las diferentes áreas endémicas para la enfermedad de Chagas.

## REFERENCIAS

1. Chagas C. Nova trypanosomiasis humana. Estudo sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi*. N Gen Mem Inst Oswaldo Cruz. 1909;159-218.
2. OPS. Definición de caso. Tripanosomiasis americana (Enfermedad de Chagas). Boletín Epidemiológico. 2003;24.
3. Rodríguez E, Briceño L, Chiurillo M, Mosca W, Campos Y. Tripanosomiasis Americana: Aspectos Teóricos. Inst Bio Med. Caracas. Universidad Central de Venezuela; 2004:3.
4. Leiguarda R, Roncoroni A, Taratuto AL, Jost L, Berthier M, Nogues M, et al. Acute CNS infection by *Trypanosoma cruzi* (Chagas' disease) in immunosuppressed patients. Neurol. 1990;40:850-851.
5. 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.
6. Postan M. Expresión de la heterogeneidad del *Trypanosoma cruzi* in vivo. Medicina. 1997;57(Suppl)3:38-39.
7. Martins AP, Martins F, Von Bock F, Polanczyk P, Gurgel R, Lampert T, et al. Cerebral trypanosomiasis and aids. Arq Neuropsiquiatr. 2002;60:730-733.
8. Del Castillo M, Mendoza G, Oviedo J, Perez Bianco RP, Anselmo AE, Silva M. AIDS and Chagas' disease with central nervous system tumor-like lesion. Am J Trop Med Hyg. 1990;88:693-694.
9. Storni P, Bolsi FL. Embarazo y parasitismo por *Trypanosoma cruzi*. Medicina (B. Aires). 1979;39:193-197.
10. Vieira G, Maguire J, Bittencourt AL, Silva Fontes JA. Doença de Chagas congênita apresentação de um caso paralisia cerebral. Rev Inst Med Trop. São Paulo. 1983; 25:305-309.
11. Pereira da Silva LH, Nussenzweig V. Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. Fol Clin Biol. 1953;20:191-207.
12. Walton BC, Brooks WH, Arjona I. Serodiagnosis of american leishmaniasis by indirect fluorescent antibody test. Am J Trop Med Hyg. 1972;21:296-299.
13. Brener Z. Observações sobre a imunidade a superinfecções em camundongos experimentalmente inoculados com *Trypanosoma cruzi* e submetidos a tratamento. Rev Inst Med Trop São Paulo. 1962;4:119-123.
14. Waynforth HB, Flecknell PA. Experimental and surgical technique in the rat. Academic Press Limited. Londres. 1992.
15. Camargo M. Fluorescent antibody test for serodiagnosis technical modification employing preserved culture forms of *Trypanosoma cruzi* in slide test. Rev Inst Med Trop. São Paulo. 1966;8:227-234.
16. Sell B, Burton M. Identification of *Leishmania* amastigotes and their antigens in formalin fixed tissue by immunoperoxidase staining. Trans R Trop Med Hyg. 1981;75:461-468.
17. Owen DB. Handbook of statistical table, Addison-Wesley Publishing Company, Inc Reading, Mass. 1962.
18. Torrico F, Vega CA, Suarez E, Tellez T, Brutus L, Rodriguez

- P, et al. Are maternal re-infections with *Trypanosoma cruzi* associated with higher morbidity and mortality of congenital Chagas' disease? *Trop Med Int Health*. 2006;11:628-635.
19. Moreno E, Rivera I, Moreno S, Alarcón M, Lugo-Yarbuh A. Transmisión vertical de *Trypanosoma cruzi* en ratas Wistar durante la fase aguda de la infección. *Invest Clin*. 2003;3:241-243.
20. Acosta A, Almeida IC, Freitas LH, Yoshida N, Schenkman S. The mucin-like glycoprotein super-family of *Trypanosoma cruzi*: Structure and biological roles. *Mol Biochem Parasitol*. 2001;114:143-150.
21. Ragthupathy R. Pregnancy: Success and failure with the Th1/Th2/Th3 Paradigm. *Semin Immunol*. 2001;13:219-227.
22. Cabeza MP, Chambo JG, Lagunas RP. Presence of cell producing anti-heart autoantibodies in the inflammatory infiltrate of chronic chagasic myocarditis. *Clin Immunol Immunopathol*. 1991;60:137-144.
23. Giulian D, Vaca K, Corpuz M. Brain glia release factors with opposing actions upon neuronal survival. *Neurosci*. 1993;13:29-37.
24. Couraud PO. Infiltration of inflammatory cells through brain endothelium. *Pathol Biol*. 1998;46:176-180.
25. Ribeiro dos Santos R, Hudson L. *Trypanosoma cruzi*: Binding of parasite antigens to mammalian cell membranes. *Parasite Immunol*. 1980;2:1-10.
26. Werner H, Egger I. Kongenitale Chagas. E. Influbeiner *Trypanosoma cruzi* infection mausem. *Z Tropenmed Parasit*. 1971;22:224.
27. Drevest DA, Llenen PJM. Leukocyte-facilitated entry of intracellular pathogens into the central nervous system. *Microbes Infect*. 2000;2:1609-1618.
28. Gallo P, Fabia Neto OM, Suarez JM, Borba RP. Acute central nervous system infection by *Trypanosoma cruzi* and AIDS. *Arq Neuropsiquiatr*. 1992;50:375-377.
29. Antunes AC, Cecchini F M, Bolli FB, Oliveira PP, Reboucas RG, Monte TL, et al. Cerebral trypanosomiasis and AIDS. *Arq Neuropsiquiatr*. 2002;60:730-733.
30. Spina-Franca A, Livramento J, Machado L, Yasuda N. *Trypanosoma cruzi* antibodies in the cerebrospinal fluid: A search using complement. *Arq Neuropsiquiatr*. 1988;4:374-378.
31. Storni P, Bolsi FL. Embarazo y parasitismo por *Trypanosoma cruzi*. *Medicina (B Aires)*. 1979;39:193-197.
32. Menezes CAS, Bittencourt AL, Mota E, Sherlock I, Ferreira J. Avaliação da parasitemia em mulheres portadoras de infecção pelo *Trypanosoma cruzi* durante e após a gestação. Evaluation of parasitaemia in women who are carriers of *Trypanosoma cruzi* infection during and after pregnancy. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1992;2:109-113.
33. Gea S, Ordoñez P, Cerban F, Iosa D, Chissolini C, Vottero C. Chagas' disease cardioneuropathy: Association of anti-*Trypanosoma cruzi* and anti-sciatic nerve antibodies. *Am J Trop Med Hyg*. 1993;49:581-588.
34. Guillén PB, Lugo de Yarbuh A, Moreno E. Dilatación del tracto digestivo de ratones infectados con *Trypanosoma cruzi*. *Invest Clin*. 2001;42:195-209.
35. Lugo de Yarbuh A, Colasante C, Alarcón M, Moreno E. *Gastrocnemius* skeletal muscle microvasculature and neuromuscular junction alterations in mice with experimental acute Chagas infection. *Rev Cient FCV-LUZ*. 2006; 6:593-603.

Autor Responsable: Profesora. Ana Lugo de Yarbuh  
DIRECCIÓN: Edificio A La Hechicera, Mérida,  
5101, Venezuela. Laboratorio de Parasitología  
Experimental (LAPEX), Departamento de Biología,  
Facultad de Ciencias. Universidad de Los Andes. Tlfs.  
02742401244, 0426-5634000  
Dirección electrónica: lana@ula.ve

**Agradecimientos:** Este trabajo recibió financiamiento del CDCHT de la Universidad de Los Andes, Proyecto: C-1487-07-03-A