

ARTÍCULO ORIGINAL

## *Efecto de la infección aguda por diferentes cepas de Trypanosoma cruzi sobre el crecimiento intrauterino de fetos de ratón*

MIGUEL ANGEL SALA\*, RUBERVAL ARMANDO LOPES\*\*\*,  
ANA AMÉLIA CARRARO ABRAHÃO\*\*\* y CÍCERO MENEGUETTE\*\*\*\*

### EFFECT OF THE ACUTE INFECTION BY DIFFERENT STRAINS OF *Trypanosoma cruzi* INTRAUTERINE GROWTH OF THE MOUSE FETUSES

*The objective of this work was to evaluate the effects of the acute maternal infection with different strains of **Trypanosoma cruzi** on the intrauterine growth of the mouse fetus. Pregnant mice, 60 day-old, were i.p. inoculated with  $2 \times 10^5$  trypomastigotes blood stream of **T. cruzi** (Colombian, Y, Bolivia or RC strains). The results allow to conclude that the **T. cruzi** infection affect the intrauterine growth of the mouse fetus, with reduction of both weight and length, umbilical cord length, body weight to placenta weight ratio and body weight to umbilical cord length ratio. **T. cruzi** strains showed different behavior. In general, the less prejudicial to the fetal growth was the RC strain, whereas the most prejudicial were the Bolivia and Y strains. The parasitemic curves of these strains show the most rapid growth, reaching the peak at the 5th and 7th day, respectively. As inoculation was made to agree the last pregnancy day with the parasitemic peak, the infected animals had the most rapid infection with elevated parasitemy, without possibility of maternal adaptation.*

**Key words:** Fetus, Mouse, *Trypanosoma cruzi*, Intrauterine growth.

### INTRODUCCIÓN

En 1911, se sugirió la transmisión congénita de la infección por *Trypanosoma cruzi*<sup>1,2</sup>. En 1914 se comprobó experimentalmente la transmisión vertical, con la presencia de nidos de amastigotes en placentas de ratones, sin parasitismo fetal<sup>3</sup>. En 1921, inoculando tripomastigotes de *T. cruzi* en cobayas grávidas, se verificó alta incidencia de abortos y la transmisión

de la infección cuando se inoculó sangre o líquido amniótico de los fetos de esas cobayas a ratones<sup>4</sup>. En 1923 se demostró, fehacientemente, la transmisión congénita, con evidencias morfológicas en placentas y fetos de perro<sup>5</sup>. Mientras tanto, el primer caso humano confirmado de transmisión vertical sólo fue relatado en 1949<sup>6</sup>.

La enfermedad de Chagas fue considerada causa de aborto en el segundo trimestre de la gravidez humana<sup>7,8</sup>. Al contrario, varios estudios

\* Departamento de Morfología, Estomatología y Fisiología, Facultad de Odontología de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Brasil. Avenida do Café s/n CEP 14040-904, Ribeirão Preto - SP BRASIL e-mail: masdmatt@forp.usp.br. Correspondencia a Prof. Dr. Miguel A Sala.

\*\* UNIFRAN, Franca, SP, Brasil.

\*\*\* Departamento de Ciencias de la Salud, Facultad de Ciencias Farmaceuticas de Ribeirão Preto, USP, Brasil.

\*\*\*\* Facultad de Medicina de São José do Rio Preto, SP, Brasil.

retrospectivos no mostraron aumento de los índices de abortos en chagásicas<sup>9,10</sup>. Algunos autores afirman que la enfermedad de Chagas materna aumenta el riesgo de prematuridad<sup>11,12</sup>, siendo negado por otros, que señalan como causa de la prematuridad la infección congénita fetal<sup>10,13</sup>.

Estas discrepancias indican la variabilidad de las manifestaciones de la enfermedad. El dimorfismo de las formas sanguíneas del *T. cruzi* llevó a algunos autores a estudiar su significado<sup>14,15</sup>, así como el comportamiento diferencial de la infección según el inóculo de formas flageladas o amastigotas<sup>16</sup>. Otra causa de la variabilidad de comportamiento es la diversidad de cepas del *T. cruzi*<sup>17,18</sup>. Aún hoy son poco comprendidos los fenómenos relacionados al parásito y las lesiones causadas en la placenta por las diversas cepas, que se pueden reflejar en el crecimiento fetal y en la resolución de la gravidez.

Nuestro objetivo es evaluar los efectos de la infección aguda por diferentes cepas del *T. cruzi*, durante la gravidez, sobre el desarrollo de los fetos y placentas de ratón.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron 25 ratones blancos (*Mus musculus*), variedad Swiss, hembras vírgenes, de 60 días de edad. Después de dos semanas de adaptación, las hembras fueron colocadas para cruzar con machos fértiles durante la noche. El día siguiente, cuando comprobada la presencia del tapón vaginal, era considerado el primero de la preñez (DP1).

Los animales grávidos fueron mantenidos en jaulas individuales, en condiciones controladas de luz (12 h-luz, 12 h-oscuridad), temperatura ( $22^{\circ} \pm 2^{\circ}$  C) y humedad ( $55\% \pm 10\%$ ) y alimentados con ración comercial y agua *ad libitum*. Los ratones fueron inoculados intraperitonealmente con  $2 \times 10^5$  formas sanguíneas de tripomastigotes de diferentes cepas de *T. cruzi*. Fueron constituidos, así, cinco grupos de cinco animales:

- I) Inoculado el DP13 con la cepa colombiana<sup>19</sup> del *T. cruzi*.
- II) Inoculado el DP13 con la cepa Y<sup>20</sup> del *T. cruzi*.
- III) Inoculado el DP6 con la cepa Bolivia<sup>21</sup> del *T. cruzi*.
- IV) Inoculados el DP8 con la cepa RC<sup>22</sup> del *T.*

*cruzi*.

- V) Grupo control, inyectado el DP10 con suero fisiológico estéril.

El día de inoculación de cada grupo fue seleccionado de modo que los niveles máximos de parasitemia para la cepa fuera alcanzado al término del embarazo.

Las cepas de *T. cruzi* utilizadas son mantenidas en el Laboratorio de Parasitología de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas de Ribeirão Preto.

Los animales fueron sacrificados en el DP19, por dislocación cervical bajo anestesia. Los fetos y anexos fueron retirados y rápidamente fijados en alcohol 80% - 85 mL, formol 10 mL y ácido acético - 5 mL, por 24 h. Después de enjugados, fueron pesados los fetos y placentas con balanza de precisión, y medidos la longitud fetal (en cm) y del cordón umbilical (en mm) y el diámetro de la placenta (en mm), con ayuda de un nonio.

El volumen de la placenta fue estimado con el método de Scherle<sup>23</sup> y el índice ponderal fue calculado por el cociente peso fetal/longitud fetal al cubo, multiplicado por 100.

Como la mayoría de las variables no mostró distribución normal, para el análisis estadístico de los resultados se utilizó el teste de Kruskal-Wallis<sup>24</sup>.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El peso y la longitud fetal fueron significativamente menores en los grupos infectados (Tabla 1). La reducción significativa de peso y de longitud sufrida por los fetos de los animales inoculados con *T. cruzi* caracteriza una restricción de crecimiento intrauterino. La presencia de restricción de crecimiento fetal ya fue señalada en recién nacidos de término de mujeres chagásicas<sup>25</sup>. El cotejo entre los pesos fetales de los grupos inoculados mostró que la reducción fue mayor con las cepas Y y Bolivia que con la cepa RC (Tabla 2). La longitud fetal no mostró diferencias significativas entre los grupos infectados (Tabla 2).

El índice ponderal fue semejante en todos los grupos (Tabla 1), de modo que la restricción de crecimiento es simétrica. Este tipo de restricción se caracteriza por peso y longitud menor e índice ponderal normal, y es encontrado en casos de infección materna o de insuficiencia placentaria severa<sup>26</sup>. Así, la reducción de peso y longitud

Tabla 1. Parametros fetales y placentarios en los grupos inoculados con diferentes cepas de *T. cruzi*. Los resultados son presentados en forma de medias y desvíos estandar (entre paréntesis)

Variable	Control	Colombiana	Cepas Y	Bolivia	RC	Kruskal - Wallis (H)
Peso del feto (g)	1,65 (0,06)	0,80 (0,09)	0,70 (0,16)	0,68 (0,22)	0,91 (0,15)	14,598**
Longitud fetal (cm)	2,68 (0,11)	2,04 (0,06)	1,96 (0,15)	2,04 (0,18)	2,08 (0,08)	13,374**
Índice ponderal (g/cm³)	8,63 (0,82)	9,34 (0,56)	9,55 (0,62)	8,80 (1,16)	10,06 (0,88)	6,609
Peso de la placenta (mg)	84,6 (17,1)	68,2 (9,1)	70,4 (5,9)	75,6 (10,3)	64,0 (10,9)	8,810
Volumen de la placenta (mm³)	77,0 (16,0)	61,8 (8,3)	63,8 (5,1)	71,2 (9,8)	60,4 (10,4)	7,977
Diámetro de la placenta (mm)	7,8 (0,4)	7,4 (0,6)	6,6 (0,9)	7,2 (0,8)	7,0 (0,0)	7,802
Longitud del cordão (mm)	9,0 (1,2)	6,8 (1,1)	6,4 (0,9)	6,6 (0,9)	6,4 (0,9)	11,676*
Relación peso feto/ peso placenta (g/g)	19,98 (2,71)	11,76 (1,40)	10,22 (1,36)	9,80 (0,16)	14,26 (0,70)	21,158**
Relación peso feto/ long. cordón (g/cm)	1,86 (0,23)	1,14 (0,10)	1,12 (0,09)	1,12 (0,09)	1,43 (0,20)	13,609**
Rel. longitud feto/long. cordón (mm/mm)	3,01 (0,34)	2,96 (0,36)	3,08 (0,22)	3,11 (0,27)	3,28 (0,31)	3,874

\* P < 0,05

\*\* P < 0,01

Tabla 2. Prueba de Kruskal-Wallis para las comparaciones entre los diferentes pares de cepas para los parámetros que mostraron diferencias significativas y respectivos niveles de significación

Comparación	Peso	Longitud	Longitud cordón	Peso fetal/ Peso placenta	Peso fetal/ Long. cordón
Control - Colombiana	12,00**	12,30**	8,40*	10,40**	12,60**
Control - Y	15,10***	15,70***	12,40**	16,00***	12,60**
Control - Bolivia	14,90***	11,70**	10,80**	18,00***	13,20***
Control - RC	8,00*	10,30**	12,40**	4,64*	4,10
Colombiana - Y	3,10	3,40	4,00	5,60**	0,00
Colombiana - Bolivia	2,90	0,60	2,40	7,60***	0,60
Colombiana - RC	4,00	2,00	4,00	5,80**	8,50*
Y - Bolivia	0,20	4,00	1,60	2,00	0,60
Y - RC	7,10*	5,40	0,00	11,40***	8,50*
Bolivia - RC	6,90*	1,40	1,60	13,40***	9,10*

\* P < 0,05

\*\* P < 0,01

\*\*\* P < 0,001

fetal puede ser atribuida a la infección materna, que disminuye la ingestión y absorción de alimentos, así como a lesiones placentarias, que afectan la transferencia de nutrientes para el feto. La presencia de edema y de lesiones vasculares en la decidua de los animales infectados

(observaciones no publicadas), que provocan disminución del flujo sanguíneo materno en la placenta y de la capacidad de transferencia de nutrientes para el feto, causan la restricción de crecimiento. El inóculo de la cepa Tehuantepec de *T. cruzi*, antes de la gravidez en ratones,

causó aumento de la tasa de mortalidad, reducción del crecimiento fetal y lesiones placentarias (trombos, necrosis isquémica y degeneración fibrinóide)<sup>27</sup>.

El peso, volumen y diámetro de la placenta son semejantes en todos los grupos (Tabla 1). Sin embargo, la mayor frecuencia de edema en las placentas de los animales infectados sugiere menor proporción de peso y volumen del trofoblasto, con menor síntesis hormonal, en especial de somatomamotrofina corial, que estimula el crecimiento intrauterino.

La longitud del cordón umbilical es buen indicador de los movimientos fetales intrauterinos<sup>28</sup>. Ese parámetro sufre la influencia del espacio intrauterino disponible y del movimiento fetal<sup>28,29</sup>. La reducción de los movimientos fetales o la disminución del espacio intrauterino limitan el estiramiento del cordón, causando su acortamiento. La reducción de la longitud de los cordones umbilicales en los fetos de los grupos infectados (Tabla 1) indicaría limitación de los movimientos intrauterinos, causados por la infección materna y por la reducción de la oxigenación fetal, debida a las lesiones vasculares de la decidua. El confronto entre los grupos inoculados no mostró diferencias significativas (Tabla 2).

La menor relación peso fetal/peso de la placenta en los grupos inoculados (Tabla 1), se justifica por la pérdida de peso fetal con manutención del peso de la placenta, indicando una placenta menos irrigada o insuficiente<sup>30</sup>. Esto se confirma por las alteraciones patológicas, como edema, lesiones vasculares y necrosis en las placentas de los grupos infectados (observaciones no publicadas). La comparación entre los grupos infectados mostró que la relación peso fetal/peso de la placenta fue mayor en el grupo inoculado con la cepa RC. Igualmente, esa relación fue mayor en el grupo inoculado con la cepa colombiana que en los infectados con las cepas Y o Bolivia (Tabla 2).

La relación peso fetal/longitud del cordón umbilical fue menor en los grupos inoculados (excepto con la cepa RC). Por otro lado, el grupo inoculado con la cepa RC mostró valores mayores que los otros grupos infectados (Tabla 2). No hay diferencias entre los grupos para la relación longitud fetal/longitud del cordón (Tabla 1).

De acuerdo con los resultados, se concluye que la infección por *T. cruzi* afecta el crecimiento intrauterino de ratones, causando disminución

del peso y longitud del feto, longitud del cordón umbilical, relación peso fetal/peso placentario y peso fetal/ longitud del cordón umbilical. Las diversas cepas de *T. cruzi* muestran comportamiento diferente. La cepa RC es la que afecta menos el crecimiento fetal, mientras que las más dañosas son las cepas Bolivia e Y. Estas dos cepas presentan curvas de parasitemia con rápido crecimiento, alcanzando los niveles máximos al 5° y 7° día, respectivamente. Los animales inoculados tuvieron, así, una infección que se desarrolló más rápidamente, y con elevada parasitemia, sin permitir la adecuación del organismo materno.

## RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue evaluar los efectos de la infección aguda materna con diferentes cepas de *T. cruzi* sobre el crecimiento intrauterino del ratón. Animales grávidos, de 60 días, fueron inoculados i.p. con  $2 \times 10^5$  tripomastigotes sanguíneos de *T. cruzi* (cepa colombiana, Y, Bolivia o RC). Los resultados muestran que la infección afecta el crecimiento intrauterino, con reducción de peso y de longitud del cuerpo, longitud del cordón umbilical, relación peso corporal/peso placentario y relación peso corporal/longitud del cordón umbilical. Las cepas usadas muestran comportamiento diferente. En general, la menos perjudicial para el crecimiento fue la cepa RC, mientras que las más deletéreas fueron las cepas Bolivia e Y. Las curvas parasitemicas de estas cepas tienen el crecimiento más rápido, alcanzando el máximo al 5° y 7° día, respectivamente. Como la inoculación fue hecha de modo a coincidir los niveles máximos de parasitemia con el fin de la gravidez, estas cepas causan un proceso infeccioso más rápido, con altos índices de parasitemia, sin permitir la adaptación materna.

## REFERENCIAS

- 1.- CHAGAS C. Nova entidade mórbida do homem. Resumo geral dos estudos etiológicos e clínicos. Mem Inst Oswaldo Cruz 1911; 3: 219-75.
- 2.- LOZANO N, MAGGIO C, ROSENBUCH F. La enfermedad de Chagas. Arch Hig 1911; 4: 123-76.
- 3.- MAYER M, ROCHA-LIMA H. Zum verhalten von *Schizotrypanum cruzi* in Warmtblutern und Arthropoden. Arch Schiff's Tropenhyg 1914; 18: 101-36.
- 4.- NATTAN-LARRIER L A A. Hérité des infections

- experimentales a *Schizotrypanum cruzi*. Bull Soc Pathol Exot 1921; 14: 232-8.
- 5.- VILLELA E A. A transmissão intra-uterina da moléstia de Chagas. Encefalite congênita pelo *Trypanosoma cruzi* (Nota prévia). Folia Méd 1923; 4: 41-3.
- 6.- DAO L. Otros casos de enfermedad de Chagas en el Estado Guárico (Venezuela). Formas agudas y crónicas. Observación sobre enfermedad de Chagas congénita. Rev Policlin Caracas 1949; 17: 17-32.
- 7.- SALEME A, YANICELLI G, IÑIGO L. Enfermedad de Chagas-Mazza en Tucumán. Arch Arg Ped 1971; 69: 162-9.
- 8.- BITTENCOURT A C L, BARBOSA H S, SANTOS I et al. Incidência da transmissão congênita da doença de Chagas em partos prematuros na Maternidade Tsylla Albino (Salvador, Bahia). Rev Inst Med Trop São Paulo 1972; 14: 131-4.
- 9.- OLIVEIRA F C, CHAPADEIRO E, ALONSO M T, et al. Doença de Chagas e gravidez. I. Incidência da tripanosomíase e abortamento espontâneo em gestantes chagásicas crônicas. Rev Inst Med Trop São Paulo 1966; 8: 184-5.
- 10.- VOTTA R, MARCHESI C, SOUSA MARTINEZ F, et al. La enfermedad de Chagas en la embarazada y el recién nacido. Rev Soc Arg Ginec Obstet 1974; 53: 56.
- 11.- FREITAS J L P. Moléstia de Chagas como problema de Saúde pública no Brasil. Rev Assoc Méd Bras 1965; 11: 513-21.
- 12.- AMATO NETO V, MARTINS J E C, OLIVEIRA L, et al. Incidência de doença de Chagas entre mães de prematuros, no Hospital das Clínicas de São Paulo. Rev Inst Med Trop São Paulo 1968; 10: 192-5.
- 13.- CASTILHO E A, SILVA G R. Infecção chagásica materna e prematuridade. Rev Inst Med Trop São Paulo 1976; 18: 258-60.
- 14.- BRENER Z, CHIARI E. Variações morfológicas observadas em diversas amostras do *T. cruzi*. Rev Inst Med Trop São Paulo 1963; 5: 220-4.
- 15.- BRENER Z. Comparative studies of different strains of *Trypanosoma cruzi*. Ann Trop Med Parasitol 1965; 59: 19-26.
- 16.- BELDA NETO F M, RIBEIRO R D, BARRETO M P. Considerações sobre as características da infecção de camundongos inoculados com as formas de amastigotas ou flageladas do *Trypanosoma cruzi*. Rev Soc Bras Med Trop 1975; 10: 137-42.
- 17.- ANDRADE S G, BITTENCOURT A C L, FIGUEIRA R M, CARVALHO M L. Estudo experimental de amostras do *Trypanosoma cruzi* isoladas de gestantes chagásicas. Rev Patol Trop 1973; 2: 301-10.
- 18.- ANDRADE S G. The influence of the strain of *Trypanosoma cruzi* in placental infections in mice. Trans Royal Soc Trop Med Hyg 1982; 76: 123-8.
- 19.- FEDERICI E E, ABELMANN W B, NEVA F A. Chronic and progressive myocarditis and myositis in C3H mice infected with *Trypanosoma cruzi*. Am J Trop Med Hyg 1964; 113: 272-80.
- 20.- SILVA L H P, NUSSENZWEIG V. Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. Folia Clin Biol 1953; 20: 191-203.
- 21.- FUNAYAMA G K, PRADO J C Jr. Estudo dos caracteres de uma amostra boliviana do *T. cruzi*. Rev Inst Med Trop São Paulo 1974; 8: 75-81.
- 22.- RIBEIRO R D, BARRETO M P. Estudos sobre reservatórios e vetores silvestres do *Trypanosoma cruzi*. XLIV: Infecção natural da raposa-do-campo, *Ducicyon (Lycalopex) vetulus* (Lund. 1842) pelo *T. cruzi*. Rev Med Trop São Paulo 1970; 12: 375-82.
- 23.- SCHERLE W. A simple method for volumetry of organs in quantitative stereology. Mikroskopie 1970; 26: 57.
- 24.- SPRENT P, SMEETON N C. Applied nonparametric statistical methods. 3<sup>rd</sup> ed. Boca Raton: Chapman & Hall/CRC, 2001.
- 25.- BITTENCOURT A C L, BARBOSA H S, SANTOS I. Incidência de transmissão congênita da Doença de Chagas em partos a termo. Rev Inst Med Trop São Paulo 1974; 16: 197-9.
- 26.- SCRIMSHAW N S, SCHÜRCH B. Causes and consequences of intrauterine growth retardation. Eur J Clin Nutr 1998; 52 (Suppl 1): S1-S103.
- 27.- MJHDI A, LAMBOT M A, STEWART I J, et al. Acute *Trypanosoma cruzi* infection in mouse induces infertility or placental parasite invasion and ischemic necrosis associated with massive fetal loss. Am J Pathol 2002; 161: 673-80.
- 28.- MILLER M E, HIGGINBOTTOM M C, SMITH D W. Short umbilical cord: Its origin and relevance. Pediatrics 1981; 67: 618-21.
- 29.- MOESSINGER A C. Fetal akinesia deformation sequence: an animal model. Pediatrics 1983; 72: 857-63.
- 30.- KLOOSTERMAN G J, HUIDEKOPER B L. The significance of the placenta in obstetrical mortality. Gynaecologia 1954; 138: 529-50.