
Detección de ADN de *Trypanosoma cruzi* en la placenta y fetos de ratones con infección chagásica aguda.

Maritza Alarcón¹, Mary Carmen Pérez¹, Juana Villarreal¹, Sonia Araujo¹,
Loredana Goncalves², Ana Julia González³, Elio Moreno¹ y Ana Luño-Yarbuh¹.

¹Laboratorio de Parasitología Experimental (LAPEX), Facultad de Ciencias,

²Laboratorio de Inmunología de Parasitosis (LABINPAR), Facultad de Ciencias,

³Centro de Investigaciones Odontológicas, Facultad de Odontología.

Universidad de los Andes. Mérida, Venezuela.

Palabras clave: *Trypanosoma cruzi*, ratón NMRI, infección congénita, fetos, PCR.

Resumen. El objetivo del presente estudio consistió en detectar la presencia de ADN de *Trypanosoma cruzi* en la placenta y tejidos de fetos provenientes de ratones (*Mus musculus*) NMRI inoculadas con 22×10^3 tripomastigotes metacíclicos de la cepa M/HOM/BRA/53/Y por vía intraperitoneal. Los ratones hembras fueron preñadas durante la fase aguda de la infección. El curso de la parasitemia patente por *T. cruzi* fue evaluada antes del apareamiento y durante el periodo de gestación. A los veinte días de gestación los animales fueron sacrificados y los fetos con sus placentas fueron removidos para evaluar la infección por *T. cruzi*. Las muestras de placenta, corazón y músculo esquelético fetal fueron fijadas en formalina neutra al 10%, incluidas en parafina y coloreadas con hematoxilina y eosina (HE). El estudio histopatológico de los tejidos fetales reveló la presencia de infiltrado inflamatorio de células mononucleares y polimorfonucleares y sin parasitismo tisular. La amplificación del ADN de *T. cruzi* por la reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) demostró reacción positiva en el 18% de las placentas de los ratones hembras infectadas preñadas. Las muestras de corazón y músculo esquelético de los fetos provenientes de madres infectadas con *T. cruzi* no mostraron la presencia de ADN del parásito. Los cortes de placenta y de músculo esquelético analizados por inmunotinción con Peroxidasa anti Peroxidasa mostraron antígeno de *T. cruzi* en esos tejidos. Los resultados obtenidos por PCR en los tejidos fetales pudieran relacionarse con la virulencia y tropismo asociados con las características biológicas y genética de la cepa de *T. cruzi*, utilizada en la infección experimental de los ratones hembras.

Detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in the placenta and fetuses of mice with chagasic acute infection.

Invest Clin 2009; 50(3): 335 - 345

Key words: *Trypanosoma cruzi*, NMRI mice, congenital infection, fetuses, PCR

Abstract. The objective of the present study was to detect the presence of *Trypanosoma cruzi* DNA in the placenta and fetal tissues of NMRI mice (*Mus musculus*) inoculated with 22×10^3 trypomastigotes metacyclic of the M/HOM/BRA/53/Y strain by intraperitoneal route. Mice were pregnant in the acute phase of the infection. The course of patent parasitemia by *T. cruzi* was evaluated before mating and during pregnancy. At day twenty of gestation, animals were sacrificed and the fetuses and their placentas were removed to evaluate *T. cruzi* infection. Samples of fetal placenta, heart and skeletal muscle were fixed in 10% formalin, included in paraffin and stained with hematoxylin and eosin (HE). The histopathological study of sections of fetal tissues revealed inflammatory infiltrates with mononuclear and polymorphonuclear cells and without parasitism in these tissues. The amplification of *T. cruzi* DNA by Polymerase Chain Reaction (PCR) showed a positive reaction in 18% of placental tissue of pregnant infected mice. The samples of heart and skeletal muscle of the fetuses of mothers infected with *T. cruzi* did not show the presence *T. cruzi* DNA. The placenta and skeletal muscle of the fetuses analyzed by Peroxidase anti Peroxidase immunostaining showed *T. cruzi* antigens in those tissues. Negative results by PCR in fetal tissues might be related with the virulence and tropism associated with the biological and genetic characteristic Of the *T. cruzi* strain used in the experimental infection of female mice.

Recibido: 09-07-2008. Aceptado: 12-02-2009.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas causada por el protozooario *Trypanosoma* (*Schizotrypanum*) *cruzi* (1) presenta una fase aguda en la que se detectan parásitos circulantes en sangre periférica, seguida por una fase crónica en la cual estos son escasos (2). Durante la fase aguda de la infección los parásitos se alojan en el tejido cardíaco y muscular esquelético principalmente, alcanzando también otros tejidos como el digestivo y el nervioso, éste tropismo así como el grado de virulencia del parásito depende entre otros factores de la cepa del parásito (3).

El mecanismo habitual de transmisión de la enfermedad de Chagas en humanos se encuentra naturalmente asociado a la forma vectorial de transmisión a través de numerosas especies de triatomíneos (Hemiptera, Reduviidae, Subfamilia Triatominae). Hoy en día se reconocen otras vías de transmisión de *T. cruzi* relacionadas con la transfusión sanguínea, transplantes de órganos, la vía oral, ingestión de alimentos contaminados y la vía congénita o transplacentaria (4-6).

Una madre chagásica puede transferirle a su prole el parásito tanto en la fase aguda como en la fase crónica, ya que du-

rante la etapa de gestación se produce depresión transitoria de la inmunidad mediada por células para evitar el rechazo fetal, provocando una mayor sensibilidad de la madre a la infección, con mayor riesgo de transmisión durante la fase aguda y más probable en el ultimo trimestre de gestación tanto en humanos (7) como en animales experimentales (8). Los recién nacidos infectados pueden presentar un cuadro clínico caracterizado por prematuridad, hepatomegalia, esplenomegalia, ictericia, anemia y alteraciones en el sistema nervioso central, por lo que en algunos casos la tasa de mortalidad es elevada (9). Los serodiagnósticos realizados en recién nacidos provenientes de madres infectadas pueden arrojar falsos positivos; debido a la presencia de anticuerpos IgG anti-*T. cruzi* en el recién nacido que pueden ser producto de la transferencia pasiva de anticuerpos maternos, los cuales generalmente a los seis meses de edad desaparecen (10), es por ello que solo después de este período los anticuerpos de este isotipo pueden ser utilizados para la confirmación de la infección con *T. cruzi*, este hecho es de gran importancia desde el punto de vista de diagnóstico, ya que aunque los métodos parasitológicos convencionales (examen de sangre en fresco, gota gruesa, hemocultivo y xenodiagnóstico) son ampliamente empleados para determinar la infección neonatal, el número de parásitos en sangre generalmente es bajo como para ser detectados (11).

Sin embargo, existen evidencias experimentales que sugieren que la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), ofrece ventajas satisfactorias debido a su alta sensibilidad en comparación con los métodos de diagnóstico parasitológicos (9, 12). Así mismo, Russomando y col. y virreina y col. (11, 12) señalan que estos métodos no son lo suficientemente eficientes para el diagnóstico precoz de la enferme-

dad de Chagas congénito, especialmente en las zonas rurales donde la enfermedad es endémica, puesto que la tasa de transmisión congénita puede ser subestimada, debido a que es mínimo el seguimiento de los recién nacidos desde el nacimiento hasta los 6 meses de edad.

Hasta los momentos las cifras de incidencia de transmisión congénita por *T. cruzi* son muy bajas (1 a 12%), por lo que se hace necesario la utilización de una prueba diagnóstica de infección congénita que tenga un alto valor predictivo positivo y además que sea altamente específica (13); no obstante, en la actualidad es imprescindible desarrollar métodos de mayor sensibilidad y de fácil aplicación que permitan el diagnóstico de la infección. Este estudio constituye un aporte a futuras investigaciones que en conjunto permitan lograr el esclarecimiento de las complejas interacciones de los mecanismos involucrados para generar resistencia o susceptibilidad a la infección congénita.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepa de *Trypanosoma cruzi*

Se utilizaron tripomastigotes metacíclicos de la cepa de referencia internacional: M/HOM/BRA/53/Y de *Trypanosoma cruzi* con linaje filogenético Tipo II, aislada de un caso agudo humano con enfermedad de Chagas en Brasil (14). Los parásitos se han mantenido mediante pases intermedios en ninfas de *Rhodnius prolixus* criadas en el laboratorio y comprobadamente sanas.

Infección experimental de las ninfas de *R. prolixus*

Las ninfas de V estadio se alimentaron hasta la repleción sobre ratones con altas parasitemias, luego los triatominos se mantuvieron en el insectario experimental bajo condiciones controladas de temperatura y humedad relativa.

Preparación del inóculo de *T. cruzi*

30 días después de la primera ingesta sanguínea las ninfas de *R. prolixus* fueron alimentadas sobre ratones sanos y las deyecciones junto con la orina fueron revisadas para la detección y cuantificación de parásitos (15), el número de parásitos se ajustó diluyendo la muestra con solución salina estéril al 0,85% hasta obtener 22×10^3 tripomastigotes metacíclicos en 0,05 mL de suspensión.

Infección experimental y apareamiento

Un total de 12 ratones hembras NMRI (*Mus musculus*) de un mes de nacidas y con un peso promedio de 20 g, fueron separadas en 2 grupos de 6 ratones cada uno: infectadas y preñadas en fase aguda de la infección, y sanas preñadas (control gestante). Las infectadas preñadas fueron inoculadas con 22×10^3 tripomastigotes metacíclicos de *T. cruzi* por vía intraperitoneal (ip) y la parasitemia fue estimada a partir de los 10 días post-infección (pi) en 5 μ L de sangre extraída de la cola de cada ratón (15). Los 6 ratones restantes fueron inyectados con 0,05 mL de solución salina por la vía ip. El contenido vaginal de los animales fue revisado y la presencia de células nucleadas y epiteliales cornificadas en el moco vaginal, comprobó que se encontraban en proestro o estro del ciclo estral (16), a los 15 días post-infección los animales del grupo infectadas preñadas y las preñadas sanas fueron colocadas en jaulas individuales en una relación 2 hembras/1 macho durante 3 días y una vez comprobada la presencia de espermatozoides en el frotis del contenido vaginal, fueron separadas de los machos y mantenidas con Ratarina® y agua *ad libitum*.

Extracción de los fetos

En las infectadas gestantes se desarrollaron entre 9 y 6 fetos en comparación con 14 fetos desarrollados en los ratones sanas preñadas (Tabla I). Los fetos con 20 días de

TABLA I
NÚMERO DE FETOS NACIDOS DE RATONES SANAS Y DE RATONES INFECTADAS

Madre No	Nº de fetos de ratones sanas	Nº de fetos de ratones infectadas
1	14	14
2	14	6*
3	13	12
4	14	12
5	14	9
6	14	10*

* Ratones con altas parasitemias.

desarrollo fueron extraídos de los ratones a través de una incisión longitudinal de la membrana uterina, luego se lavaron con solución fisiológica y las muestras de placenta, corazón y músculo esquelético fetal fueron fijadas en formalina neutra al 10% por 24 h, deshidratados en alcohol isopropílico, alcohol-acetona 1:1, acetona-xilol 1:1 y xilol durante 30 min cada pase, xilol-parafina 1:1 a 56°C durante 24 h, impregnados con parafina pura a 56°C por 24 h (Monoject Scientific, St. Louis, MO. USA), cortados en secciones de 7 μ m de espesor mediante el uso de un micrótopo (American Optical) y coloreadas mediante la técnica de hematoxilina-eosina (H-E).

Extracción de ADN

Un total de 20 cortes de 7 micras de espesor cada uno de cada placenta, de cada corazón y de cada músculo esquelético fetal fueron desparafinados con xilol, y previos lavados con etanol al 100%, se trataron con proteinasa K a 20 mg/mL, SDS a 0,5% y se incubaron a 56°C durante toda la noche. Luego de la inactivación de la proteinasa K, el ADN fue obtenido usando la técnica de extracción con fenol: cloroformo y precipitación con etanol absoluto (17).

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Una vez extraído el ADN se amplificó un fragmento de 126pb de la región del espaciador intergénico del ARN ribosomal de *T. cruzi*. La prueba fue realizada en un volumen de 25 μ L que contenía una concentración de 250 ng de DNA de la muestra, 0,2 μ M de cada uno de los primers TCPM2: 5'-GGG AGA GGT TCC AGA TGT- 3' y TCPM4: 5'-GTC GGA GCA GGG ACA GCA- 3' (17), 0,2 mM de cada dNTP (Promega, Madison, WI, USA), 1U de Taq polimerasa, 1X de buffer de PCR y 2,5 mM MgCl₂. La mezcla de reacción se sometió a amplificación en un termociclador (MJ Research, BioRad, USA), llevando a cabo los siguientes parámetros: 1 ciclo de 5 minutos a 94°C seguido de 30 ciclos de 1 minuto a 53°C, 1 minuto a 72°C, 1 minuto a 94°C, correspondientes a las fases de desnaturalización, hibridación y extensión de los primers, por último un ciclo de 10 minutos a 72°C como extensión final. Los productos de la PCR se separaron en un gel de agarosa al 2%; una vez finalizada la corrida electroforética, el gel fue teñido con bromuro de etidio y colocado en un analizador digital de geles (UVP, USA) para la visualización de las bandas específicas. Siguiendo el criterio de González y col. (17), se consideró positiva

toda muestra que presentara bandas de amplificación de 126 pb. Como control positivo se empleó ADN extraído de epimastigotes de la cepa Y de *T. cruzi* y como control negativo una mezcla de los reactivos utilizados donde se reemplazó el ADN por agua destilada.

Detección de restos antigénicos

Fue realizada mediante la utilización de la técnica de peroxidasa anti-peroxidasa (PAP). Los cortes de tejidos fetales desparafinados se incubaron con peróxido de hidrógeno al 3% en metanol por 30 minutos y con suero normal de cabra al 30% en PBS. Las muestras se incubaron 1 hora con suero anti-*T. cruzi* producido en conejo diluido 1:300 en PBS a pH 7,2, 45 minutos con anti-IgG de conejo producido en cabra conjugado a peroxidasa (HRP) diluido 1:500 en PBS, 45 minutos con solución reveladora: una pastilla de 3,3- diaminobenzidina (DAB) y una de urea en 5 mL de agua deionizada) y contracoloradas con Hematoxilina de Mayer durante 1 hora. Finalmente se cubrieron con glicerina tamponada y fueron observadas al microscopio óptico con objetivo de 40X (Tabla II).

Los animales utilizados en este estudio fueron tratados siguiendo el Protocolo para el Manejo de Animales de Experimentación

TABLA II
ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO, INMUNOHISTOQUÍMICO Y MOLECULAR EN TEJIDOS DE FETOS DE RATONES INFECTADAS Y SANAS

	Tejidos Fetales								
	Corazón			Músculo Esquelético			Placenta		
	HE	PAP	PCR	HE	PAP	PCR	HE	PAP	PCR
Fetos de ratones infectadas preñadas	Infiltrados de origen linfocitario	-	-	Infiltrados inflamatorios focalizados	Moderados depósitos antigénicos	-	Células Gigantes, severo daño tisular	Moderados depósitos antigénicos	+
Fetos de ratones sanas preñadas	Histología conservada	-	-	Fibras musculares continuas	-	-	Sin parasitismo tisular apreciable	-	-

en el Laboratorio según las instrucciones del capítulo 2 de las normas establecidas por el comité de Bioética y Seguridad de FONACIT (www.fonacit.gob.ve) y del Bioterio de cría de animales de la Universidad de los Andes, Mérida, Venezuela (BIOULA).

RESULTADOS

El estudio histopatológico realizado a las secciones de placenta correspondientes al grupo de ratones infectadas preñadas reveló la presencia de abundantes infiltrados inflamatorios focalizados y difusos próximos y alrededor de los vasos sanguíneos (Fig. 1), células gigantes en las vellosidades placentarias y neutrófilos presentes en los espacios intervillosos. En el 7% (2/30) de los corazones de los fetos provenientes de madres con infección chagásica aguda, se observaron escasos infiltrados de células mononucleares focalizados entre las fibras musculares (Fig. 2). Los corazones del resto de los fetos se caracterizaron por presentar una histología conservada con gran cantidad de células en división y numerosos vasos sanguíneos. Igualmente en el 7% de los músculos de dichos fetos se comprobó la presencia de abundantes infiltrados infla-

matorios constituidos principalmente por células mononucleares focalizados entre las fibras musculares sin parasitismo tisular apreciable (Fig. 3). Mediante el estudio inmunohistoquímico realizado a las secciones de placenta y músculo esquelético de los fetos de madres infectadas fueron detectados moderados depósitos antigénicos de *T. cruzi* focalizados entre y sobre las fibras musculares así como a nivel del estroma, sin parasitismo tisular apreciable. De igual forma se evidenciaron infiltrados de células mononucleares en las secciones de músculo esquelético al igual que como fue observado mediante la coloración con hematoxilina-eosina, mientras que en las secciones de corazón la reacción PAP fue negativa.

Sin embargo, la ejecución de la técnica de PCR permitió detectar la presencia de ADN de *T. cruzi* en el 18% (5/27) de los tejidos placentarios, mientras que en las secciones de corazón y músculo esquelético de los fetos no se obtuvieron amplificadas (Fig. 4).

DISCUSIÓN

La enfermedad de Chagas es considerada un problema de salud pública en mu-

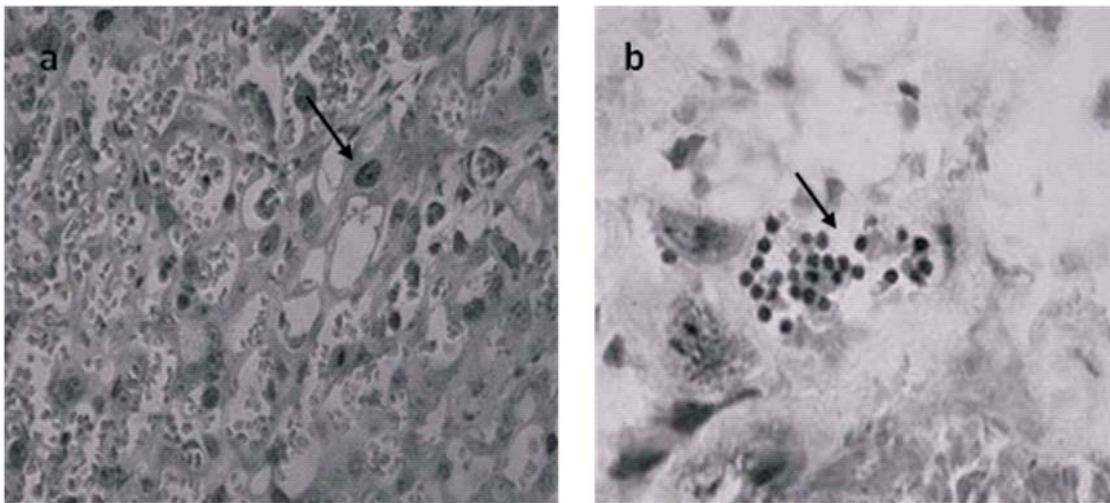


Fig. 1. (a) Sección histológica de placenta de ratón sana gestante mostrando las células del estroma del lado materno (→), (b) lado fetal de placenta de ratón infectada mostrando infiltrado inflamatorio focalizado de células mononucleares (→) (Hematoxilina-Eosina, 400X).

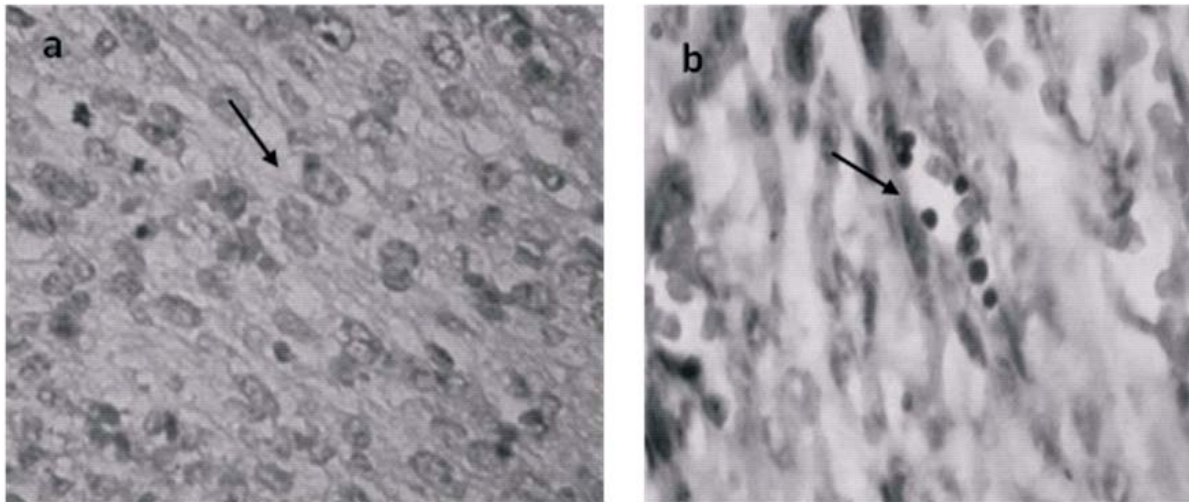


Fig. 2. (a) Corte histológico de corazón de feto proveniente de ratón sana gestante mostrando fibras musculares continuas y células cardíacas (→). (b) Sección de corazón de feto de madre con infección chagásica aguda y 20 días de gestación, obsérvese el infiltrado focalizado de células mononucleares entre las fibras y próximo a los vasos sanguíneos (→) (Hematoxilina-Eosina, 400X).

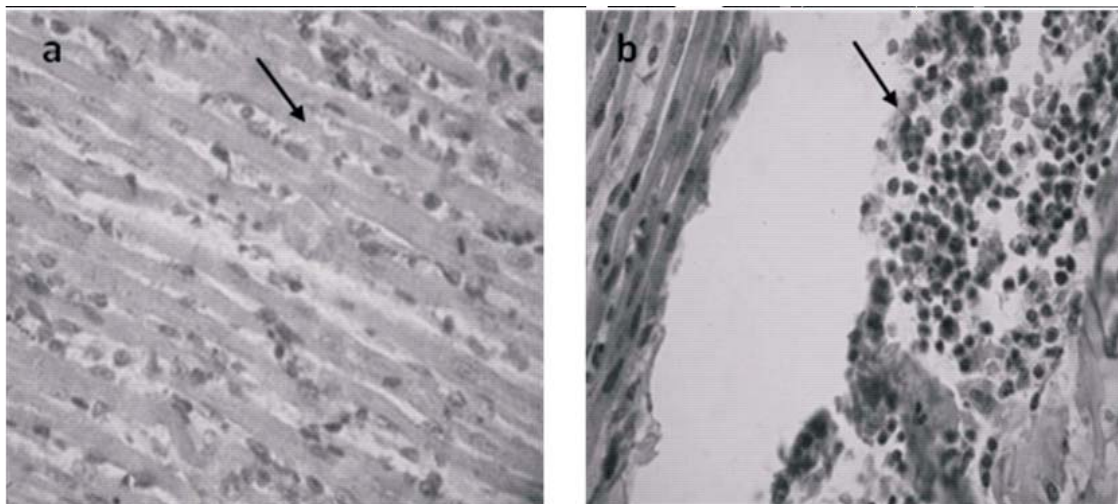


Fig. 3. (a) Sección de músculo esquelético de feto de ratón sana en la que se observa una histología conservada (→), (b) músculo esquelético de feto proveniente de ratón infectada gestante en la que se muestra infiltrado inflamatorio focalizado acompañado de daño tisular y pérdida de la continuidad en algunas fibras musculares (→) (Hematoxilina-Eosina, 400X).

chos países por la gran cantidad de personas afectadas y la variedad de manifestaciones clínicas con que se presenta (18). Muchos estudios han llevado a pensar que dicha variación está ligada directamente al genotipo de los parásitos circulantes, ya que diferencias genéticas en las poblaciones

del parásito hacen que estos presenten un tropismo diferencial por los tejidos del hospedador (19).

El diagnóstico a tiempo de la infección congénita aumenta la probabilidad de proveer un tratamiento eficaz; sin embargo, la detección de *T. cruzi* por los métodos para-

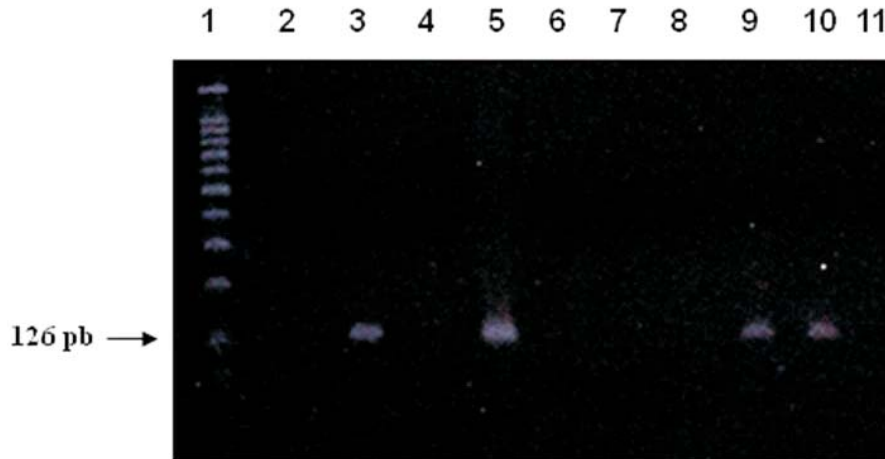


Fig. 4. Electroforesis en gel de agarosa al 2% con amplificados de 126 pb de muestras de tejidos de fetos de ratones infectadas con *T. cruzi*: Pozo 1.- Marcadores de peso molecular 100 pb. Pozo 2.- Control negativo. Pozo 3.- Control positivo. Pozos 4, 8.- Muestras de corazón de fetos provenientes de ratones infectadas. Pozos 5, 9, 10.- Muestras de placentas de ratones infectadas. Pozos 6, 7, 11.- Muestras de músculo esquelético de fetos de ratones infectadas.

sitológicos tradicionales (xenodiagnóstico, cultivo, histológicos) arrojan resultados a los 30 o 60 días de la obtención de la muestra (20). Por su parte el examen histopatológico de la placenta es un método de diagnóstico más sensible, a pesar que en algunos casos las placentas presentan nidos de amastigotes y los recién nacidos no se hallan infectados (21). No obstante, la infección parasitaria del trofoblasto ha sido considerada como necesaria, debido a que las células trofoblásticas de la placenta, funcionan como la principal barrera en la transferencia materno-fetal de cualquier microorganismo o agente infeccioso (22).

Algunos autores sugieren que debe producirse una lesión previa en el trofoblasto para que se produzca el pasaje de *T. cruzi* (23), mientras que otros estudios demuestran que la transmisión congénita puede ocurrir sin lesión previa del tejido trofoblástico (24). Es posible que la presencia de infiltrado de células mononucleares y polimorfonucleares detectado en las placentas de los ratones infectadas con *T. cruzi*, este relacionado con la activación del complemento por parte de los parásitos durante el

período materno-fetal (23). Si bien, no fue evidenciado parasitismo tisular por medio de la técnica de coloración con Hematoxilina-Eosina, la inmunotinción por PAP reveló la presencia de depósitos antigénicos del parásito en el tejido placentario. De igual manera, con la PCR se detectó ADN de *T. cruzi* en el 18% de las placentas estudiadas. Existe consenso en que la detección de ADN del parásito constituye una evidencia de su presencia en el organismo (25, 26), ya que los fragmentos nucleotídicos reconocidos pueden ser productos de parásitos extracelulares destruidos o de formas amastigotes que alcanzaron el torrente circulatorio luego de su interacción con células del sistema inmune (25). Según los criterios sostenidos por Delgado y Santos-Bush (27), cepas de *T. cruzi* de diferente origen, presentan diferente tropismo por la placenta, por lo que la transmisión congénita depende de la cepa del parásito y de la capacidad fagocítica de los macrófagos de las vellosidades placentarias (12, 28). Sin embargo, Virreira y col. señalan que el polimorfismo del ADN de *T. cruzi* no está asociado ni con la ocurrencia ni la diversidad clínica de la

infección congénita, por lo que sería de gran interés emplear cepas del parásito de diferentes genotipos con la finalidad de detectar menores diferencias entre las variedades de *T. cruzi* (29). En los subsiguientes estudios se plantea la utilización de diferentes cepas de aislados venezolanos donde se conoce que predomina el genotipo ZI y así comparar con la cepa Y, la cual corresponde al zimodemo ZII, genotipo IIb (19).

El hecho de que en los tejidos fetales (corazón y músculo esquelético), no se detectaron nidos de amastigotes ni ADN de *T. cruzi* podría indicar que la transmisión del parásito depende de factores individuales específicos de cada madre, la cual puede modificar su capacidad de controlar tal transmisión, ya sea a nivel placentario o sistémico (30). Del mismo modo, también se pudiese pensar que los linajes de mayor virulencia atraviesan con más facilidad la placenta y son más patógenos para el feto o recién nacido, según lo sugerido por anteriores estudios experimentales (31-33). El empleo de la técnica de PCR basada en la amplificación de un fragmento de 126 pb correspondiente al espaciador intergénico ribosomal permitió detectar ADN parasitario; sin embargo, el método más frecuentemente utilizado para la detección del parásito se basa en la amplificación de un fragmento de 330 pb del ADN kinetoplastídico (34), por lo que sería interesante realizar futuros estudios en los que se comparen diferentes blancos de amplificación de *T. cruzi*.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR), permite amplificar pequeñas cantidades de ADN presente en una muestra reproduciendo *in vitro* la replicación que ocurre *in vivo* en las células, aun cuando se conoce que es poco accesible a la mayoría de los centros sanitarios (35). Es importante destacar que dicha técnica resultó ser altamente sensible y con la gran ventaja de que se obtuvieron resultados en corto tiempo en comparación con los métodos con-

vencionales de diagnóstico de la enfermedad utilizados en este trabajo; a pesar de esto, es necesario considerar su factibilidad desde un punto de vista operacional y de costo-efectividad en las áreas endémicas afectadas.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo de Desarrollo Científico Humanístico y Tecnológico de la Universidad de los Andes (CDCHT) por el apoyo financiero Proyecto: C-1476-07-03-B.

REFERENCIAS

1. **Chagas C.** Nova trypanosomiasis humana. Estudio sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi*. N Gen Mem Inst Oswaldo Cruz 1909; 1:139-218.
2. **Cummings KL, Tarleton RL.** Rapid quantization of *Trypanosoma cruzi* in host tissue by real-time PCR. Mol Biochem Parasitol 2003; 129:53-59.
3. **Zhang L, Tarleton RL.** Parasite persistence correlates with disease severity and localization in chronic Chagas' disease. J Infect Dis 1999; 180:480-486.
4. **Kollien AH, Schaub GA.** The development of *Trypanosoma cruzi*. in triatominae. Parasitol Today 2000; 381-387.
5. **Cardoso A, Lescano S, Gakiya E, Santos S, Amato-Neto V.** Avaliação da sobrevivência do *Trypanosoma cruzi*. na cana de açúcar utilizada no preparo de caldo. Parasitol Latinoam 2005; 60:211-215.
6. **Nilo M, Alvarado J, Ramírez M, Espejo E.** Hallazgo de tripomastigotes en estudio citoquímico de líquido amniótico. Parasitol Latinoam 2005; 24:49-51.
7. **Bittencourt AL.** Possible risk factors for vertical transmission of Chagas disease. Rev Inst Med Trop São Paulo 1992; 34: 403-408.
8. **Moreno EA, Araujo M, Alarcón M, Luño-Yarbu A, Araujo S, Borges R.** Efecto de la infección chagásica aguda en ratas wistar gestantes. Rev Cient 2006; 5: 506-516.

9. **Andrade SG.** Interstitial dendritic cells of the heart harbor *T. cruzi* antigens in experimentally infected dogs: Importance for the pathogenesis of chagásic myocarditis. *Am Trop Med Hyg* 2000; 63:64-70.
10. **Schijman AG, Altcheh J, Burgos JM, Biancardi M, Bissio M, Levin MJ, Freilij H.** Aetiological treatment of congenital Chagas disease diagnosed and monitored by the polymerase chain reaction. *J Antim Chem* 2003; 52:441-449.
11. **Russomando G, Tomassone M, Guillen I, Acosta N, Vera N, Almiron M, Candia N, Calcena M, Figueredo A.** Treatment of congenital Chagas disease diagnosed and followed up by the polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg* 1998; 59:487-491.
12. **Virreira M, Truyens C, Alonso-Vega C, Brutus L, Jijena J, Torrico F, Carlier Y, Svoboda M.** Comparison of *Trypanosoma cruzi* lineages and levels of parasitic DNA in infected mothers and their newborns. *Am J Trop Med Hyg* 2007; 77:102-106.
13. **Virreira M, Torrico F, Truyens C, Alonso-Vega C, Solano M, Carlier Y, Svoboda M.** Comparison of polymerase chain reaction methods for reliable and easy detection of congenital *Trypanosoma cruzi* infection. *Am J Trop Med Hyg* 2003; 68:574-582.
14. **Pereira-Silva LH, Nussenzweig V.** Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. *Fol Clin Biol* 1953; 20:191-207.
15. **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.
16. **Waynforth H, Flecknell P.** Experimental and surgical technique in the rat. Academic Press Limited. London 1992; 6: 119-124.
17. **González N, Galindo I, Guevara P, Novak E, Scorza JV, Añez N.** Identification and detection of *Trypanosoma cruzi* by using a DNA amplification fingerprint obtained from the ribosomal intergenic spacer. *J Clin Microbiol* 1994; 32:153-158.
18. **Andrade LO, Machado CR, Chiari E, Pena SD, Macedo AM.** Differential tissue distribution of diverse clones of *Trypanosoma cruzi* in infected mice. *Mol Biochem Parasitol* 1999; 100:269-275.
19. **Botero LA, Mejia AM, Triana O.** Caracterización biológica y genética de dos clones pertenecientes a los grupos I y II de *Trypanosoma cruzi* de Colombia. *Biomed* 2007; 27:64-74.
20. **Freilij H, Altcheh J.** Chagas congénito. En: Storino R, Milei J (eds). *Enfermedad de Chagas*. Ed. Buenos Aires: Mosby Doyma. 1994. pp 267-278.
21. **Zaidenberg M.** Enfermedad de Chagas congénita. *Temas de zoonosis y enfermedades emergentes. Memorias del 2º Congreso Argentino de Zoonosis, Asociación Argentina de Zoonosis, 1998.* Buenos Aires p 114-148.
22. **Stuart H, Christopher M, Cisar M, Wu T, Andrew J.** Use of the placental perfusion model to evaluate transplacental passage of *Trypanosoma cruzi*. *Am J Obst Gynecol* 2005; 192:586-591.
23. **Andrade SG.** The influence of the strain of *Trypanosoma cruzi* in placental infections in mice. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1982; 76:123-128.
24. **Altemani A, Bittencourt A, Lana A.** Immunohistochemical characterization of the inflammatory infiltrate in placental Chagas disease: a qualitative and quantitative analysis. *Am J Trop Med Hyg* 2000; 62:319-326.
25. **Salomone O, Basquiera A.** *Trypanosoma cruzi* in persons without serologic evidence of disease. *Emerg Infect Dis* 2003; 9:1558-1562.
26. **Schijman AG, Altcheh J, Burgos JM.** Aetiological treatment of congenital Chagas disease diagnosed and monitored by polymerase chain reaction. *J Antimicrob Chem* 2003; 52:441-449.
27. **Delgado MA, Santos-Bush C.** Transplacental transmission and fetal parasitosis of *Trypanosoma cruzi* in outbred white swiss mice. *Am J Trop Med Hyg* 1978; 27:1108-1115.
28. **Virreira M, Alonso-Vega C, Solano M, Jijena J, Brutus L, Bustamante Z, Truyens C, Schneider D, Torrico F, Carlier Y, Svoboda M.** Congenital Chagas disease

- in Bolivia is not associated with DNA polymorphism of *Trypanosoma cruzi*. Am J Trop Med Hyg 2006; 75:871-879.
29. **Burgos J, Altcheh J, Bisis M, Duffy T, Valadares H, Seidenstein M, Piccinali R, Freitas J, Levin M, Macchi L, Macedo A, Freilij H, Schijman A.** Direct molecular profiling of minicircle signatures and lineages of *Trypanosoma cruzi* bloodstream populations causing congenital Chagas disease. Int J Parasitol 2007; 37: 1319-1327.
 30. **Torrice F, Vega A, Suarez E, Rodriguez 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 2004; 70:201-209.
 31. **Moreno EA, Rivera IM, Moreno SC, Alarcón ME, Lugo de Yabuh A.** Transmisión vertical de *Trypanosoma cruzi* en ratas Wistar durante la fase aguda de la infección. Invest Clin 2003; 44:241-254.
 32. **Macedo AM, Machado CR, Oliveira RP, Pena SD.** *Trypanosoma cruzi*: genetic structure of populations and relevance of genetic variability to the pathogenesis of Chagas disease. Mem Inst Oswaldo Cruz 2004; 99:1-12.
 33. **Alarcón M, Lugo-Yarbu A, Moreno E, Payares G, Araujo S, Colmenares M.** Presencia de *Trypanosoma cruzi* en tejidos de ratas Wistar infectadas experimentalmente y sus fetos. Bol Malariol Salud Amb 2006; 46:137-148.
 34. **Avila HA, Pereira JB.** Detection of *Trypanosoma cruzi* in blood specimens of chronic chagasic patients by Polymerase Reaction Chain amplification of kinetoplast minicircle DNA: Comparison with serology and xenodiagnosis. J Clin Microbiol 1993, 31:2421-2426.
 35. **Tarleton RL.** Parasite persistence in the aetiology of Chagas disease. Int J Parasitol 2001; 31:550-554.