

## Resistencia de las crías de ratas Wistar chagásicas a las reinfecciones por *Trypanosoma cruzi*

*The Resistance of Chagasic Wistar Rat Offspring to Reinfections by Trypanosoma cruzi*

**Mogollón M., Nora<sup>1</sup>; Moreno B., Elio<sup>1\*</sup>;  
Alarcón, Maritza; Lugo de Yarbuh, Ana<sup>1</sup>;  
Ramírez, Martha y Borges, Rafael<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Laboratorio de Parasitología Experimental (LAPEX), Facultad de Ciencias. <sup>2</sup>Departamento de Estadística, FACES, Universidad de Los Andes. \* eliomorenob@hotmail.com

### Resumen

Se evalúa la resistencia a las reinfecciones por *Trypanosoma cruzi*, en crías de ratas chagásicas. Se utilizaron 30 crías machos ( $\sigma$ ) de madres infectadas y 30 crías  $\sigma$  de madres sanas, divididos en grupos de 10 crías c/u (I, II, III) y (IV, V, VI). Los grupos (I, IV) y (II, V) fueron inoculados y reinoculados por vía intradérmica con  $5 \times 10^4$  tripomastigotes metacíclicos de *T. cruzi* PI (homóloga) y Y (heteróloga) provenientes de *Rhodnius prolixus*, con intervalos de un mes. Los grupos controles (III, VI) recibieron inyecciones de solución salina fisiológica. Las pruebas parasitológicas y serológicas realizadas en ambos grupos de crías infectadas a los 10, 20 y 30 días post-inoculación (pi), mostraron parasitemias significativamente mayores en las crías de madres sanas durante la fase aguda de la primo infección y ausencia de tripanosomas sanguícolas después de la 1ra y 2da reinoculación, un incremento significativo en los niveles anticuerpos anti-*T. cruzi* a partir de la inoculación inicial y reinoculaciones. Los análisis histopatológicos e inmunohistoquímicos en las secciones de corazón y músculo esquelético de las crías sacrificadas a los 45, 75 y 105 días pi, revelaron instauración progresiva de una miocarditis y miositis aguda de variable intensidad acompañada de escasos nidos de amastigotes y agravamiento del cuadro patológico producido por la inoculación inicial; presencia de abundantes depósitos antigénicos que se intensificaron con las reinoculaciones. En conclusión, la resistencia de las crías de madres infectadas a las reinfecciones por cepas *T. cruzi* homóloga y heteróloga, es producida, primero por la transferencia vertical del parásito y/o de anticuerpos humorales desde la madre infectada a su progenie, y segundo por un proceso de

sensibilización del hospedador por las continuas descargas antigénicas producidas al ser destruidos los parásitos inoculados.

**Palabras clave:** Resistencia, reinfección, *Trypanosoma cruzi*, rata Wistar, infección crónica.

## Abstract

The resistance to reinfection by *Trypanosome cruzi* in chagasic rat offspring was evaluated. Thirty male offspring ( $\sigma$ ) from infected mothers and 30 offspring  $\sigma$  from healthy mothers were used, divided into groups of 10 offspring each (I, II, III) and (IV, V, VI). The groups (I, IV) and (II, V) were inoculated and reinoculated by intradermal route with  $5 \times 10^4$  metacyclic trypomastigotes of homologous (pL) and heterologous (Y) strains of *T. cruzi*, from laboratory infected *Rhodnius prolixus*, at one-month intervals. The control groups (III, VI) received saline injections. The parasitological and serological testing performed on both groups of infected offspring at 10, 20 and 30 days post-reinoculation (pr) showed significantly higher parasitemia levels in offspring from healthy mothers during the acute phase of the primary infection, the absence of bloodstream trypomastigotes after the 1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> reinoculation, and a significant increase in anti-*T. cruzi* antibody levels after initial inoculation and reinoculations. The histopathological and immunohistochemical analysis of heart and skeletal muscle sections from the offspring sacrificed at 45, 75 and 105 days pi, revealed the gradual establishment of myocarditis and acute myositis of variable intensity accompanied by few nests of amastigotes, a worsening of the pathologic picture produced by the initial inoculation, and the presence of abundant antigenic deposits that intensified with the reinoculations. In conclusion, the resistance of offspring born from chm to homologous and heterologous reinfection by *T. cruzi* strains, is produced, first, by vertical transmission of the parasites and/or humoral antibodies from infected mothers to their progeny, and second, by a sensibilization process in the host from continuous antigenic downloads produced when the inoculated parasites are destroyed.

**Keywords:** Resistance, reinoculation, *Trypanosoma cruzi*, Wistar rat, chronic infection.

## Introducción

La enfermedad de Chagas es una parasitosis causada por el protozoo *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), transmitido al hombre por contaminación con las deyecciones post-pandriales de numerosas especies de hemípteros de la familia Reduviidae, subfamilia Triatominae (1). En algunos casos la infección chagásica ocurre durante el embarazo, principalmente en la fase aguda de la enfermedad maternal por el gran número de tripanosomas circulantes en la sangre, alcanzan-

do al embrión por vía hematogena, luego del pasaje por un mecanismo activo a través de la placenta, y/o por contaminación de los fetos al aspirar líquido amniótico infectado con parásitos o por la vía bucal a través de la leche materna durante la lactancia (2). En general, la infección chagásica constituye un problema de salud pública en América Latina donde aproximadamente 18 millones de personas están infectadas, de las cuales 6 a 8 millones presentan algunas de las manifestaciones clínicas de la fase crónica de la infección y 25% de la población total permanecen expuestas al riesgo de contraer la enfermedad, con ca-

sos esporádicos en Estados Unidos, Canadá y Europa (3).

La importancia de las reinfecciones con *T. cruzi* en la patogenia de la cardiopatía chagásica humana, constituye un motivo de gran interés principalmente en relación al conocimiento de la evolución de la enfermedad. Se ha señalado que personas residentes en áreas endémicas para la enfermedad de Chagas están constantemente expuestas a sufrir nuevas infecciones por *T. cruzi*. Dicha posibilidad está íntimamente relacionada con el índice y la densidad de infestación intradomiciliaria de triatomíneos vectores (4), la infección de los animales domésticos y/o peridomésticos, las condiciones de la vivienda que generan el ambiente propicio para el contacto hombre-vector (5). Dávila y col. (6) investigando las alteraciones electrocardiográficas en individuos infectados con *T. cruzi* con tiempo diferente de residencia en áreas de alta endemicidad, encontraron que el porcentaje de alteraciones electrocardiográficas compatibles con la cardiopatía chagásica era mayor en las personas con tiempo de residencia en zonas de alta endemicidad superior a los 20 años respecto a otras personas que habían vivido menos de cinco años en la misma zona. Los autores concluyeron que las posibilidades de reinfecciones por *T. cruzi* podría ser la causa de estas diferencias. Estas evidencias son reforzadas por Storino y col. (7) quienes sugieren que las personas infectadas de manera ocasional tienen menor compromiso cardíaco que aquellas infectadas en áreas endémicas, quizás por haber tenido menor cantidad de inoculaciones.

Trabajos experimentales han sugerido que las reinfecciones por *T. cruzi* inducen el desarrollo de resistencia después de la primera infección. Brumpt (8) demostró que ratones infectados con *T. cruzi* que sobreviven

a la infección aguda, subsecuentemente desarrollaban una fuerte inmunidad a las reinfecciones. A partir de entonces, otros mamíferos susceptibles han sido infectados y reinfectados con nuevos aislados de *T. cruzi* de diferente origen, mostrando una marcada resistencia a la segunda infección, sin presentar reactivación aparente de la parasitemia y alteraciones de variable intensidad en la histopatología del miocardio (9-15). Por otro lado, la transmisión vertical del parásito y de anticuerpos maternos anti-*T. cruzi* transferidos por vía transplacentar, y/o por la leche materna durante la lactación, le confieren a las crías un cierto grado de protección contra nuevas infecciones producidas por *T. cruzi* de diferente origen (16-20).

A partir de lo expuesto anteriormente y conociendo la importancia clínica y epidemiológica que juegan las reinfecciones por kinetoplastidos en las áreas endémicas rurales y suburbanas, consideramos de gran importancia epidemiológica investigar la evolución de la infección chagásica en las crías de ratas Wistar nacidas de madres crónicamente infectadas, frente a nuevas inoculaciones con cepas de *T. cruzi* homóloga (hom) y heteróloga (het), mediante pruebas de diagnóstico parasitológicas, serológicas, histopatológicas e inmunohistoquímicas.

## Materiales y métodos

### Cepas de parásitos

Se utilizaron tripomastigotes metacíclicos (tmc) de las cepas *T. cruzi* I/PAN/Ve/oo/Planalto (PI) y MAM/HOM/Br/53/Y. Ambas cepas de *T. cruzi* pertenecen al genotipo I (DTU I) (21, 22). La primera aislada de un triatómino (*Panstrongylus geniculatus*) capturado en la ciudad de Caracas y la segunda de un caso humano en Minas Gerais, Brasil

(23). Los parásitos han sido mantenidas en el Laboratorio de Parasitología Experimental (LAPEX) a través de pasajes sucesivos en medio de cultivo *in vitro*, en ratones NMRI y en ninfas de *Rhodnius prolixus* criadas en el laboratorio.

### Inoculación de las ratas

Un total de 20 ratas albinas hembras (♀), cepa Wistar, de un mes de nacidas y con 100-150 g de peso, obtenidas del Bioterio de cría de la Universidad de Los Andes (BIOULA), fueron inicialmente utilizadas. Estas fueron divididas en 2 grupos, un grupo de 10 ratas fue inoculado individualmente por vía intradérmica (ID) con  $2 \times 10^4$  tmc de *T. cruzi* Pl obtenidos de triatominos (*R. prolixus*) infectados experimentalmente en el laboratorio y contenidos en un volumen de 0,1 mL de la suspensión (24) y el otro grupo de 10 ratas fue utilizado como control al cual se les inyectó 0,1 mL de solución salina fisiológica. Las ratas infectadas y controles se mantuvieron en jaulas separadas en el bioterio experimental bajo condiciones controladas de temperatura y humedad relativa y alimentadas con dieta comercial (ratarina<sup>R</sup>) y agua *ad libitum*.

### Apareamiento

Entre los 90 y 120 días post-infección (pi), las ratas infectadas que superaron la fase aguda de la infección y las del grupo control, fueron apareadas con machos en una relación 2/1 por jaula, evaluando previamente su ciclo estral (25). Una vez comprobada la presencia de espermatozoides en la suspensión del lavado vaginal, las hembras fueron separadas de los machos y colocadas en jaulas individuales con suficiente alimento concentrado y agua para permitirles el desarrollo de la gestación y parto normal.

### Inoculación y reinoculación de las crías

Del total de crías obtenidas en ambas camadas, se seleccionaron 30 crías macho (♂) de madres infectadas y 30 crías ♂ de madres sanas de 30 días de nacidas. Ambos lotes, fueron divididos en seis grupos de 10 crías cada uno: Grupo I: crías nacidas de madres infectadas inoculadas y reinoculadas con *T. cruzi* Pl (hom); Grupo II: crías nacidas de madres infectadas inoculadas y reinoculadas con *T. cruzi* Y (het); Grupo III: crías nacidas de madres infectadas (control infectado); Grupo IV: crías nacidas de madres sanas inoculadas y reinoculadas con *T. cruzi* Pl; Grupo V: crías nacidas de madres sanas inoculadas y reinoculadas con *T. cruzi* Y; Grupo VI: crías de madres sanas (control sano). A las crías de los grupos (I, IV) y (II, V) se les practicaron tres inyecciones por vía ID con inóculos aproximados de  $5 \times 10^4$  tmc de *T. cruzi* Pl y *T. cruzi* Y respectivamente, con intervalos de un mes. Igualmente, los grupos controles (III, VI) recibieron inyecciones que contenían 0,1 mL de solución salina fisiológica.

### Obtención y procesamiento de muestras

A los 10, 20 y 30 días post-inoculación (pi), se extrajeron muestras de sangre con capilares heparinizados del plexo venoso de la órbita ocular, estando el animal ligeramente anestesiado. La sangre colectada en viales de plástico, fue utilizada para investigar parasitemias patentes y separar los sueros por centrifugación para su estudio serológico, mediante las técnicas de IFI (26) y ELISA (27).

A los 45, 75 y 105 días post reinoculación (pri), 3 crías de cada grupo experimental, fueron sacrificadas para extraer el corazón (C) que fue cortado longitudinalmente en dos partes iguales y fragmentos de músculo es-

quelético poplíteo (ME). Los tejidos fueron fijados con formalina al 10% e incluidos en Paraplast (Monoject Scientific, St. Louis, MO, USA). Cortes de 6  $\mu$  de espesor fueron obtenidos en un microtomo American Optical Spencer, unos fueron teñidos con Hematoxilina-Eosina (HE) y los otros fueron tratados con Peroxidasa anti Peroxidasa (PAP) (28) e IFI en tejido (29).

El manejo de los animales experimentales se realizó siguiendo el protocolo para manejo de animales de experimentación del Comité de Bioética y Seguridad de FONACIT ([www.fonacit.gob.ve](http://www.fonacit.gob.ve)) en su capítulo 2.

### Análisis estadístico

Los valores de parasitemias y densidad óptica (DO), fueron procesados por un análisis de variancia para efectos fijos y un contraste de inferencia simultánea. Se efectuaron pruebas a posteriori para determinar entre que pares de tiempos se están observando las diferencias significativas. Se consideró un nivel de significación del 5% (30). Los análisis fueron efectuados utilizando el lenguaje R (31).

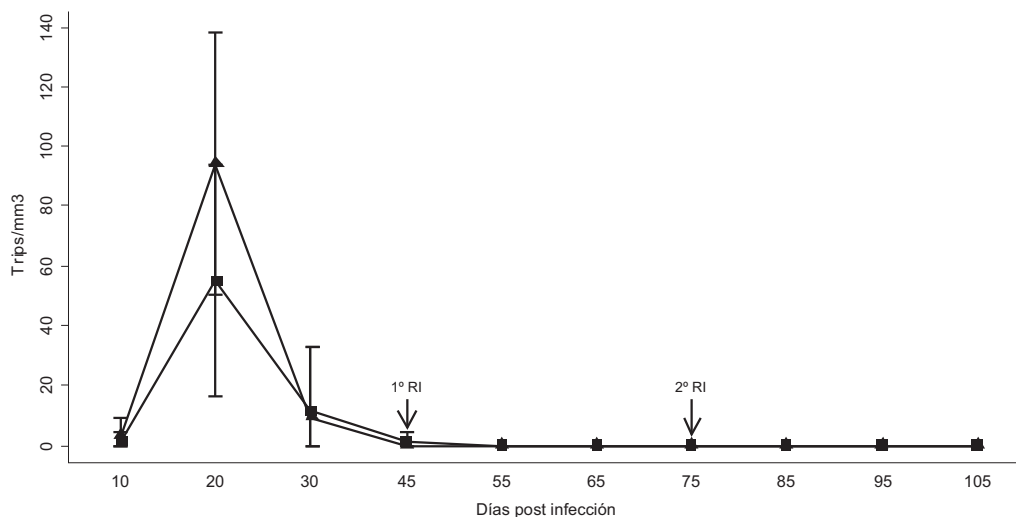
## Resultados

### Evaluación parasitológica

Las parasitemias en las crías de los grupos (I, IV) y (II, V) inoculadas y reinoculadas con las cepas de *T. cruzi* Pl y Y, fueron evaluadas durante la fase aguda de la infección, registrándose los máximos valores promedios de  $55,2 \pm 36,8$ ;  $94,2 \pm 41,8$  y  $14,3 \pm 14,2$ ;  $35,4 \pm 18,4$  trips/mm<sup>3</sup> a los 20 días pi. A partir de este muestreo, se apreció un decrecimiento progresivo en los niveles de parasitemias hasta los 45 días pi, cuando las muestras de sangre resultaron negativas (Figuras 1 y 2). Después de la 1era y 2da reinoculación y durante los 30 días siguientes, no se observaron tripanosomas en los exámenes de sangre realizados. El análisis estadístico reveló que la interacción grupo y tiempo fue significativa ( $p < 0,05$ ). No obstante, no se evidenció diferencias significativas del promedio de la parasitemia entre los grupos.

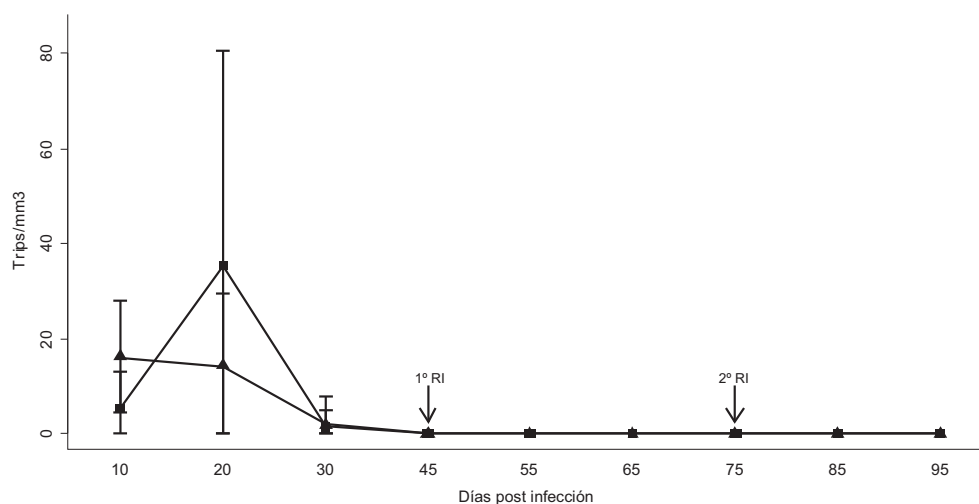
### Evaluación serológica

La evolución de la respuesta inmune humoral detectada en los sueros de las crías de



▲: Crías de madres sanas ■: Crías de madres infectadas. 1º RI y 2º RI reinoculación

**Figura 1.** Curvas de parasitemias en ratas Wistar  $\sigma$  inoculadas y reinoculadas con tripomastigotes metacíclicos ( $5 \times 10^4$  tmc) de la cepa de *T. cruzi* Pl (hom).



▲: Crías de madres sanas ■: Crías de madres infectadas. 1º RI y 2º RI reinoculación

**Figura 2.** Curvas de parasitemias en ratas Wistar ♂ inoculadas y reinoculadas con tripomastigotes metacíclicos ( $5 \times 10^4$  tmc) de la cepa de *T. cruzi* Y (het).

los grupos (I, IV) y (II, V), se representa en las Figuras 3 y 4. Se observó un incremento progresivo en los niveles de anticuerpos a partir de la inoculación inicial, incrementándose después de cada reinoculación y manteniéndose elevados hasta el final del experimento. Se evidenció presencia de IgG anti-*T. cruzi*, registrándose una reacción positiva con valores de DO que oscilaron entre 0,167; 1,227 (crías de madres infectadas) y 0,115; 0,813 (crías inoculadas y reinoculadas nacidas de madres sanas), correspondiente a la máxima dilución (1:200). El análisis estadístico reveló diferencias altamente significativas entre grupo y tiempo ( $p < 0,001$ ). Así mismo, se observó diferencias altamente significativa en el promedio entre los grupos ( $p < 0,001$ ).

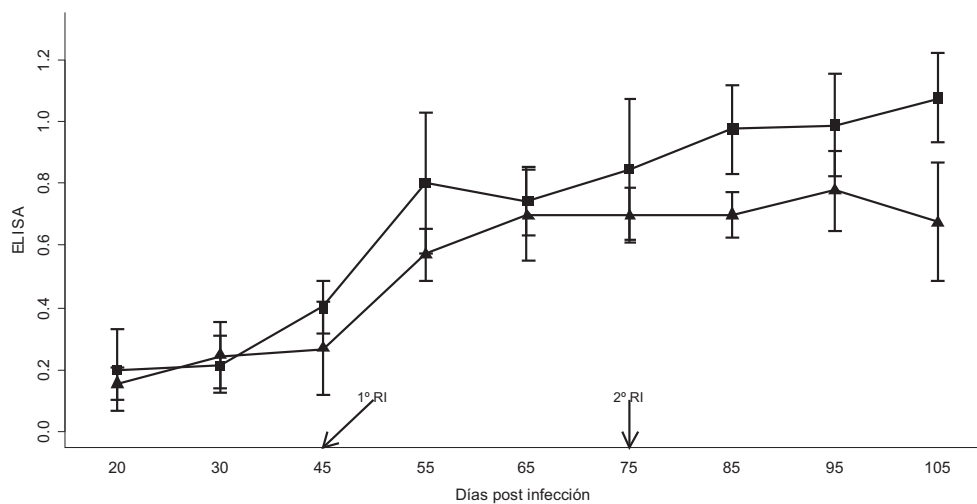
### Evaluación histopatológica e inmunohistoquímica

El estudio histopatológico de secciones de C y ME de crías inoculadas y reinoculadas con las formas mtc de *T. cruzi* Pl y Y, nacidas de madres sanas, reveló a los 45 días pi la instauración de una miocarditis y miositis aguda con infiltrado inflamatorio de naturaleza

linfoplasmohistiocitario de variable intensidad, acompañada de abundante parasitismo tisular, cuantificándose en el tejido cardíaco hasta 7 nidos de amastigotes de *T. cruzi*/campo. A nivel del ME el número de nidos de parásitos fue menor y dispersos entre las fibras musculares. En las crías reinoculadas y sacrificadas a los 75 y 105 días pi, se apreció en ambos tejidos un cuadro histopatológico con características de cronicidad, aumento en los procesos inflamatorios, abundantes mastocitos y macrófagos y escasos parasitismo tisular (Figuras 5A, B, C, D). Las secciones de C y ME tratadas con la técnicas de PAP e IFI, exhibieron una moderada reacción antigénica y presencia de algunos nidos de amastigotes de *T. cruzi* bien conservados a nivel del tejido esquelético (Figuras 6A, B, C, D).

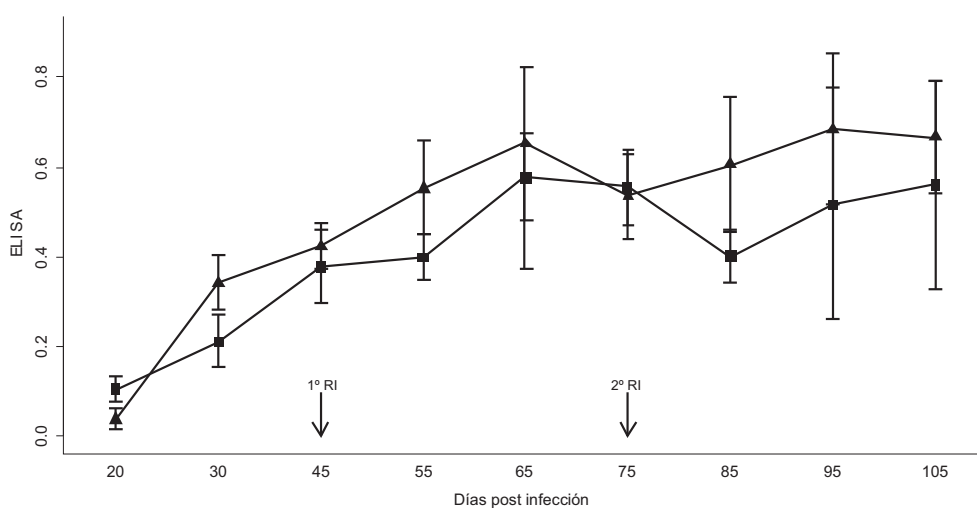
Las crías inoculadas y reinoculadas con las formas mtc de *T. cruzi* Pl y Y nacidas de madres infectadas, mostraron alteraciones de menor intensidad a nivel del C y ME. En las ratas primo-infectadas se evidenció la instauración de una miocarditis y miositis aguda, acompañada de discretos procesos infla-





▲: Crías de madres sanas ■: Crías de madres infectadas. 1° RI y 2° RI reinoculación

**Figura 3.** Evolución de la respuesta inmune humoral mediada por la IgG en las crías de ratas Wistar  $\sigma$  de los grupos (I, IV), inoculadas y reinoculadas con tripomastigotes metacíclicos ( $5 \times 10^4$  tmc) de la cepa de *T. cruzi* Pl (hom).

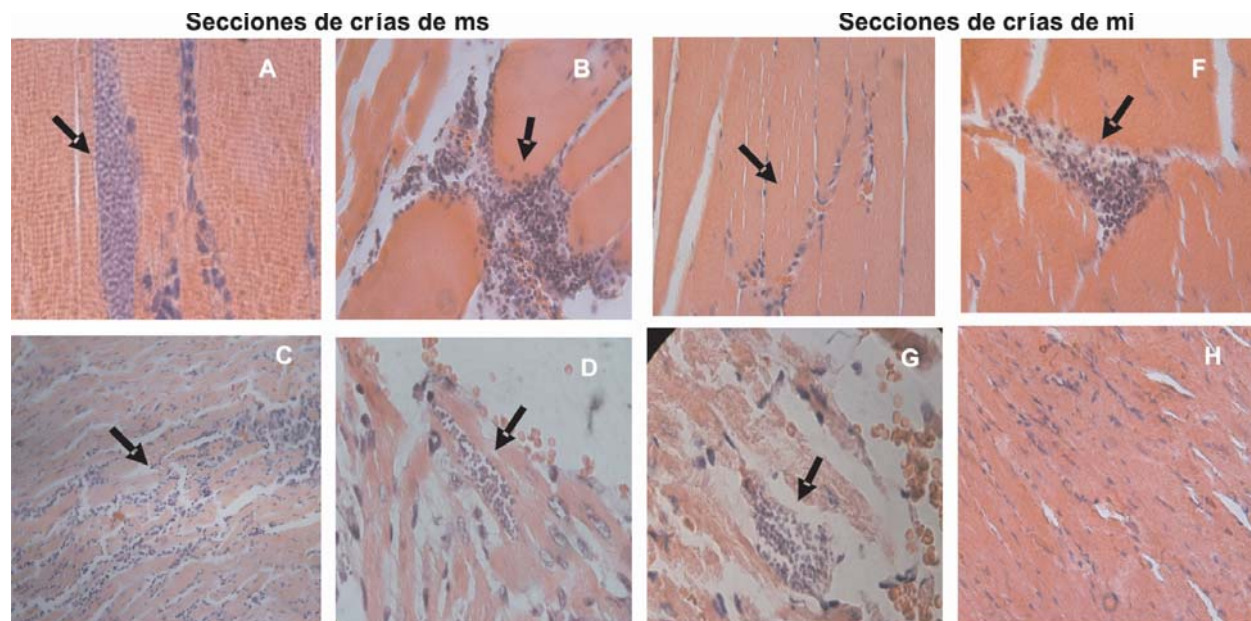


▲: Crías de madres infectadas ■: Crías de madres sanas. 1° RI y 2° RI reinoculación

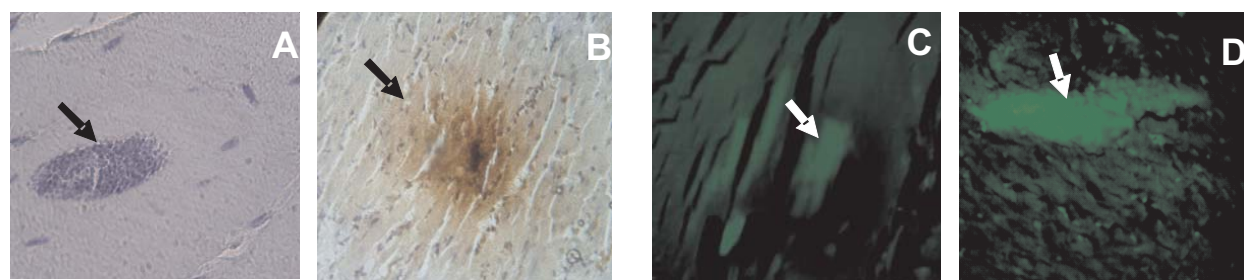
**Figura 4.** Evolución de la respuesta inmune humoral mediada por la IgG en las crías de ratas Wistar  $\sigma$  de los grupos (II, V), inoculadas y reinoculadas con tripomastigote smetacíclicos ( $5 \times 10^4$  tmc) de la cepa de *T. cruzi* Y (het).

matorios y escasos nidos de parásitos. En las secciones de los animales reinfectedos se observó persistencia del infiltrado inflamatorio, presencia de macrófagos en las fibras musculares y tendencia hacia la cronicidad (Figuras 5E, F, G, H). El análisis inmunohistoquímico reveló un aumento progresivo en la in-

tensidad de la reacción antigénica en la medida que las crías fueron reinoculadas con nuevas formas metacíclicas del parásito. Las crías del grupo 5 (crías de mi), mostraron discretas reacción antigénica anti-*T. cruzi* en ambos tejidos cardíaco y esquelético a los 30 días de la primera inyección de solución salina.



**Figura 5.** Histopatología del músculo esquelético y corazón de crías de ratas Wistar ♂ inoculadas y reinoculadas con formas mtc de las cepas Pl y Y de *T. cruzi*, nacidas de madres sanas (A, B, C, D) y de madres infectadas (E, F, G, H). (HE, 200X; 400X; 1000X: C; B, E, F, H; A, D, G).



**Figura 6.** Depósitos antigénicos teñidos con la técnica PAP e IFI en cortes de músculo esquelético y corazón de ratas Wistar ♂ inoculadas y reinoculadas con formas mtc de las cepas de *T. cruzi* Pl y Y (A y B) (PAP, 1000X); (C y D) (IFI, 400X).

## Discusión

Estudios realizados, tanto en humanos como en animales experimentales han postulado que durante el embarazo se desarrolla una respuesta inmune materno-fetal que puede influir en la respuesta del neonato; sin embargo, aún se desconocen tanto los factores que favorecen la transmisión vertical de *T. cruzi*, como aquellos que protegen a la gran mayoría de los hijos de madres infecta-

das al mantenerlos libres de la infección (32). La transferencia materno-fetal de antígenos podría influir en la capacidad de la progenie de responder a la infección, al modular el sistema inmune fetal. A pesar de que existe muy poca información relacionada con la inmunidad innata de los recién nacidos de madres infectadas, se sabe que la activación de los monocitos juega un papel importante tanto en el control de la infección como en el mantenimiento del embarazo (33).



Los resultados obtenidos en este trabajo, sugieren que la transmisión vertical del parásito y/o anticuerpos humorales de la madre infectada a su progenie, son los responsables primarios de la instauración de un estado de resistencia, confiriéndoles a las crías una cierta inmunidad a las reinfecciones sucesivas. Esta aseveración se confirma primero, por la presencia de parasitemias patentes, las cuales fueron mayores en las crías inoculadas con las formas metacíclicas de *T. cruzi* Pl (hom) nacidas de madres sanas, en comparación con las registradas en las crías nacidas de madres infectadas e inoculadas con la misma cepa de parásitos. Este patrón de respuesta ha sido ampliamente descrito con anterioridad y se corresponde con la fase aguda de la enfermedad de Chagas. En segundo lugar, no se evidenció parásitos después de cada una de las reinoculaciones, lo que sugiere que la infección inicial junto con el pasaje transplacentario de parásitos y/o anticuerpos maternos conducen a la activación de los mecanismos efectores de la respuesta inmune innata y adaptativa por parte de las crías, indicando que el efecto sinérgico de ambas respuestas las hizo inmunológicamente más competentes frente a la exposición de parásitos vivos (17-20).

En las crías inoculadas y reinoculadas con *T. cruzi* Y (het), los mayores niveles de parásitos en la sangre fueron observados en las crías nacidas de madres infectadas en comparación con la registrada en las crías inoculadas y reinoculadas nacidas de madres sanas. Igualmente, no se detectaron formas flageladas del parásito después de cada una de las reinoculaciones, confirmándose en este grupo experimental que la infección inicial junto con los anticuerpos maternos transferidos producen una resistencia moderada contra las reinfecciones. Kolodny (18) señaló que en las ratas la recuperación a la in-

fección aguda está seguida por una inmunidad concomitante (respuesta protectora), la cual las hace resistentes a las reinfecciones por un periodo considerable de tiempo.

En todas las crías inoculadas y reinoculadas con las cepas Pl y Y de *T. cruzi*, nacidas de madres sanas y de madres infectadas, se observó tras la primera y segunda reinoculación un aumento en los títulos de anticuerpos del isotipo IgG, así como de las lesiones y de los infiltrados celulares a nivel del músculo esquelético y cardíaco, sin reaparición de parasitemias patentes. Estas observaciones coinciden con lo indicado por Andrade y col. (12), quienes señalaron que las infecciones múltiples con *T. cruzi* de diferentes biotipos potencian e intensifican la respuesta inflamatoria sin exacerbación de la parasitemia. Sin embargo, estas lesiones se tornaron en intensas con presencia de células mononucleares y características histopatológicas de la respuesta inmune celular.

La producción de anticuerpos durante la infección por *T. cruzi* ha sido ampliamente estudiada, demostrándose que las inmunoglobulinas del tipo IgM, IgA e IgE no atraviesan la barrera placentaria. Sin embargo, la situación con el anticuerpo IgG es diferente, ya que ocurre transferencia placentaria de las subclases de IgG a través de transportes tanto pasivos como activos desde la sangre materna al feto durante la gestación, además, en el desarrollo embrionario las células fetales del bazo son capaces de sintetizar pequeñas fracciones de este tipo de anticuerpo, elevándose de esta manera los niveles de IgG en las crías de madres infectadas, favoreciendo la neutralización y eliminación de los parásitos después de la reactivación de la respuesta inmune humoral (34).

En contraste, Bustamante y col. (10, 11), estudiando el efecto de las reinfecciones con diferentes cepas de *T. cruzi* en la progresión

de la cardiopatía chagásica, encontraron que en ratones albinos suizos, se incrementaba el número de parásitos circulantes en sangre periférica sólo cuando las reinoculaciones tienen lugar durante la fase aguda de la infección, lo cual suprime el establecimiento de una repuesta inmune por parte del hospedador para prevenir de esta forma el incremento de la parasitemia. Estos autores concluyeron que diferentes cepas de *T. cruzi* en conjunto con las reinfecciones pueden alterar el equilibrio de la relación parásito-hospedador, siendo estos factores los responsables de la cardiopatía progresiva en la enfermedad de Chagas experimental.

En este mismo orden de ideas, las crías inoculadas y reinoculadas con la cepa heteróloga Y de *T. cruzi* exhibieron un comportamiento diferente durante la fase aguda de la infección, detectándose en las crías de madres infectadas los mayores niveles de parasitemias. Posiblemente la genética y las características biológicas de las diferentes cepas de *T. cruzi* están modulando los distintos aspectos involucrados en la epidemiología de la enfermedad de Chagas (35). Otros autores han considerado que existen determinantes específicos en el desarrollo de la infección chagásica, tales como la cantidad de parásitos utilizada durante la inoculación inicial; la forma infectiva del inóculo; el linaje de la cepa de *T. cruzi* inoculada; las reinfecciones; la patogenicidad de las diferentes cepas y clones del parásito; los receptores histotrópicos del hospedador y la eficiencia de la respuesta inmune inicial y tardía en los pacientes infectados (36, 37).

En relación a la influencia de las reinoculaciones sobre la histopatología del corazón y músculo esquelético producida por la infección inicial en las crías inoculadas y reinoculadas con la cepa homóloga de *T. cruzi* nacidas de madres sanas, se observó cambios

importantes como la presencia de discretos procesos inflamatorios de naturaleza linfoplasmohistiocitarios, acompañados de abundante parasitismo tisular. Después de las reinoculaciones se evidenció una marcada disminución en el número de nidos de amastigotes con aumento de las alteraciones a nivel del miocardio y entre las fibras del músculo esquelético. Igualmente, la histopatología observada en las crías nacidas de madres infectadas después de la primo infección, fue similar pero de menor intensidad, en este caso sólo se observó moderada persistencia parasitaria luego de la primera reinoculación. Nuestros resultados mostraron que las reinfecciones agravan el cuadro histopatológico producido por la inoculación inicial, lo cual probablemente se debe a un proceso de sensibilización del hospedador, frente a las descargas antigénicas producidas por la destrucción de los parásitos reinoculados. El incremento en los procesos inflamatorios y la disminución de los nidos de amastigotes confirman en parte la opinión de Kierszenbaum (38) quien señala que el cuadro patológico en la fase crónica de la enfermedad de Chagas está acompañado por una respuesta de naturaleza autoinmune, la cual no es más que el producto de una exacerbada respuesta inflamatoria generada en la búsqueda por eliminar el parásito. Tarlenton (39) considera que la persistencia del parásito es un pre-requisito para la instauración de la patología en la fase crónica de la infección. No obstante, la persistencia del parásito está relacionada con la severidad de la enfermedad, recientemente han surgido evidencias en casos humanos y modelos experimentales que vinculan las reinfecciones y la exposición prolongada del parásito con las lesiones características en la fase crónica de la infección (4, 11).

Por otro lado, Cabrine-Santos y col. (40), evaluando el tropismo del parásito en

los tejidos de hamsters infectados y reinfectados con formas metacíclicas de *T. cruzi* durante la fase crónica de la enfermedad, encontraron que la reinfección no es un factor determinante en el desarrollo de los procesos inflamatorios, aunque esta podría inducir lesiones más severas en hamsters alogénicos, posiblemente con incremento en el parasitismo tisular. Sin embargo, estos resultados como los de Bustamante y col. (10) indican que las reinfecciones por *T. cruzi* están íntimamente relacionadas con la variabilidad y severidad del curso clínico en la infección chagásica, y que parásitos persistentes son necesarios para exacerbar la patología de la enfermedad.

Así mismo, las razones de la gran variabilidad y gravedad de los cuadros clínicos que pueden presentarse durante las fases aguda y crónica, no están bien determinadas, aunque se han mencionado factores dependientes tanto del hospedador como del parásito (41). Con relación a este último, ya hemos mencionado que existe una gran variabilidad genética de poblaciones de *T. cruzi* que han sido establecidas a partir de características isoenzimáticas, que podrían ser las determinantes en el mayor o menor grado de patogenicidad y virulencia presentes en ratones infectados experimentalmente con poblaciones diferentes de *T. cruzi*. Además, se han descrito en modelos experimentales, que existen diferencias en el comportamiento biológico del hospedador frente a la infección, así como en la respuesta a la lisis por el complemento que se encuentra mediada por los anticuerpos (42).

Las secciones histológicas de corazón y músculo esquelético de las crías inoculadas y reinoculadas con la cepa heteróloga de *T. cruzi* nacidas de madres sanas y de madres infectadas, se caracterizaron por presentar discretos focos inflamatorios después de la inoculación inicial; este cuadro histopatoló-

gico persistió luego de la primera reinoculación. Las lesiones en los tejidos se vieron intensificadas tras la segunda reinoculación, resultados que se pueden explicar mediante el papel de la autoinmunidad en el establecimiento de la enfermedad de Chagas crónica.

Desde el punto de vista inmunohistoquímico, las pruebas empleadas (PAP e IFI) permitieron demostrar a nivel del corazón y musculatura esquelética la presencia de depósitos antigénicos de variable intensidad. Estas reacciones fueron más intensas en la medida que los animales fueron reinoculados con nuevas formas metacíclicas del parásito. La persistencia parasitaria se pudo demostrar en la musculatura esquelética en una cría nacida de madre sana, después de la segunda reinoculación con la cepa heteróloga de *T. cruzi*. En las otras secciones, la positividad de las reacciones posiblemente corresponda a proteínas solubles del parásito dispersas entre los tejidos y las células inflamatorias que median su destrucción. Igualmente, investigaciones llevadas a cabo en modelos experimentalmente infectados con *T. cruzi* y en biopsias de pacientes con enfermedad de Chagas crónica, han demostrado persistencia parasitaria y abundantes depósitos antigénicos dispersos en las secciones de corazón y músculo esquelético (43, 44). Los nidos de amastigotes detectados por la técnica de PAP en las fibras esqueléticas y cardíacas de algunas de las crías inoculadas y reinoculadas con ambas cepas de *T. cruzi*, probablemente son el blanco de las reacciones inmunes responsables de las secuelas observadas durante las fases aguda y crónica de la infección (45).

El destino y el potencial patogénico del parásito reinoculado debe ser investigado a fondo, más aún cuando existen estudios que sustentan la persistencia del parásito como posible causa de la instauración de la miocarditis chagásica crónica, para ello es recomen-

dable evaluar el papel de las reinfecciones con cepas diferentes de *T. cruzi* en un mismo organismo, pues consideramos que se asemejaría más con la transmisión vectorial que ocurre en áreas endémicas. Además, sería importante estudiar el papel de la reinoculaciones sucesivas en las madres durante la gestación y/o en los siguientes embarazos, a fin de poder evaluar de esta manera si ocurre mayor transmisión vertical y de anticuerpos específicos anti-*T. cruzi* a su prole.

### Agradecimientos

Al Consejo de Desarrollo Científico, Humanístico y Tecnológico de la Universidad de Los Andes por el financiamiento del Proyecto C-1184-03-03-A.

### Referencias bibliográficas

- (1) Kollien AH, Schaub GA. The development of *Trypanosoma cruzi* in triatomine. *Parasitol Today* 2000; 16: 361-406.
- (2) Bittencourt A. Transmissão Vertical da Doença da Chagas. En: Brener Z., Andrade Z.A. & Barral-Neto M. Eds: *Trypanosoma cruzi*. e Doença da Chagas, 2ª. Edição Guanabara Koogan, Brasil, 2000; p.16-20.
- (3) W.H.O. Control of Chagas' disease. *Thech Rep Ser. Geneva* 2003; N° 905-pp 74.
- (4) Prata A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas' disease. *The Lancet Inf Dis* 2001; 1: 92-100.
- (5) Sanmartino M, Crocco L. Conocimiento sobre la enfermedad de Chagas y factores de riesgo en comunidades epidemiológicamente diferentes de Argentina. *Rev Panam Salud Public* 2000; 7: 173-178.
- (6) Dávila H, Beloscar JS, Bottasso OA, Morini JC. Alteraciones electrocardiográficas en individuos infectados con *Trypanosoma cruzi* con distinto tiempo de residencia en áreas de alta endemicidad. *Med (B. Aires)* 1990; 47: 154-158.
- (7) Storino R, Auger S, Caravello O, Urrutia M, Sanmartino M, Jorg M. Cardiopatía chagásica en pacientes de área endémica versus contagiados en forma ocasional. *Rev Saúde Publi* 2002; 36: 755-758.
- (8) Brumpt E. Immunité partielle dans les infections á *Trypanosoma cruzi*, transmission de ce trypanosome par *Cimex rotundus*. Rôle régulateur des la peau. *Bull Soc Pathol Exot* 1913; 6: 172-176.
- (9) Pereira MES, Krettli AU. The effect of reinoculations with trypomastigotes in the level of protective antibodies in mice chronically infect reactivated with *Trypanosoma cruzi*. *Brazilian J Med Bil Res* 1990; 23: 283-292.
- (10) Bustamante J, Rivarola H, Fernandez A, Enders J, Fretes R, Palma J, *et al.* *Trypanosoma cruzi* reinfections in mice determine the severity of cardiac damage. *Inter J Parasitol* 2002; 32: 889-896.
- (11) Bustamante J, Rivarola H, Fernández A, Enders J, Fretes R, Palma J, *et al.* Indeterminate Chagas' disease: *Trypanosoma cruzi* and re-infection are factors involved in the progression of cardiopathy. *Clin Sci* 2003; 104: 415-420.
- (12) Andrade S, Figueira R, Castro K, Barbosa J, Pereira R, Guerreiro M. Reinfections with strains of *Trypanosoma cruzi*, of different biomes as a factor of aggravation of myocarditis and myositis in mice. *Rev Soc Bras Med Trop* 2006; 39: 1-8.
- (13) Revelli S, Berra H, Valenti J, Moreno H, Bernasconi M, Poli H, *et al.* Efecto de la reinfección sobre la evolución de ratas infectadas con *Trypanosoma cruzi*. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1990; 32: 260-268.
- (14) Riarte A, Sinagra A, Lauricella M, Bolomo N, Moreno M, Cossio P, *et al.* Chronic experimental infection by *Trypanosoma cruzi* in *Cebus apella* monkeys. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1995; 90: 733-740.
- (15) Machado E, Fernandes A, Murta S, Vitor R, Camilo D, Pinheiro S, *et al.* A study of experimental reinfection by *Trypanosoma cruzi* in dogs. *Am J Trop Med Hyg* 2001; 65: 958-965.

- (16) Moreno EA, Rivera I, Moreno SC, Alarcón M, Lugo de Yarbuh A. Transmisión vertical de *Trypanosoma cruzi* en ratas Wistar durante la fase aguda de la infección. *Invest Clin* 2003; 44: 241-254.
- (17) Moreno EA, Quintero AC, Alarcón M, Lugo de Yarbuh A, Moreno S, Araujo S, et al. Investigación sobre la transmisión vertical de *Trypanosoma cruzi* en ratas Wistar crónicamente infectadas. *Bol Malariol Sal Amb* 2006; 46: 149-160.
- (18) Kolodny M. The transmission of immunity in experimental trypanosomiasis (*Trypanosoma cruzi*) from mother rats to their offspring. *Am J Hyg* 1939; 30: 19-39.
- (19) Carlier I, Rivera MT, Truyens C, Ontivero M, Flament J, Van Marck E, et al. Chagas' disease: decreased resistance to *Trypanosoma cruzi* acquired infection in offspring of infected mice. *Am J Trop Med Hyg* 1992; 46: 116-122.
- (20) Marques de Araujo S, Chiari. *Trypanosoma cruzi* infection in offspring born to chagasic C<sub>3</sub>H/He mice mothers. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1996; 91: 211-216.
- (21) Carrasco HJ, Segovia M, Llewellyn MS, Morcoima A, Urdaneta-Morales S, Martínez C, et al. Geographical Distribution of *Trypanosoma cruzi* Genotypes in Venezuela. *PLoS Negl Trop Dis* 2012; 6: e1707.
- (22) Zingales B, Andrade SG, Briones MR, Campbell DA, Chiari E, Fernandes O, et al. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intra-specific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009; 104: 1051-1054.
- (23) Pereira da Silva LH, Nussenzweig V. Sobre una cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para ocamundongo branco. *Fol Clin Biol* 1953; 20: 191-207.
- (24) Brener Z. Observações sobre a imunidade a superinfecções em camundongos experimentalmente inoculados com *Trypanosoma cruzi* e submetidos a tratamento. *Ver Inst Med Trop Sao Paulo* 1962; 4:119-123.
- (25) Marcondes FK, Bianchi FJ, Tanno AP. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful consideration. *Braz J Biol* 2002; 62: 609-914.
- (26) Camargo ME. Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of American Trypanosomiasis. Technical modification employing preserved culture forms of *Trypanosoma cruzi* in a slide test. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 1966; 8: 227-234.
- (27) Voller A, Drapper CC, Bidwell D, Barlett A. Microplate ELISA for Chagas' disease. *Lancet* 1975; 1: 426-429.
- (28) Sell P, Burton M. Identification of *Leishmania* amastigotes and their antigens in formaline fixed. Tissue by immunoperoxidase stain. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 1981; 75:461-468.
- (29) Higuchi ML, Brito T, Reiss MM, Barbosa AJA, Belloti G, Pereira-Barreto AC, et al. Correlation between *Trypanosoma cruzi* parasitism and myocardial inflammatory infiltrate in human chronic chagasic myocarditis: light microscopy and immunohistochemical finding. *Cardiovasc Pathol* 1993; 2: 101-106.
- (30) Box GEP, Hunter JS, Hunter WG. Statistics for Experimenters: Design, Innovation, and Discovery. Segunda edición. N.Y.: John Wiley & Sons 2005.
- (31) R. Development Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria (URL: <http://www.R-project.org>) 2007.
- (32) Schmunis GA, Szarfman A. Congenital Chagas' disease. *Med (B. Aires)* 1977; 37:47-53.
- (33) Carlier Y, Torrico F. Congenital infection with *Trypanosoma cruzi*: from mechanisms of transmission to strategies for diagnosis and control. *Ver Soc Bras Med Trop* 2003; 36: 767-771.
- (34) Reyes MB, Lorca M, Munoz P, Frasch AC. Fetal IgG specificities against *Trypanosoma cruzi* antigens in infected newborns. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87:2846-2850.
- (35) Souto RP, Fernandes O, Macedo AM, Campbell DA, Zingales B. DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 1996; 83: 141-152.
- (36) Fernandes CD, Murta SM, Ceravolo IP, Krug LP, Vidigal PG, Steindel M, et al. Characteri-



- zation of *Trypanosoma cruzi* strains isolated from chronic Chagasic patients, triatomines and opossums naturally infected from the State of Rio Grande do Sul, Brazil. MemInst Osw Cruz 1997; 92: 343-351.
- (37) Teixeira MMG, Da Silva FM, Marcili A, Umezawa E, Shikanai-Yasuda MA, Cunha-Neto. *Trypanosoma cruzi* lineage in endomyocardial biopsy from north-eastern Brazilian patient at end-stage chagasic cardiomyopathy. Trop Med Intern Health 2006; 2: 294-298.
- (38) Kierszenbaum F. Chagas' disease and the autoimmunity hypothesis. Clin Microbiol 1999; 12: 210-223.
- (39) Tarleton R. Chagas' disease: a role for autoimmunity? Trends Parasitol 2003; 19: 447-451.
- (40) Cabrine-Santos M, Lages E, Chapadeiro E, Ramírez LE. *Trypanosoma cruzi*: characterization of reinfection and search for tissue tropism in hamsters (*Mesocricetus auratus*). Exp Parasitol 2001; 99: 160-167.
- (41) Wallace A, Ortiz S, Sánchez G, Villagra R, Puga M, Solari A. Studies on parasitemia courses and mortality in mice infected with genetically distant *Trypanosoma cruzi* clonets display dissimilar parasitemia courses. Biol Res 2001; 34: 83-90.
- (42) Pizzi T, Wallace A, Villagra R, Muñoz S, Ortiz S, Solari A. Concordancia de lesiones histológicas en ratones infectados por poblaciones de *Trypanosoma cruzi* de Chile. Rev Med Chile 2005; 133: 432-438.
- (43) Añez N, Carrasco H, Parada H, Crisanti G, Rojas A, Fuenmayor C, et al. Myocardial parasite persistence in chronic chagasic patients. Am J Trop Med Hyg 1999; 60: 726-732.
- (44) Guarner J, Bartlett J, Colley GD, Grijalva JM, Powel R. Mouse model for Chagas' disease: immunohistochemical distribution of different stages of *Trypanosoma cruzi* in tissues throughout infection. Am J Trop Med Hyg 2001; 65: 152-158.
- (45) Moreno EA, Méndez IM, Alarcón ME, Araújo AS, Lugo de Yarbu A. Reactivación de la infección chagásica en ratas Wistar gestantes. Kasmera 2005; 33: 51-63.