
UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA

FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS

**PARTICIPACIÓN DEL ÓXIDO NITRICO PLACENTARIO EN EL
PROCESO DE INTERIORIZACIÓN DEL T CRUZI
EN VELLOSIDADES CORIALES HUMANAS**

Claudia E. Guerrero

Córdoba

República Argentina

2009

Comisión de seguimiento de tesis

Director de Tesis:

Prof. Dr. Ricardo E. Fretes

Integrantes:

Prof. Dra. Patricia Paglini

Prof. Dra. Alicia Torres

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido posible gracias a la inestimable colaboración de muchas personas.

Quiero expresar mi agradecimiento a:

Al Prof. Dr. Ricardo Fretes, Profesor Adjunto de la II Cátedra de Histología de la U.N.C y director de este trabajo de tesis sin cuya orientación y consejos no hubiera sido posible llevar a cabo este proyecto.

A los miembros de mi Comisión de Seguimiento: Prof. Dra. Alicia Torres y Prof. Dra. Patricia Paglini, por sus valorables sugerencias a la versión original del manuscrito, que contribuyeron al mejoramiento y ordenamiento del presente trabajo.

Al Prof. Dr. Hugo Luján, por haber depositado su confianza en mí, por acompañarme y estimularme en este esfuerzo.

A mis compañeras de laboratorio: Elisa, Gina, Fernanda y especialmente a Cintia, cuyo trabajo permanente y anónimo se convierte en ejemplo para muchos jóvenes investigadores de esta casa de altos estudios, por su constante espíritu servicial y desinteresada colaboración.

A las instituciones, que facilitaron el material de estudio para este trabajo ya sea en forma de historias clínicas o muestras de anatomía patológica, pero muy especialmente a quienes desarrollan actividad asistencial y contribuyen de esta forma a mejorar la salud de nuestra población, un especial agradecimiento entonces a quienes se desempeñan en el Hospital Misericordia, Materno Neonatal, Hospital Materno Provincial y especialmente al personal del Hospital Universitario de Maternidad y Neonatología, dependiente de esta Universidad y en cuyas pasillos comenzó mi vida como médica.

A mis padres que supieron templar mi espíritu.

Por fin y muy especialmente a mi esposo Marcelo por ser un ejemplo de tenacidad, perseverancia, fortaleza y a mis tres hijos María Florencia, Pablo y María Emilia, quienes inspiran mis jornadas, las llenan de alegría y me dan la fuerza cada día para seguir adelante en pos de dejar un mundo mejor en el que seguir creyendo.

A todos aquellos que de alguna manera han hecho posible que esta tesis sea una realidad, a cada uno de ellos mi más sincero agradecimiento.

Artículo 30º del reglamento de la Carrera de Doctorado en Ciencias de la
Salud

“La Facultad de Ciencias Médicas no se hace solidaria con las opiniones
de esta tesis”.

ÍNDICE

RESUMEN	VII
SUMMARY	IX
ABREVIATURAS	XI
CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN	1
PLACENTA	2
OXIDO NITRICO Y SU ENZIMA PRODUCTORA	8
ENFERMEDAD DE CHAGAS	15
CHAGAS CONGÉNITO	21
OBJETIVOS	
OBJETIVO GENERAL:	27
OBJETIVOS ESPECIFICOS:	27
CAPÍTULO 2: MATERIAL Y MÉTODOS	28
A: ESTUDIOS "IN VITRO"	29
B: ESTUDIOS EN PLACENTAS DE ARCHIVO	34
C: ANÁLISIS ESTADÍSTICOS DE LOS DATOS	40
CAPÍTULO 3: RESULTADOS	42
CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN	68
CONCLUSIONES	89
CAPÍTULO 5: BIBLIOGRAFIA	92
ANEXO 1	
PUBLICACIONES EN REVISTAS CIENTIFICAS (TRABAJOS COMPLE- TOS Y ABSTRACTS)	113
PONENCIAS PRESENTADAS Y PUBLICADAS EN ACTAS DE REUNIO- NES CIENTIFICAS CON REFERATO	115

RESUMEN

El Chagas congénito es una enfermedad causada por la transmisión del *Trypanosoma cruzi* de la madre infectada a su hijo durante el embarazo y etapa perinatal. La incidencia es baja. Se han descrito en este proceso factores placentarios, maternos y/o parasitarios. La placenta humana está regulada por la actividad de factores humorales entre los que se encuentra el óxido nítrico, formado por la enzima Óxido Nítrico Sintasa. La isoforma que predomina a nivel trofoblástico y endotelial fetal es la tipo III o endotelial y la otra isoforma descrita es la tipo II o inducible. El óxido nítrico es parasiticida y el principal agente deletéreo para el *T. cruzi*.

Como objetivo general se planteó poder identificar factores de la placenta humana y aspectos clínico-epidemiológicos que pudieran afectar la estructura del agente causal de la enfermedad de Chagas y su capacidad de producir la infección congénita en embarazadas chagásicas

En nuestros estudios *in vitro* a las 72 hs de co-cultivo de explantos de placentas normales con el *T. cruzi*, el 98% de las células parasitarias fueron no viables, con una significativa diferencia con respecto a los datos obtenidos en células controles susceptibles a la infección por este parásito (células Vero) ($p < 0,05$). Se observó relación entre incremento de niveles de nitritos en los medios de cultivos con aumento en la mortalidad del *T. cruzi* entre las 3 hs y las 72 hs de cultivos. La presencia del *T. cruzi* en el interior del tejido placentario representó el $15,76 \pm 3,26 \text{ um}^2$ ($p < 0,05$) y la cantidad de amastigotes del *T. cruzi* por nido de $4,5 \pm 2$, a diferencia de las células Vero (55 ± 22 amastigotes por nido). Estos datos indican que las vellosidades coriónicas de la placenta no permiten una infección productiva del *T. cruzi*.

Los estudios *ex vivo* se realizaron con un grupo de embarazadas chagásicas que transmitieron (ChC) ($n = 9$) y no transmitieron (ChnoC) ($n = 63$) la infección al hijo. A partir de ambos grupos se obtuvieron 13 placentas. El análisis de la procedencia de las embarazadas que transmitieron la enfermedad a sus hijos demuestra que el 50% provino de zonas endémicas y el 50% de áreas no endémicas. Nuestra muestra indica que los recién nacidos (RN) de sexo femenino presentaron la infección congénita significativamente mayor que los RN varones, como así también hubo diferencias con respecto al peso del RN, con

una media de 2794 gr y de 3375 gr para los RN con infección vertical y sin infección congénita respectivamente ($p < 0,05$). El peso de las placentas dentro del grupo ChC presentó una amplia dispersión (604 ± 180 gr) a diferencia de los grupos ChnoC (510 ± 100 gr) y normal (540 ± 55 gr). La determinación del Índice Placentario (relación peso RN y peso de su placenta) dio valores superiores en el grupo ChC (0,21) con respecto al grupo ChnoC y a los valores estándares para nuestro país (0,15). Esta es la primera descripción de alteración del índice placentario en la transmisión congénita del Chagas. Las alteraciones macroscópicas placentarias no difieren de las ya descritas previamente mientras que el análisis microscópico puso de manifiesto alteraciones estructurales en aquellas placentas pertenecientes a RN con transmisión vertical de la enfermedad, en donde se observan zonas de desprendimiento del sincitiotrofoblasto y agrupamientos del citotrofoblasto como datos no descritos en la bibliografía. La detección inmunohistoquímica de la NOS tipo III presentó marca en sincitiotrofoblasto y vasos fetales con disminución importante de intensidad en todas las placentas chagásicas analizadas con respecto a las placentas normales, siendo la disminución severa en las placentas del grupo ChC. A nivel de decidua esta isoforma aumentó su marca en las placentas del grupo ChnoC. La NOS tipo II presentó muy escasa o nula marca en las vellosidades de placentas normales y ChC a diferencia del ligero aumento en el grupo ChnoC. A nivel de decidua no hubo diferencias entre las placentas de los 3 grupos. Las diferencias en la expresión de la NOS no tuvo diferencias según la procedencia de las madres, ni el sexo y peso del RN, ni a las alteraciones microscópicas de las placentas. Se concluye que la procedencia de área endémica o no endémica de las madres como así también la edad y las alteraciones histológicas placentarias, no modifican la expresión de la NOS ni la transmisión vertical del parásito causal del Chagas, por lo que no se las puede considerar como factores de riesgo para la enfermedad congénita. La expresión de la NOS se modificó según hubo o no transmisión vertical y su análisis da una relación entre intensidad de marca y la infección fetal. Este es el primer trabajo que analiza en placenta la enzima productora del principal agente deletéreo contra el *T. cruzi* en la transmisión congénita y relaciona esos hallazgos con parámetros clínicos–epidemiológicos que determinan la severidad o no del proceso desde el punto de visto clínico.

SUMMARY

The congenital Chagas disease is a disease caused by *Trypanosoma cruzi* transmission from infected mother to her child during pregnancy and perinatal stage. The incidence is low. Have been described in this process placental factors, maternal and / or parasites. The human placenta is regulated by the activity of humoral factors including nitric oxide is formed by the enzyme nitric oxide synthase. The predominant isoform level fetal trophoblast and endothelial or type III is the endothelial isoform and the other is described type II or inducible. Nitric oxide is the main agent parasiticide and damaging to the *T. cruzi*.

As an overall objective to identify factors arose from human placenta and clinical and epidemiological aspects that could affect the structure of the causative agent of Chagas' disease and their ability to cause congenital infection in pregnant women with Chagas' disease

In our studies in vitro to 72 hours of co-cultivation of explants from normal placentas with *T. cruzi*, 98% of parasite cells were not viable, with a significant difference to the data obtained in control cells susceptible to infection by this parasite (Vero cells) ($p < 0.05$). Relationship was observed between increased levels of nitrite in the culture media with increased mortality of *T. cruzi* between 3 hours and 72 hours of cultivation. The presence of *T. cruzi* within the placental tissue accounted for 15.76 ± 3.26 UM2 ($p < 0.05$) and number of amastigotes of *T. cruzi* nest of 4.5 ± 2 , unlike Vero cells (55 ± 22 amastigotes per nest). These data indicate that the chorionic villi of the placenta does not allow a productive infection of *T. cruzi*.

Ex vivo studies were conducted with a group of pregnant women who transmitted Chagas' disease (HCC) ($n = 9$) and not forwarded (ChnoC) ($n = 63$) infection to the child. Since both groups received 13 placentas. The analysis of the origin of pregnant women who transmitted the disease to their children shows that 50% came from endemic areas and 50% of non-endemic areas. Our sample indicates that newborns (RN) female congenital infection presented significantly higher than male newborns, as well as there were differences in the weight of the newborn, with an average of 2794 grams and 3375 grams for newborns with vertical infection and without congenital infection ($p < 0.05$). The weight of the placentas

in the CHC group presented a wide dispersion (604 ± 180 gr) unlike ChnoC groups (510 ± 100 gr) and normal (540 ± 55 gr). Determination of Placental index (weight RN and weight of your placenta) gave highest values in the CHC group (0.21) as compared to group ChnoC standards and values for our country (0.15). This is the first description of impaired placental index in congenital transmission of Chagas. Macroscopic placental abnormalities do not differ from those already described previously while microscopic analysis revealed structural abnormalities in those placentas belonging to RN with vertical transmission of the disease, where there are areas of detachment of clusters of cytotrophoblast and syncytiotrophoblast as data described in the literature. The immunohistochemical detection of type III NOS made mark in syncytiotrophoblast and fetal vessels with significant decrease in intensity in all chagasic placentas analyzed for normal placentas, with severe decrease in the placentas of the CHC group. At the level of this isoform decidua increased its brand in placentas ChnoC group. The NOS type II presented little or no mark on the villi of normal placentas and CHC unlike the slight increase in group ChnoC. A level of decidua there were no differences between the placentas of the 3 groups. The differences in the expression of NOS had no differences according to whether mothers, and sex and weight of the newborn, or the microscopic changes of placentas. We conclude that the origin from endemic or not endemic to the mothers as well as age and placental histological changes do not modify the expression of NOS or vertical transmission of Chagas the parasite, so that they can be considered as risk factors for congenital disease. The expression of NOS was modified by vertical transmission has occurred or not and their analysis gives a relationship between brand strength and fetal infection. This is the first work that analyzes the enzyme in placenta leading producer of deleterious agent against *T. cruzi* congenital transmission and related these findings with clinical-epidemiological parameters that determine the severity or otherwise of the process from a clinical standpoint.

ABREVIATURAS

AINES: Antiinflamatorios no esteroideos

APGAR: puede usarse como acrónimo o regla mnemotécnica recordando los criterios evaluados: Apariencia, Pulso, Gesticulación, Actividad y Respiración

AVADS: Años de Vida Ajustados por Discapacidad

B-SA: Biotin-Streptavidin Amplified

CaM: Calmodulina

ChC: Chagas Congénito

ChnoC: Chagas no Congénito

cNOS: Isoforma Constitutiva de la Óxido Nítrico Sintasa

CTB: Citotrofoblasto

DAB: Diaminobenzidina (-biotina/ streptavidina/ peroxidasa)

E: Endotelio

EDRF: Factor Relajante del Endotelio

eNOS: Isoforma Endotelial o tipo II de la Óxido Nítrico Endotelial

FAD: Flavin Adenina Dinucleótido

FMN: Flavin Mononucleótido

Gc: Enzima Guanilciclase

GMPc: Guanosina 3' - 5' monofosfato cíclico

H/E: Ematoxilina eosina

H₂O₂: Peróxido de Hidrógeno

H.U.M.N: Hospital Universitario de Maternidad y Neonatología

IFN- γ : Interferón gamma

IFN-8:

iNOS: Isoforma Inducible o tipo II de la Óxido Nítrico Sintasa

IP: Índice Placentario

IgG: Inmunoglobulina G

LNAME: N-nitro-L-arginina metiléster

LNMA: N-mono-metil-L-arginina

LPS: Lipopolisacárido Bacteriano

NADPH: Nicotinamida Adenina Dinucleotidofosfato

NADP⁺: Nicotinamida Adenina Dinucleotidofosfato Reducido

NO₂⁻: Nitrito

NO₃⁻: Nitrato

NOS: Óxido Nítrico Sintasa

nNOS: Isoforma Neural o tipo I de la Óxido Nítrico Sintasa

O₂: Oxígeno

O₂⁻: Aniones Superóxido

OMS: Organización Mundial de la Salud

ONCO⁻: Peroxinitritos

ON: Óxido Nítrico

OPS: Organización Panamericana de la Salud

PBS:

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa

PM: Peso Molecular

RN: Recién Nacido

RPMI:

S: Sincitiotroblasto

SBF: Suero Bovino Fetal

SIDA: Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida

STB: Sincitiotroblasto

TBH: Tetrahidrobloptenina

TNF- α : Factor de Necrosis Tumoral alfa

WHO: World Health Organization- Organización Mundial de la Salud

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

PLACENTA

CONSIDERACIONES GENERALES

El término “placenta” se cree que fue introducido por Realdus Columbus en 1559 y es una palabra latina que significa pastel circular.

Históricamente, sin embargo, como señalaron Boyd y Hamilton (1970) los conocimientos humanos sobre “aquello que sale después del parto” se remontan a los comienzos de la historia. En el Viejo Testamento, la placenta se consideraba como el Alma Externa y a veces se describía como ligada al “haz de vida” que probablemente incluía el cordón umbilical. Se cree que Aristóteles fue el primero (384-322°C) en utilizar la palabra corion. No obstante no fue hasta comienzos del siglo XVI, momento del renacimiento de la anatomía, cuando se formularon las primeras opiniones sobre la función placentaria.(1)

Según Benirschke (1981) “la placenta es el archivo más preciso de las experiencias prenatales del feto”.(2) El interés del científico por la placenta deriva no sólo de la enorme diversidad de su forma y función sino también de sus peculiares propiedades metabólicas, endócrinas e inmunológicas. Benirschke continúa diciendo: “los médicos generalmente se sienten molestos al examinar la placenta. Sin embargo se trata de una tarea que deberían realizar con gusto...ya que si se somete este órgano a un análisis y palpación adecuados se puede profundizar en la vida prenatal. Sus resultados suelen ser muy útiles para el cuidado del neonato; estos datos representan un archivo que los pediatras y obstetras pueden utilizar para el cuidado futuro de la madre y del niño y, lo que es más importante, mucha de la información que se puede obtener, no se puede registrar en la historia prenatal materna si se ignoran los datos suministrados por este órgano“. (3)

ASPECTOS MACROSCÓPICOS

La placenta humana (figura 1) es un órgano transitorio que permite el desarrollo del feto. La placentación humana clásica es hemocoriónica. Al término de la gestación es un órgano discoide, mide aproximadamente 15 a 20 cm de diámetro y 2 a 3 cm de grosor. Pesa entre 500-600 gr y está generalmente localizada en el útero por delante o por detrás cerca del fondo.

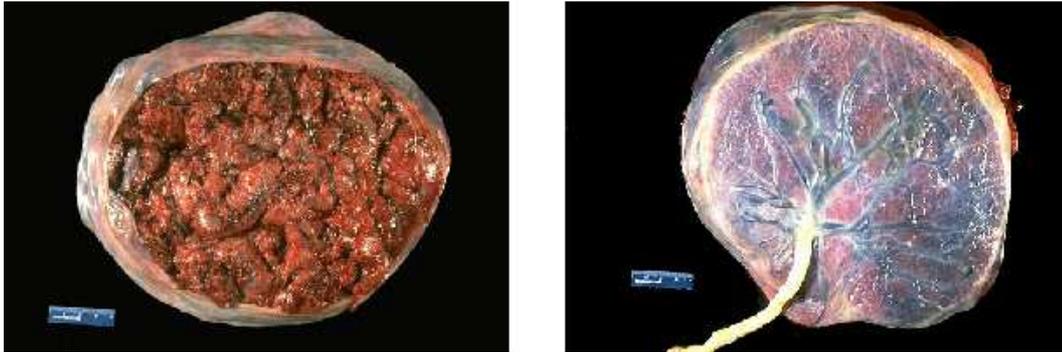


Figura 1: Placenta humana, cara materna y fetal.

La superficie materna de la placenta está dividida en lóbulos irregulares por surcos producidos por tabiques, que se componen de tejido fibroso. Se observan los cotiledones, en un número de 15 a 20, constituidos por decidua basal, que representa el endometrio modificado (porción materna de la placenta) y el epitelio coriónico o trofoblástico que da origen a múltiples vellosidades coriónicas, que flotan en el espacio intervelloso ocupado por sangre materna y cuya superficie varía entre 4 y 14 m. La cara fetal (figura 1, se halla cubierta por amnios transparente debajo del cual cursan los vasos coriónicos. En esta cara se inserta el cordón umbilical y por ella discurren los grandes vasos sanguíneos fetales antes de penetrar en las vellosidades.

En el esquema de placenta de la figura 2, se aprecia la relación entre los componentes fetales, maternos de este órgano y la circulación sanguínea.

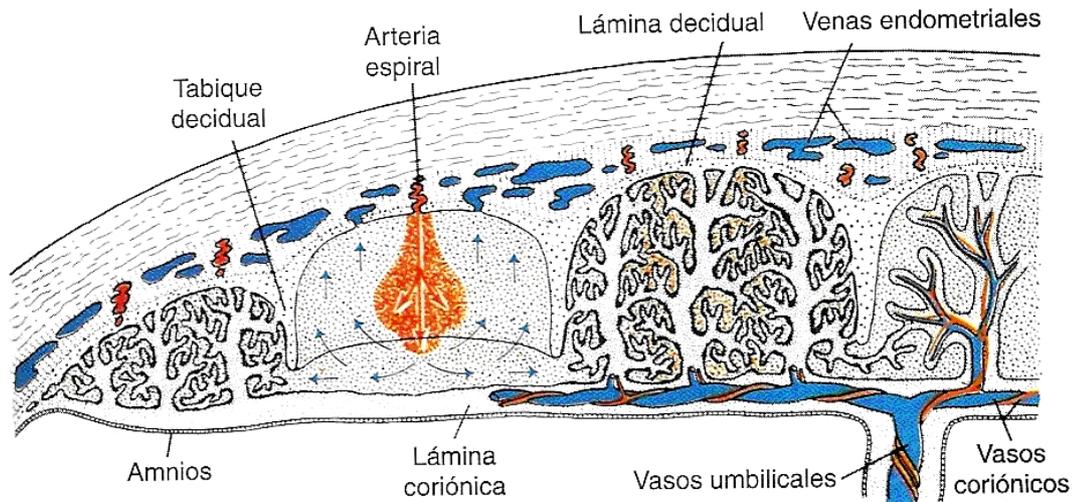


Figura 2: Esquema de la placenta humana de término.

Sabemos que el peso y la talla de los recién nacidos son buenos indicadores del desarrollo intrauterino. El feto depende de la placenta para su nutrición y crecimiento in útero. El crecimiento intrauterino del feto depende de los factores que actúan sobre las madres.

El trofoblasto del blastocisto se diferencia en todos los tipos celulares encontrados en la placenta y es crítico en el éxito del embarazo ya que participa de la implantación, producción de hormonas durante el embarazo, protección inmune del feto e incrementa el flujo de sangre vascular materno en la placenta. La fisiología placentaria es muy compleja, la placenta tiene funciones de pasaje de gases y de sustancias nutritivas, excretorias, pasaje de anticuerpos, de síntesis de glucógeno, de hormonas, citoquinas y otros factores. (4)

El índice placentario (IP) resulta de la relación entre el peso de la placenta sobre el peso del RN, es un coeficiente que se ha empleado como un elemento más de pronóstico en el examen perinatal (VN: 0,15). Referido a su verdadera importancia pronóstica y a las relaciones encontradas a partir del índice placentario, este señala la correlación entre el desarrollo placentario y

el fetal. Se encuentra aumentado en pre-eclampsia, incompatibilidad Rh, sífilis, toxoplasmosis, citomegalovirus. (5)

ASPECTOS MICROSCÓPICOS

Las vellosidades coriónicas están limitadas por una capa sincitial multinucleada llamada sincitiotrofoblasto (STB), en la porción basal del mismo se localiza el citotrofoblasto (CTB) y los vasos sanguíneos fetales. El estroma completa la estructura de la vellosidad. (figura 3) (6)

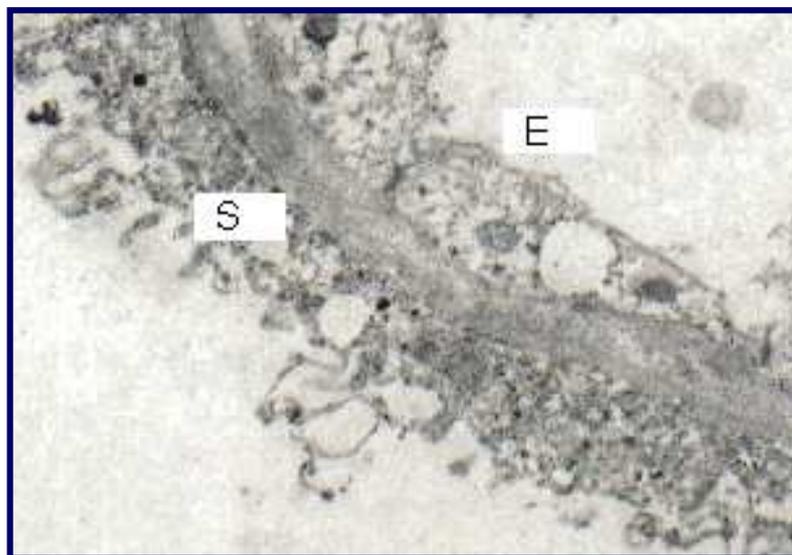


Figura 3: Foto de microscopía electrónica de una vellosidad placentaria, de placenta humana normal a término. La barrera placentaria está formada por el sincitiotrofoblasto (S), mesénquima fetal, membrana basal y endotelio (E) del capilar sanguíneo. 10.000X

El CTB está constituido por células de núcleos relativamente grandes, vesiculosos, y citoplasma claro, de límites netos; presenta actividad mitótica. El STB es la capa periférica que recubre las vellosidades; puede describirse como una masa protoplasmática más gruesa. Está formado por una masa multinucleada, con núcleos pequeños, densos, citoplasma granular, denso y, con algunas vacuolas lipídicas. No presenta mitosis. (7). Al ir avanzando el embarazo disminuye el CTB, como capa continua, aunque persiste hasta el final de la gestación. El estroma de las vellosidades maduras contie-

ne abundantes vasos, vecinos al trofoblasto, donde forma la barrera de intercambio con la sangre materna, y además, contiene histiocitos (células de Hofbauer). (8) La primera barrera placentaria que el *T. cruzi* debe atravesar es el STB de la placenta humana, la capa epitelial del árbol vellositario que separa la sangre de los vasos fetales de la sangre materna. (9) El trofoblasto presenta un proceso de renovación durante todo el embarazo en las vellosidades coriales. El CTB prolifera y se divide de manera aritmética, con lo cual una célula retiene las características progenitoras y la otra célula hija escapa del ciclo celular, comienza a diferenciarse y finalmente se fusiona con el STB. Este forma “nudos sinciciales”, agrupamientos de núcleos con escaso citoplasma que se liberan a la sangre materna.

La placenta produce constitutivamente compuestos citotóxicos y parasiticidas como el TNF- α , multifuncional (10, 11) regulador de la síntesis hormonal y de la arquitectura placentar; el óxido nítrico (ON) que es una pequeña molécula capaz de difundir a través de membranas y ha sido descrita como un mensajero intracelular con funciones biológicas diversas incluyendo vasodilatación (12) neurotransmisión (13) y modulación de adhesión plaquetaria (14) entre otros compuestos.

CONSIDERACIONES PATOLÓGICAS

Las lesiones más frecuentes de la placenta, aunque su origen sea diverso, se denominan colectivamente infartos placentarios. Las características histopatológicas principales comprenden la degeneración fibrinoide del trofoblasto, calcificación e infarto isquémico por oclusión de las arterias espirales. Las alteraciones en el eje conjuntivo y en el sincitio de la vellosidad son secundarias a la hipoxia determinada por la obliteración vascular. (15) y también pueden observarse pequeños nódulos o placas calcáreas sobre la su-

perficie materna de la placenta, estas aumentan a medida que avanza la gestación y ya al término del embarazo, la placenta presenta manifestaciones morfológicas de envejecimiento: hialinización del estroma veloso y nudos sincitiales. (16) El espacio intervilloso se hace fisiológicamente más angosto, esto compromete la oxigenación y la nutrición fetal. La disminución del flujo sanguíneo materno se asocia así, a una disminución del flujo sanguíneo en el compartimiento fetal siendo probablemente esta doble causa origen de la alteración de la placenta como barrera. (15) Las lesiones degenerativas de la placenta tienen en común dos factores etiológicos:

- a- Cambios asociados con el envejecimiento del trofoblasto.
- b- Deterioro de la circulación útero-placentaria.

OXIDO NITRICO Y SU ENZIMA PRODUCTORA

CONSIDERACIONES GENERALES

Hacia 1977, el farmacólogo Ferid Murad (Nobel de Medicina 1998) descubrió que el óxido nítrico actuaba como relajante de las células musculares lisas. Otros farmacólogos, Furchgott y Zawadzki, también galardonados con el Nobel, (1980) demostraron la necesaria presencia del endotelio vascular para producir relajación inducida por la acetilcolina, y concluyeron que ésta la producía una sustancia difusible liberada por el endotelio, que se denominó Endothelium Derived Relaxing Factor (EDRF). Ya en 1979 se había demostrado que la relación existente entre los niveles de guanosina 3' - 5' monofosfato cíclico (GMPc) en el músculo liso vascular y su relajación estaba asociada a modificaciones del contenido intracelular de este mediador. (17, 18). Un tercer farmacólogo molecular, el tercer Nobel de Medicina, Louis J. Ignarro demostró, en 1986, que el EDRF se trataba del óxido nítrico. Palmer y col. (19) identificaron el EDRF como óxido nítrico ON, el cual mediaba indirectamente la acción vasorrelajante de la acetilcolina. A partir de estos trabajos y en los últimos años se han señalado nuevas funciones del ON en procesos fisiológicos y fisiopatológicos del organismo y las consecuencias para la salud. (20, 21) Quedaba demostrado, por primera vez, que un gas podía funcionar como una importante señal química en el organismo.

OXIDO NÍTRICO, OXIDO NÍTRICO SINTASAS: VÍA METABÓLICA

El óxido nítrico es una molécula gaseosa muy interesante. Se forma en la combustión del nitrógeno. Es un gas simple que se libera por la conversión del aminoácido L-arginina en L-citrulina. (22, 23). Su gran reactividad le hace convertirse en nitrito o nitrato en unos diez segundos. La molécula está compuesta por 2 átomos, uno de nitrógeno y el otro de oxígeno, lo que deter-

mina un número total de 15 electrones. (24) Este número impar de electrones le da su carácter de radical libre con una vida media en medios biológicos, de entre 1 a 60s. (25) El ON es una molécula apolar que se particiona bien en medios hidrofóbicos, lo que le permite concentrarse y difundir a través de membranas biológicas. (26) Desde el punto de vista redox, es un débil agente oxidante y algo mejor reductor. El ON es sintetizado enzimáticamente por intermedio de una familia de enzimas denominadas colectivamente Oxido Nitrico Sintetasa (NOS), ampliamente distribuidas en tejidos de mamíferos. (27) Existen diferentes variedades de NOS, pero todas comparten las características siguientes:

1. Presentarse en forma de dímero, con PM de 130 y 150 kDa
2. Poseen en su sitio activo flavina y hemo.
3. Poseen un sitio de unión para el complejo Ca-calmodulina.
4. Requieren la presencia de tetrahydrobiopterina como cofactor

Las NOS catalizan la reacción siguiente:



Para la síntesis de ON, además de la L-arginina como sustrato (22, 28) se requiere de la presencia de calmodulina (CaM) (29, 30) y de 4 cofactores: flavin mononucleótido (FMN), flavin adenina dinucleótido (FAD), tetrahydrobiopterina (TBH) y de nicotinamida adenina dinucleotidofosfato (NADPH). (31, 32, 33) Esta reacción es catalizada por la enzima óxido nítrico sintetasa (NOS) y se obtienen como productos finales ON y citrulina (22, 34) y puede ser inhibida por derivados estructurales de dicho aminoácido: la N-mono-metil-L-arginina (LNMA) (35), la N-nitro-L-arginina metiléster (LNAME) (36) y otros. En estas condiciones, la NOS produce una mezcla de aniones

superóxido (O_2^-) y óxido nítrico que reacciona con peroxinitritos ($ONCO^-$) y como resultado final tiene lugar la citotoxicidad. En ausencia de tetrahidrobiopterina (TBH) la NOS genera peróxido de hidrógeno (H_2O_2), superóxido y óxido nítrico (ON). Los productos finales del ON "in vivo" son: nitrito (NO_2^-) y nitrato (NO_3^-). El mejor índice de óxido nítrico total es la suma de ambos productos, debido a que la proporción relativa de cada uno de ellos dentro de una misma muestra resulta variable. La relación de nitrito/nitrato puede ser medida a través de sistemas colorimétricos. (37, 38) El óxido nítrico, una vez formado, puede difundir hacia las células adyacentes, (17, 39) donde activa a la enzima guanidilciclase (Gc) y ésta provoca el aumento intracelular de GMPc. La síntesis de óxido nítrico puede ser regulada por glucocorticoides y agentes antiinflamatorios no esteroideos (AINES) que reducen la producción de este gas, así como por los propios niveles de ON a través de mecanismos de retroalimentación negativa. Se han identificado más de una isoforma de NOS, (tabla 1) (40, 41, 42) constituidos por subunidades homodiméricas con pesos moleculares entre 125 y 155 KDa:

1. Dos isoformas constitutivas calcio-dependientes (cNOS): la endotelial (eNOS) o tipo III y la neural (nNOS) o tipo I (43) presentes en diferentes tejidos (células endoteliales, neuronas, neuroglia y otros) que producen concentraciones fisiológicas de ON al actuar como señal molecular.
2. Una forma calcio-independiente (iNOS) o tipo II, inducible en un número de tipos celulares como macrófagos (44). hepatocitos, neutrófilos (45, 46) eosinófilos, (47) músculo liso, células epiteliales (48, 49) en respuesta a diferentes estímulos inmunológicos tales como: interferón gamma ($IFN-\gamma$), factor de necrosis tumoral alfa ($TNF-\alpha$) y lipopolisacárido bacteriano (LPS), los cuales generan gran cantidad de ON que puede ser tóxico en células tumorales o

infectadas por virus.

Las tres isoformas se caracterizan por presentar tres dominios diferentes para llevar a cabo su actividad catalítica:

1. Dominio reductasa: contiene cofactores como FAD y FMN
2. Dominio oxigenasa: es donde se produce la conversión de la L-arginina en citrulina y ON, además de contener sitios de unión para cofactores tipo heme, tetrahidrobiopterina y arginina.
3. Dominio de unión de la Calmodulina: regula la actividad enzimática en función de las concentraciones de calcio intracelular

Tabla 1: Clasificación y características de la NOS.

ÓXIDO NÍTRICO SINTASAS: ISOFORMAS			
Tipos	Neuronal	Inducible	Endotelial
Subtipos	Tipo I	Tipo II	Tipo III
Peso Molecular	160KDa	130KDa	130KDa
Expresión	Constitutiva Ca/calmodulina		Constitutiva Ca/calmodulina
Localización	Sarcolema	Citosol	Mitocondria, Membrana , Citosol
Inducción	Ejercicio	Citoquinas	Ejercicio
Funciones	Medidor de las funciones contráctiles	Inmunoprotección	Regulación del flujo sanguíneo

La inducción de iNOS está disparada también por un mecanismo de feedback durante los períodos de deficiencia de ON (en condiciones experimentales el análogo de la arginina N6-nitro-L-arginina metil éster [L-NAME] inhibió la síntesis de ON por inhibición competitiva de NOS. La inhibición crónica de NOS con L-NAME disparó la inducción compensatoria de la expresión de los genes iNOS y los promotores de activación de IFN-8 y lipopolisacáridos. La actividad NOS también es inhibida por el ON en exceso,

probablemente por un efecto de feedback del ON en la NOS regulado genómicamente. (50, 51, 52)

OXIDO NÍTRICO: EFECTOS GENERALES Y PLACENTARIOS

El .ON desempeña un papel dual en biología humana. Por un lado, cumple funciones que se puede llamar en el nivel fisiológico un homeostático importante para la función normal de órganos y tejidos. Por otra parte están los niveles suprafisiológicos o tóxicos, vinculados a la aparición de patología.

EFECTOS PLACENTARIOS

La placenta humana, al igual que en cualquier órgano vascular, está regulada por la actividad del ON jugando un papel fundamental tanto en etapas iniciales como tardías cuando la gestación llega a su término. La invasión trofoblástica a nivel endometrial origina cambios morfológicos en la circulación placentaria que determinan que el lecho vascular uteroplacentario muestre una baja resistencia. Con estos cambios se transforman las arterias musculares terminales en sinusoides esponjosos amplios, pasando de ser un sistema de alta presión a otro de baja presión y flujo elevado. (53) Una de las sustancias fundamentales que se sintetiza y reacciona a nivel trofoblástico es el ON, esta molécula actúa, manteniendo un tono basal bajo en la circulación fetoplacentaria y atenuando la acción a este nivel de sustancias vasoconstrictoras endógenas. La isoforma de la NOS que predomina a nivel del trofoblasto es la tipo 3 ó endotelial. Estudios realizados por Winfried y col. (49) muestran cómo la expresión de la eNOS placentaria varía en localización como en intensidad a lo largo de las gestaciones normales interpretándose esto como mecanismo de adaptación a los requerimientos fetales. El hiperestrinismo propio del embarazo, explica el reclutamiento sistémico de la sintasa de óxido nítrico endotelial (eNOS). Esta hiperactividad del eNOS du-

rante el embarazo puede explicar los siguientes mecanismos de la fisiología obstétrica:

- a- la refractariedad de los vasoconstrictores circulantes.
- b- la hiperfiltración glomerular.
- c- el remodelamiento especial del circuito vascular fetoplacentario.
- d- La hemorreología circulatoria vascular.

En cambio la iNOS se expresa fundamentalmente a nivel uterino, sin variar sus concentraciones a lo largo de la gestación normal. (54) A nivel hipotalámico el ON estimula la secreción de GnRH., hecho fundamental para el mantenimiento y progresión de la gestación. (49). La expresión de ON en el endotelio vascular de la vellosidad corial está determinada por la expresión de la eNOS a este nivel, a su vez condicionada genéticamente. (49, 51, 52). La iNOS en gestaciones normales actúa como señal del sistema inmune modulando y/o ejerciendo un efecto citostático/citotóxico. La placenta es considerada como un órgano inmune aunque su función principal es la de actuar como “barrera protectora del feto” ante situaciones de infección o alteraciones inmunes, siendo el STB el que ejerce esta función. La iNOS puede activarse como parte de este complejo mecanismo. (51, 55) Esta enzima puede ser expresada en respuesta a diversas señales que actúan sinérgicamente, incluyendo citoquinas y productos microbianos. También se ha comprobado, que además de su acción bactericida el NO puede inhibir la replicación viral (56) o bien se produce inducción de la actividad de la enzima por *Trypanosoma cruzi* en macrófagos humanos. (57) En relación con la farmacología del ON, es importante considerar que existe un delicado balance tisular entre la producción, respuesta tisular, y consumo de ON, y que la farmacología puede lograr aumentar o disminuir sus niveles, según se esté en una situación de déficit o exceso. El objetivo final debe ser retornar el nivel de ON a sus valores homeostáticos, que funcionan en un rango relativamente estrecho de concen-

traciones (10 nM – 1 mM). (58, 59) o bien facilitar una mayor expresión de algunas de sus isoformas enzimáticas a fin de lograr los objetivos terapéuticos propuestos.

ENFERMEDAD DE CHAGAS

CONSIDERACIONES GENERALES Y EPIDEMIOLOGÍA

La enfermedad de Chagas es un modelo paradigmático de patología, con identidad y características propias, como el SIDA y con alcances sociales aún mayores, que no son patrimonio de una especialidad y por lo tanto debe ser rescatada de su parcialización. Según las estimaciones más recientes, en todo el mundo hay unos 8 millones de personas infectadas por el parásito y en 2008 se registraron 11.000 defunciones. (60) El paciente, el médico y la sociedad pueden ignorar la enfermedad debido a que transcurre muda, en muchos casos hasta su propio período agudo, por lo que es una enfermedad en la que “debe pensarse”. La Tripanosomiasis americana fue descubierta en Brasil, en el año de 1909, por el Dr. Carlos Chagas. El parásito causante, *Trypanosoma cruzi*, se transmite principalmente por vectores (más del 80% de los casos), pero existen otras vías como la transfusión sanguínea, transmisión congénita y trasplante de órganos. (61) Aunque la enfermedad de Chagas es relativamente desconocida, por su impacto socioeconómico (62) en América Latina, ocupa el cuarto lugar después de las infecciones respiratorias, enfermedades diarreicas y SIDA. (63) Son numerosos los factores involucrados, a los cuales se suman aquellos de poder político y económico, por los cuales esta enfermedad pasa a constituirse no sólo en una tradicional enfermedad de la pobreza, sino en un ejemplo de los mecanismos de ocultamiento y exclusión como forma de discriminación social y laboral. (63) El conocimiento de la magnitud de la infección chagásica y su repercusión sobre la salud y la economía de los países latinoamericanos es variable de un país a otro (64). En esa situación influye la deficiente investigación clínica, la falta de recursos para el diagnóstico, la ausencia de estudios anatomopatológicos, sobre todo las muertes súbitas que ocurren en el área rural, etc.

El área endémica coincide con las que registran presencia del vector, tradicionalmente concentraciones rurales y se extiende desde el paralelo 43° de latitud norte (sur de California) hasta el paralelo de 49° latitud sur (región central de la Argentina). Las migraciones internas y externas cambiaron el mapa de distribución de la enfermedad con su urbanización y su dispersión. Estos desplazamientos tienen consecuencias profundas en la salud pública al trasladar desde zonas rurales a las grandes urbes dos formas de transmisión aguda: la transfusional y la congénita. (65) El éxito en el control vectorial en Sudamérica redujo el número de personas infectadas de 16-18 millones (66) a 8 millones (60). Existe una necesidad perentoria de que la enfermedad de Chagas se transforme de una ocupación preponderantemente sanitaria en una preocupación cotidiana privilegiada de la atención médica. Sólo así generaremos una conducta vigilante, consistente y genuina en el control de la epidemia. En la cadena de acciones es necesario el compromiso de todos.

CICLO BIOLÓGICO DEL PARÁSITO

El *Trypanosoma cruzi* es un organismo digenético con un ciclo biológico complejo con alternancia entre un hospedero vertebrado y un insecto vector. Posee estadios estructural y funcionalmente diferentes, con determinantes antigénicos específicos. (67)

Desde el punto de vista epidemiológico, casi desde el descubrimiento de la enfermedad por parte del doctor Carlos Chagas se considera la existencia de tres ciclos clásicos, interrelacionados entre sí, ordenamiento que facilita la comprensión y el conocimiento del problema: el primero de ellos, denominado natural, original, silvestre o zoótico puro, está constituido por los mamíferos silvestres y peridomésticos casi doscientas especies en los que se desarrolla el *T. cruzi*. La infección es mantenida aquí, entre otros mecanismos, por la intervención de los Triatominos y aún por algunos Reduviidae

hematofágos no *Triatominae* es decir, distintos de las vinchucas recientemente descubiertos. El segundo ciclo, peridomiciliario o peridoméstico, está integrado, básicamente, por los mamíferos de cría y domésticos próximos al domicilio humano, además de algunas especies silvestres que ocasionalmente se aproximan y se radican en el peridomicilio. El tercer ciclo, o domiciliario, es aquel en el que el *T. cruzi* infecta al hombre. Está configurado por el hombre, como hospedador del parásito, y por las vinchucas, con el agregado de algunos mamíferos domésticos -perro, gato-, como reservorios. A estos tres ciclos tradicionalmente reconocidos se ha agregado recientemente un cuarto ciclo urbano en áreas sin triatominos, aunque debe aclararse que lo nuevo es el concepto, no así los factores que lo definen, pues el ciclo en sí, existe desde hace muchos años, si bien en la historia natural de la enfermedad es el último y el más reciente. Se localiza en áreas no tradicionalmente consideradas como endémicas, que carecen en absoluto de triatominos y donde la vivienda no tiene ninguna influencia. Está integrado exclusivamente por el parásito en el hombre y por el propio hombre como reservorio y transmisor en ausencia total de triatominos e independientemente de que pueda disfrutar de las mejores condiciones habitacionales posibles. (68, 69) En la transmisión madre-hijo, el *T. cruzi* se reproduce en la placenta y la atraviesa como tripomastigote, pudiendo producir la infección generalizada del embrión o feto. (70, 71)

El parásito pertenece al orden Kinetoplastida y la familia *Trypanosomatidae*. Es en una sección especial llamada Stercoraria porque es el único tripanosoma transmitido por las heces de sus vectores invertebrados, a diferencia de otros tripanosomas transmitida por la saliva (sección Salivaria). Tres formas evolutivas pueden ser identificadas durante el ciclo de vida del *T cruzi*.

- 1- El trypomastigote es flagelado. La forma infecciosa del parásito encontrado en la sangre del huésped de mamífero y en la parte

terminal del aparato digestivo y urinario de vectores (trypomastigote metacíclico). De aspecto fusiforme, de unos 20um de largo, con citoplasma granuloso y un núcleo central vesiculoso. (72) El trypomastigote no se divide, y su flagelo se origina a partir de la kinetosoma (basal del cuerpo) junto al kinetoplasto (una organela asociados con la única y gran mitocondria que contiene el ADN extranuclear). El flagelo se extiende desde el extremo anterior del cuerpo del parásito. La porción libre del flagelo se extiende más allá del cuerpo, le confiere una considerable movilidad.

2- El epimastigote es la forma replicativa del parásito en el insecto vector y en el medio de cultivo acelular. Su flagelo libre surge directamente del citoplasma en la parte anterior del núcleo y presenta una corta membrana ondulante.

3- El amastigote es la forma intracelular replicativa del parásito en el huésped. Es de forma esférica y posee un pequeño flagelo libre. (73) También denominado esferomastigote. (74)

ETAPAS CLÍNICAS DE LA ENFERMEDAD

El curso clínico de la enfermedad de Chagas incluye una etapa aguda y una crónica, separadas por un período de tiempo indeterminado durante el cual el paciente es relativamente asintomático.

ETAPA AGUDA

Los signos y síntomas que presentan estos pacientes en la etapa aguda, ya fueron mencionados por Carlos Chagas pero fue Salvador Mazza quien realizó una descripción más amplia y detallada de los mismos. En general es sintomática, su duración es de pocos meses. Le corresponde a este

período el 5% de los casos, de los cuales el 90% son niños. Su intensidad y duración son variables, con frecuencia presenta lesiones de localización tales como:

- Chagoma de inoculación: por lo general en la región periorbitaria, formando el complejo oftalmoganglionar o signo de Romaña-Mazza. (75)
- Compromiso visceral: fiebre, micropoliadenopatía, hepatoesplenomegalia, miocarditis y meningoencefalitis. La etapa aguda se caracteriza por una activa infección, inflamación y alteraciones miocárdicas. (76, 77, 78)

Al lado de estos cuadros, dramáticos y en algunos casos letales, una gran cantidad de chagásicos no presenta alteraciones, como si la enfermedad se hiciera crónica de entrada. Estos casos son conocidos como de puerta de entrada desconocida, y corresponden a la mayoría de los chagásicos estudiados. (61)

CHAGAS AGUDO CONGÉNITO O CONNATAL

Es el caso de la transmisión del *T. cruzi* de la madre chagásica a su hijo, conducente a la enfermedad congénita de Chagas, ya sea que la embarazada esté en período agudo o crónico de la enfermedad, durante la gestación.

ETAPA CRÓNICA

En la etapa crónica el paciente chagásico desarrolla, a lo largo de años de evolución, cardiomiopatías, presenta trastornos del ritmo, bloqueos, cardiomegalia e insuficiencia cardíaca congestiva asociadas a muerte súbita. También se comprueban con cierta frecuencia, en esta etapa de la enfer-

medad, alteraciones digestivas, fundamentalmente megavísceras, debidas a lesiones sobre todo del plexo de Auerbach. Pueden observarse, además, formas nerviosas y glandulares. Se discuten otras formas, entre ellas la encefalopática. (76)

FASE LATENTE

Podemos distinguir una fase latente de meses o años de evolución, en general asintomática. La infección puede mantenerse así toda la vida. Alrededor del 25% de los casos pueden desarrollar la forma crónica, manifiestan alteraciones subclínicas al ECG, EEG o a la radiología digestiva u otros exámenes. (79)

Lo cierto es que, desde el punto de vista de oportunidades terapéuticas es posible afirmar que:

El destino del chagásico se define en la etapa aguda de la infección.

CHAGAS CONGÉNITO

EPIDEMIOLOGÍA

La posibilidad de transmisión congénita fue demostrada por Dao en 1949 en un recién nacido mediante detección de *trypomastigotes* en sangre periférica nacido de una madre con infección de Chagas agudo. (80) Otros casos congénitos fueron descritos posteriormente en países del Continente Americano. (81) Los primeros casos en nuestro país fueron descritos por Jörg y Romaña en 1953. En Chile Howard (82), publica los primeros casos mientras que en Brasil, Rezende (83) y Bittencourt (84) lo hacen en 1959. Estas descripciones se basaban en pacientes que presentaban importantes manifestaciones clínicas, lo que permitió presumir que la enfermedad de Chagas congénita producía importante morbilidad. En la década del 70 Bittencourt y col. (85), demostraron el hallazgo del *T. cruzi* en la anatomía patológica de fetos y mortinatos. Al estudiar en forma prospectiva todos los hijos de madres con serología positiva, comprobaron que la mayor parte de los neonatos infectados eran asintomáticos. (85, 86, 87, 88, 89). En Argentina, el Ministerio de Salud de la Nación lanzó el Programa Federal de Chagas en diciembre 2006. En consonancia con el nuevo paradigma internacional, el Programa Federal apunta a dar mayor énfasis sobre la transmisión congénita y el manejo de los pacientes.

CHAGAS EN LA EMBARAZADA

El *Trypanosoma cruzi* alcanza al feto por vía hemática, luego de su pasaje a través de la placenta. La transmisión congénita puede ocurrir en cualquier fase de la enfermedad materna, aunque se considera más posible durante la segunda mitad del embarazo, esto ocurriría con mayor frecuencia entre las semanas 22 y 26 de la gestación por las características que presenta la

placenta. (85, 90) Moretti y col. (91) proponen que la transmisión ocurre en el primer trimestre del embarazo. La habilidad del parásito para atravesar la barrera placentaria depende, entre otros factores de la patogenicidad de la cepa del hemoflagelado y de la capacidad inmunológica de la placenta. (92). Una vez en las vellosidades, el trypomastigote se transforma en amastigote y permanece en las células de Hofbauer hasta que son liberados a la circulación fetal como trypomastigotes. (9) Bittencourt y col., (93) señalan que la prevalencia de la infección por *T. cruzi* en mujeres embarazadas en Sudamérica varía entre 2 y 51% en centros urbanos y de 23 a 81% en áreas endémicas para la enfermedad de Chagas. En nuestro país las tasas varían entre el 4% al 52% según la zona estudiada (94, 95). Las madres asintomáticas pueden transmitir la infección a sus hijos a través de la placenta en cualquiera de las fases clínicas de la enfermedad con una probabilidad del 2,5% al 6,7% para la Argentina (96) y del 0,5% al 4% en América. (94) El riesgo se incrementa, como lo señalan Azogue y col. (97) para aquellas gestantes múltiples y dentro de este grupo para las de mayor edad. (97) Hasta el presente se desconocen las causas por las cuales esta incidencia es tan baja, así como los diferentes factores que influyen para que una misma madre tenga algunos hijos infectados y otros no. (94) Hay evidencias de que la competencia inmunológica de la placenta sería crucial en este proceso de transmisión de la enfermedad. (90, 98, 99, 100) El trofoblasto es la primera barrera que el parásito debe atravesar (9) y en este pasaje, el STB es el principal asiento de lisosomas en la placenta humana, (101) así como también presenta numerosas enzimas cuyos productos son citotóxicos para el *T. cruzi*. (102, 103) También ha sido descrito que la subfracción lisosomal y su sobrenadante de placenta afectan la viabilidad del *T. cruzi*. (104) Se ha postulado a la fosfatasa alcalina placentaria como posible vía de ingreso del *T. cruzi* en las vellosidades coriales (104, 105, 106). Los factores mencionados van a estar presentes y el desarrollo de

la enfermedad depende de la interacción entre el huésped y el agente patógeno: de la patogenicidad de la cepa, de la capacidad fagocítica de la placenta, de la fase de la enfermedad que cursa la gestante (el riesgo va a ser mayor durante la etapa aguda, cuando la parasitemia se presenta más alta y persistente).

ALTERACIONES PLACENTARIAS

La placenta chagásica presenta un aspecto semejante al observado en la eritroblastosis o en la sífilis. Es voluminosa, edematosa, más pesada que lo normal con cotiledones grandes, y vellosidades aisladas. El estroma toma el aspecto de tejido conectivo laxo, con células de Hofbauer (estabilizadoras del contenido hídrico) voluminosas, redondeadas o poligonales, rosáceas y epiteloides. (107)

El parásito puede infectar al feto con o sin compromiso placentario, cuando existen lesiones placentarias pueden ser desde simples infiltrados linfocitarios con nidos de amastigotes hasta destrucción importante con grave destrucción celular. El *T. cruzi* invade y se multiplica en las células de Hoffbauer, los trypomastigotes liberados posteriormente pueden invadir al embrión o feto. Se ha comprobado una relación directa entre el compromiso inflamatorio de la placenta y la morbilidad fetal. Es llamativo el hallazgo de placentas parasitadas sin infección en el neonato. (108, 109, 110) Los estudios histológicos e inmunohistoquímicos (111), a partir de dichas placentas, indican que la placentitis chagásica no es sinónimo de infección fetal y que la placenta negativa microscópicamente para *T. cruzi*, no descarta la infección vertical. (112, 113). Se reportaron variaciones de la localización de algunos componentes de la membrana del STB por acción del parásito, uno de ellos es la disminución de las enzimas estudiadas y modificaciones ultraestructurales (114) también se registraron variaciones en el patrón proteico de las fraccio-

nes placentarias en contacto con el *T. cruzi*. La placenta chagásica es edematosa, de cotiledones grandes con un aumento de espesor respecto de las gestantes normales, pálidas y relativamente exangües, con peso aumentado así como con la relación feto-placentaria alterada. (107) Microscópicamente puede estar afectada toda o parte de la placenta. El compromiso vellositario puede ser total o parcial. Las vellosidades y los troncos vellositarios pueden estar aumentados, edematosos con proliferación de células de Hofbauer, (99) focos de necrosis y elemento de infiltración linfocitaria. (tabla 2)

Tabla 2: Caracterización de lesiones anatomopatológicas placentarias extraído de Sarasúa W y col. Rev. Méd Uruguay 1986; 2:149-154.

Hallazgos microscópicos en placentas chagásicas
Edema vellositario Proliferación de células de Hoffbauer Focos de necrosis con infiltración linfoplasmocitaria Necrosis del epitelio corial Poca vascularización Estroma con depósitos fibrinoides PAS + Reacción granulomatosa Vasculitis Focos de eritroblastosis Nidos de Leishmanias

Los amastigotes en las placentas pueden estar presentes dentro de los histiocitos, libres o formando pseudoquistes, dentro de los troncos vellositarios o en la placa corial. Este hallazgo lo cita la literatura para distintos estudios entre un 2 a un 4% de las placentas examinadas. (112, 115, 116) En la mayoría de las placentas se hallan elementos de calcificación, depósitos fibrinoides, etc. Estos hallazgos son significativos con un criterio anatomopatológico pero no patognomónicos del Chagas congénito.

CLÍNICA Y TRATAMIENTO

Las manifestaciones clínicas en los recién nacidos infectados varían ampliamente desde los pacientes asintomáticos, que son la gran mayoría (70%), (93, 94) hasta aquellos que presentan una importante signo-sintomatología y alta mortalidad (117). Los niños pueden presentar compromiso del estado general expresado por retardo de crecimiento intrauterino, cuadro de sepsis con alteraciones hematológicas y/o hepatoesplenomegalia, que es el signo clínico más frecuente. En casos aislados se presenta compromiso cardíaco y del sistema nervioso central. Se ha descrito el hallazgo de calcificaciones cerebrales, recién nacidos con microcefalia y signos de daño intrauterino temprano con abortos. (70) El estado general de los recién nacidos se evalúa mediante la puntuación de APGAR de acuerdo a cinco parámetros fisioanatómicos simples, que son: color de la piel, frecuencia cardíaca, reflejos, tono muscular y respiración. A cada parámetro se le asigna una puntuación entre 0 y 2, sumando las cinco puntuaciones se obtiene el resultado del test. Se realiza al minuto, a los cinco minutos y, en ocasiones, a los diez minutos de nacer. (118, 119)

Las drogas actualmente usadas para el tratamiento etiológico de la enfermedad de Chagas son el nitrofurano nifurtimox (Lampit®, Bayer®) y el nitroimidazol benznidazol [Rochagan®, Radanil®, Roche®]. El nifurtimox actúa por vía de la reducción del grupo nitro de la molécula a radicales nitroaniónicos, que a su vez reaccionan con el oxígeno molecular para generar metabolitos reducidos del mismo, altamente tóxicos (anión súperoxido, peróxido). Estudios por Docampo y col han demostrado que el *T. cruzi* es deficiente en algunos de los mecanismos de detoxificación de metabolitos de oxígeno, particularmente del peróxido de hidrógeno, y es por ende más susceptible al stress oxidativo que las células de vertebrados. El benznidazol parece actuar por una vía diferente, resultante de la reacción de sus derivados

nitroreducidos con macromoléculas como DNA, RNA, proteínas y posiblemente lípidos insaturados. (120) Ambas drogas son activas en la fase aguda resultando hasta un 80% de éxitos terapéuticos, (121) así como en la fase crónica temprana de la enfermedad con hasta 60% de negativización serológica y clínica (122, 123, 124) aunque hay reportes recientes que discrepan de esos resultados. (125, 126) Asimismo, estos compuestos presentan frecuentemente efectos colaterales deletéreos. (121) La mayor limitación de los tratamientos actualmente disponibles es su baja eficacia en la fase crónica de la enfermedad (> 80% de fracasos terapéuticos), que actualmente, es la presentación clínica más frecuente en Latino América. (121) El presente trabajo de tesis estudia la participación del óxido nítrico como principal agente deletéreo contra el *T. cruzi*, en cultivos de placentas normales con el parásito in vitro y de las isoformas endotelial e inducible de la enzima productora de este mediador en material ex vivo de placentas chagásicas con y sin transmisión congénita. Este es el primer trabajo que analiza la presencia de la NOS y sus isoformas en placenta humanas, en relación a gestantes chagásicas y a sus RN, con infección congénita o no, analizando la acción del ON como agente parasiticida. La aplicación terapéutica derivada de las investigaciones sobre la NOS y el ON están en fase de aplicación en cardiología (127), neurología (128), gastroenterología (129) y neumonología (130) En este sentido, los resultados derivados del presente trabajo de tesis, pueden profundizar el conocimiento sobre la prevención de la transmisión congénita de esta endemia nacional y latinoamericana.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

- Identificar factores de la placenta humana y aspectos clínico-epidemiológicos que pudieran afectar la estructura del agente causal de la enfermedad de Chagas y su capacidad de producir la infección congénita en embarazadas chagásicas.

OBJETIVOS ESPECIFICOS:

- a) Establecer el rol del óxido nítrico placentario in vitro en el proceso de interacción de la célula parasitaria con las vellosidades coriales de placentas normales.
- b) Describir los aspectos macroscópicos y microscópicos de placentas de embarazadas chagásicas con y sin transmisión vertical de la enfermedad de Chagas, de material ex vivo y datos de historias clínicas.
- c) Especificar la localización e intensidad de las isoformas endotelial e inducible de la enzima Oxido Nítrico Sintasa en placentas de embarazadas chagásicas con y sin transmisión vertical.
- d) Analizar aspectos clínico-epidemiológicos de embarazadas chagásicas, con y sin transmisión congénita, de la ciudad de Córdoba mediante análisis retrospectivo de historia clínicas.
- e) Relacionar la expresión proteica de la enzima Oxido Nítrico Sintasa con los aspectos estructurales placentarios y clínico-epidemiológicos de las madres chagásicas y sus recién nacidos.

CAPÍTULO 2: MATERIAL Y MÉTODOS

El estudio se diseñó en dos etapas. En la primera de ellas se efectuaron estudios in vitro, utilizando para ello placentas normales provenientes del Servicio de gineco-obstetricia del Hospital Privado de la provincia de Córdoba. Se consideraron normales aquellas provenientes de embarazadas con serología negativa para enfermedades infecto-contagiosas, obtenidas por cesárea entre las 38-42 semanas de gestación, y sin antecedentes clínicos de patologías del embarazo.

La segunda etapa fue realizada a partir de placentas de archivo obtenidas de los servicio de anatomía patológica de los hospitales correspondientes al subsector público de nuestra provincia. Las mismas fueron enviadas para su estudio a partir de la confirmación diagnóstica de Enfermedad de Chagas materna y previo a la evaluación realizada en los neonatos correspondientes.

A: ESTUDIOS “IN VITRO”

OBTENCIÓN DE PLACENTAS

Se utilizaron 7 placentas a término (38-42 semanas) obtenidas mediante cesárea programadas debidas a cesáreas previas. Estos embarazos eran clínicamente compatibles con normalidad y presentaban serología negativa para enfermedades infecciosas. Inmediatamente después del procedimiento quirúrgico se colocaron en sucrosa 0,29 M fría y hielo para su traslado. Todo el procedimiento se llevó a cabo bajo condiciones de esterilidad.

OBTENCIÓN DE PARÁSITOS

Trypomastigotes de la cepa Tulahuen de *Trypanosoma cruzi* se obtuvieron de ratones Albino Swiss infectados y sangrados en pico de parasitemia. Se aislaron de acuerdo a la técnica modificada de Fretes, Fabro, (105) me-

diente centrifugación de sangre heparinizada a 500 rpm 5 minutos para separar el plasma de la fracción roja. El plasma se centrifugó a 1500 rpm 5 minutos obteniendo el pellet A de parásitos. La fracción roja se resuspendió en medio mínimo esencial de Eagle (MEM) para cultivos celulares (Gibco lab. NY. USA) pH 7,35 y centrifugó a 500 rpm 5 minutos estacionándolo luego durante 1 hora a 37°C, para lograr que los parásitos vivos ascendieran hacia la superficie. Por último se centrifugó el medio sobrenadante (que contiene los parásitos) a 1500 rpm por 15 minutos y se obtuvo el pellet B, que se une con el pellet A. Se determinó el número de parásitos obtenidos por mililitro de sangre de ratón en cámara de Neubauer haciendo una dilución de 1:20 (en medio de cultivo o solución fisiológica). Se obtuvo el promedio de parásitos contando en los 4 cuadrantes de la cámara, se dividió por 0,1 (capacidad de la cámara), se multiplicó por 20 (la dilución realizada) y por 10.000. (para obtener el número de parásitos por mililitro). Se realizaron las diluciones necesarias para obtener 1×10^6 parásitos para los co-cultivos. Los datos obtenidos de recuento representaron la media de tres recuentos realizados.

CO-CULTIVOS DE TEJIDO PLACENTARIO HUMANO Y CÉLULAS VERO CON TRYPOMASTIGOTES DE T. CRUZI

Se utilizaron 7 placentas humanas normales a término, obtenidas por cesárea. Una vez en el laboratorio de cultivo, las placentas se procesaron dentro de la hora posterior al alumbramiento. De la cara materna de la placenta se removieron varios cotiledones los que se limpiaron de membranas y decidua obteniéndose vellosidades coriónicas de la zona central de los cotiledones. Estas fueron lavadas sucesivamente en solución fisiológica hasta quedar libres de sangre. Se cortaron 3 muestras de vellosidades con bisturí con un tamaño de 2 a 3 mm y un peso húmedo promedio de 30 mg. Los explantos placentarios así obtenidos, que contenían todas las estructuras histológicas

de la barrera placentaria, se cultivaron con trypomastigotes de *T. cruzi* (1×10^6) en MEM pH 7,35 se añadió penicilina (100 U/mL) y estreptomycin (10 g/mL) suplementado con 10% de suero bovino fetal (SBF) (Gibco lab. NY. USA) inactivado por 30 minutos a 56°C, en un volumen final de 600 μ L durante 3 horas, 24 horas y 72 horas a 37°C. Como control se cultivaron bajo las mismas condiciones muestras de los tejidos placentarios sin trypomastigotes.

Al término de los tiempos establecidos de cultivo se extrajeron las muestras y se las fijó en una solución de formol en buffer fosfato (pH 7), (Biopur® Argentina) para su posterior estudio histológico. Los medios de cultivo fueron centrifugados a 3.000 rpm por 15 minutos para sedimentar los *T. cruzi* y efectuar el estudio de la viabilidad parasitaria. Los sobrenadantes se preservaron a -20°C para la medición de los nitritos (como medida de producción de óxido nítrico).

Como control positivo de la infección por *T. cruzi* en células susceptibles y control para las mediciones de óxido nítrico, se infectaron células VERO en monocapa subconfluente al 60% en medio RPMI con 10% SBF (Gibco lab. NY. USA). Se emplearon los mismos tiempos de cultivo que para placenta y al finalizar los mismos se fijaron las células VERO para estudio histológico. El medio de cultivo sobrenadante se recuperó a las 24 hs, para analizar viabilidad parasitaria y tras centrifugarlo a 3.000 rpm durante 15 minutos, se efectuó la medición de nitritos.

TÉCNICA HISTOLÓGICA

Las muestras de vellosidades placentarias fueron obtenidas y fijadas en solución de formol a pH neutro, y luego deshidratadas en una serie de diluciones de etanol de 15 minutos cada paso (50°, 70°, 96°, 100°) hasta llegar a xilol. Se incluyeron en parafina y se realizaron cortes seriados (5 μ m) que se desparafinaron e hidrataron usando xilol y una serie de diluciones de etanol.

Algunos cortes fueron teñidos con Hematoxilina /Eosina para el análisis de infección.

CUANTIFICACIÓN DE LA INFECCIÓN DEL *T. cruzi* EN EXPLANTOS DE PLACENTAS HUMANAS Y CÉLULAS VERO

La cuantificación de la infección y reproducción del *T. cruzi* en placenta se obtuvo procesando los tejidos mediante técnicas histológicas de rutina.

Para analizar la reproducción del *T. cruzi* se realizó el recuento de individuos encontrados en nidos de amastigotes en co-cultivos de placenta y de células VERO con *T. cruzi* de 3 y 72 horas. Se contaron no menos de 200 células VERO o núcleos placentarios para determinar la cantidad de parásitos por nido. Los resultados se expresan como media +/- SD.

Para cuantificar el área ocupada por el parásito se realizaron 10 cortes paralelos seriados de 5 μm , de los tejidos cada 60 μm de tejido placentario, analizando un total de 600 μm , según el principio de Cavalieri (Escolar Castellón, 1998) obteniéndose los cortes correspondientes a 10 niveles para cada tiempo de cultivo de placenta con trypomastigotes.

Fueron capturadas imágenes al azar cada 5 campos observados, con un aumento de 400X, desde un microscopio fotónico (Axioscop®, Zeiss, Germany) unido a una video cámara analógica RGB (Hitachi KP-C550U CCD, Japan) conectada a una computadora, obteniendo 20 imágenes por sección. Las imágenes fueron digitalizadas y capturadas en formato JPG. Se midió el área de interés (área total del tejido y área ocupada por *T. cruzi*) analizándolas con las herramientas del programa Axiovision 3.0.6®. Los resultados se expresaron como media +/- SD en μm^2 .

VIABILIDAD DEL *T. cruzi* EN MEDIOS SOBRENADANTES DE CULTIVOS DE PLACENTAS HUMANAS Y CÉLULAS VERO

En los sobrenadantes de los co-cultivos se analizó la viabilidad del *T. cruzi*. Los medios de cultivo provenientes de los explantos placentarios con *T. cruzi* se centrifugaron a 3000 rpm por 15 minutos para sedimentar los parásitos. La viabilidad de los mismos se analizó mediante dos técnicas: el test de la motilidad y el de exclusión de colorantes con Azul trypan. Su recuento se efectuó en Cámara de Neubauer. El análisis del sobrenadante proveniente del cultivo de células VERO (células susceptibles a la infección por *T. cruzi*), se realizó bajo las mismas condiciones. Los resultados se expresaron como porcentaje de parásitos no viables.

DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE NITRITOS

Se siguió la técnica descrita por Green y col (132) a fin de efectuar la medición de nitritos producidos por parte de la placenta y valorar la capacidad de este gas de afectar la viabilidad del parásito. Se emplearon los sobrenadantes de los co-cultivos de placenta y células VERO con trypomastigotes. Se colocó 100 μ L de cada muestra luego de centrifugarlo a 3000 rpm durante 5 min, con 100 μ L de reactivo de Griess (Sigma Chemical Co. St Louis, MO, USA) Al cabo de 15 minutos en oscuridad se realizó la lectura a 540 nm en un lector para test de ELISA (BioRad modelo 450). Como control se midió la concentración de nitrito en medio de cultivo sobrenadante de 72 hs, obtenido de células VERO y de los cultivos de explantos de vellosidades coriales sin *T. cruzi*. La concentración de nitrito en los sobrenadantes fueron determinados usando una curva estándar utilizando concentraciones conocidas de NO₂ en agua bidestilada (a partir de una solución de NO₂Na 1000 μ M). Los blancos se realizaron colocando 100ul de agua bidestilada en lugar de sobrenadante. Los resultados se expresaron como media +/- SE, de cinco mediciones, en μ M de nitritos/ mL.

RELACIÓN ENTRE VIABILIDAD DE *T. cruzi* Y CONCENTRACIÓN DE NITRITOS

Los datos referentes a las concentraciones de nitritos en los medios de cultivo obtenidos a las 3 y a las 72 hs y la viabilidad de la célula parasitaria en esos mismos medios, fueron relacionados a fin de establecer o no mortalidad parasitaria en el medio ambiente placentario. La actividad trypanocida se ha determinado en un sistema libre de células. (133)

B: ESTUDIOS EN PLACENTAS DE ARCHIVO

RECOLECCIÓN DE DATOS CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICOS MATERNOS Y DE LOS RECIÉN NACIDOS

OBTENCIÓN DE PLACENTAS

Se realizó una minuciosa búsqueda de placentas provenientes de embarazadas chagásicas en los Servicios de Anatomía Patológica de los cuatro hospitales que en la ciudad de Córdoba cuentan con Servicio de Obstetricia destinados al subsector público: Hospital Universitario de Maternidad y Neonatología, Hospital Materno Provincial, Hospital Misericordia y Hospital Materno Neonatal. El primero de ellos correspondiente a la esfera de la Universidad Nacional de Córdoba, los otros tres al área del Ministerio de Salud de la provincia de Córdoba.

Se obtuvo material correspondiente a placentas de archivo en las tres primeras instituciones, pero la falta de historias clínicas nos obligó a descartar las muestras obtenidas en el Hospital Misericordia. La serie de estudio se completó con un período de 10 años. Previa autorización de los directores correspondientes y del Comité de Capacitación y Docencia de cada nosocomio, se procedió a la recolección de los datos. (Anexo 1)

En la Maternidad Nacional se recopilaron los datos de pacientes

con serología positiva para Chagas (n= 66) y de ese universo se obtuvieron los casos que transmitieron la enfermedad a la descendencia (n= 3). Este grupo de pacientes con ChC presentó el estudio anatomopatológico de las respectivas placentas y anexos.

En La Maternidad Provincial por el contrario, se recopilaron datos de pacientes con ChC (n= 6) y sobre esta información se pesquisaron las placentas que fueron enviadas a estudio anatomopatológico (n= 2).

De esta forma el universo quedó constituido por 72 pacientes con serología positiva para Chagas, de los cuales 9 transmitieron la enfermedad en forma vertical y sólo en 5 casos se contó con las muestras correspondientes a las placentas de archivo. De las placentas correspondientes a recién nacidos con Chagas congénito (n= 5) no todas tenían estudios de anatomía patológica por lo que el mismo se llevó a cabo en nuestro laboratorio.

A partir de las historias clínicas correspondientes se procedió a la recopilación de datos clínicos y epidemiológicos de la madre y del recién nacido con la finalidad de relacionarlos con la estructura placentaria y la expresión de la NOS.

HISTORIA CLÍNICA MATERNA:

- Edad,
- Procedencia,
- Antecedentes obstétricos: número de gestas, paridad, forma de terminación del parto,
- Antecedentes patológicos de relevancia.

HISTORIA CLINICA DEL RECIÉN NACIDO:

- Peso,
- Edad gestacional,

- APGAR,
- Laboratorio,
- Aspectos clínicos.

Posteriormente se cruzaron estas variables. En el análisis se consideraron placentas de recién nacidos que no presentaron transmisión vertical de la enfermedad en relación a otras placentas cuyos recién nacidos presentaron la forma congénita de la patología.

Se constituyó un tercer grupo de estudio, control, conformado por 4 tacos de anatomía patológica correspondientes a placentas proveniente de embarazos normales a término y obtenidas a partir de cesárea programadas por cesáreas previas. Fueron provistos por el Hospital Materno Provincial.

ESTUDIO ESTRUCTURAL MACROSCÓPICO:

Se recabaron los datos consignados en los informes de los Servicios de Anatomía Patológica correspondientes a cada Institución: Hospital Materno Provincial y Hospital Universitario de Maternidad y Neonatología.

Los informes detallaban la siguiente información:

- A) Medición de los diámetros de la torta placentaria
- B) Determinación del peso de la torta placentaria después de eliminar las membranas y el cordón.
- C) Examen de la superficie fetal de la placenta donde se consideró:
 - Área de inserción del cordón umbilical
 - Tipo de inserción del cordón umbilical
 - Aspecto de la superficie del amnios
- D) Examen de las membranas fetales
- E) Examen de la superficie materna de la placenta donde se consideró:

- Número y tamaño de los cotiledones
- Aspecto de los mismos, su colorido y consistencia

F) Examen de la superficie de sección del órgano

ESTUDIO ESTRUCTURAL MICROSCÓPICO:

Las secciones placentarias obtenidas que no contaban con el estudio correspondiente fueron analizadas en nuestro laboratorio. Se analizaron cortes seriados de 5 micrómetros en tres niveles diferentes separados por 100 µm. Las muestras una vez desparafinadas y rehidratadas fueron coloreadas mediante los siguientes procedimientos:

Técnicas histológicas:

- Hematoxilina-Eosina
- Método de Gallego

El método de Gallego es una coloración tricrómica y un método de tinción apropiado para la visualización de protozoarios. Se analizaron: Cara materna, fetal y cordón. Presencia de *T. cruzi* y si existían cuál era el número de individuos presentes. Lesiones estructurales: depósitos de fibrina, áreas de necrosis e infiltrados inflamatorios, depósito de calcificaciones, edema, características histológicas del CTB y del STB.

Índice placentario: El índice placentario resulta de la división entre el peso de la placenta sobre el peso del recién nacido, es un coeficiente que se ha usado como un elemento más de pronóstico en el examen perinatal. (5)

ESTUDIO HISTOQUÍMICO DE LA NOS

Se realizaron cortes seriados de 5 micrómetros. Cada una de las placentas se analizó en 3 niveles diferentes.

La expresión proteica de la eNOS se analizó usando anticuerpos IgG policlonal específicos contra aminoácidos 2-160 del extremo amino termi-

nal de eNOS (NOS3) y de 2-175 de iNOS (NOS2) (Santa Cruz Biotechnology Company, USA)

Los cortes se desparafinaron con xilol y rehidrataron en una serie sucesiva de alcoholes (100°, 96°, 70° y 50°) hasta llegar a PBS 1x pH 7,3. La actividad peroxidasa endógena se bloqueó con peróxido de hidrógeno 3% en PBS por 15 min. Los sitios de unión inespecíficos de las inmunoglobulinas fueron bloqueados por un preincubado de 15 min con 5% de SBF (GIBCO BRL, Grand Island, N.Y.) diluido en PBS y se lavó 3 veces con PBS. Se incubaron los cortes con el anticuerpo primario, anti IgG de humano contra eNOS obtenido en conejo con una dilución 1:200 durante la noche a 4°C. Luego de descartar el anticuerpo primario y secar alrededor del corte se colocó el anticuerpo secundario anti-IgG Biotinilado en PBS por 30 min a 37°C. Se lavó 3 veces con PBS y se secó. Se colocó la Peroxidasa conjugada con Estreptavidina por 20 minutos a 37°C y luego de lavar y secar se incubó con la solución del sustrato de la Peroxidasa y el cromógeno DAB (3,3 diaminobencidina) en Peróxido de Hidrógeno 0,3% H₂O₂ en Buffer Tris 0,05M pH 7,6; empleando el Kit de BioGenex cronometrando en un minuto. La reacción se detuvo colocando los cortes en agua destilada. Todas las incubaciones se realizaron en cámara húmeda. Luego de varios lavados con agua destilada, los cortes se contrastaron con Hematoxilina de Mayer (Biopur), se deshidrataron, clarificaron y se utilizó como medio de montaje DPX (Fluka, Germany). Se realizó el control de técnica utilizando SBF al 20% en PBS en reemplazo del anticuerpo primario.

LOCALIZACIÓN DE LAS ISOFORMAS ENDOTELIAL E INDUCIBLE DE LA ENZIMA NOS

Con el fin de localizar las isoformas endotelial e inducible de la NOS se emplearon cortes de placentas normales y chagásicas con y sin transmisión vertical. Los cortes se observaron con un microscopio fotónico ZEISS

axioskop (Germany) bajo objetivo de 100X en una primera instancia y luego se llevó a cabo el análisis semicuantitativo con objetivo de 400X. Se analizaron 2 cortes por nivel, analizando tres niveles diferentes separados unos de otros por 100 micrómetros por cada muestra de placenta de archivo. El estudio se efectuó por dos operadores independientes sobre los mismos cortes. Se analizaron vellosidades coriales: sincitiotrofoblasto, citotrofoblasto, estroma de la vellosidad, vasos fetales y células deciduales. Se detectó la presencia de la enzima (marca) mediante coloración de un granulado marrón indicador del epítopo proteico correspondiente a la respectiva enzima. Se obtuvieron cortes digitales mediante cámara de color Hitachi acoplada al microscopio en formato JPG para su análisis.

INTENSIDAD DE LA MARCACIÓN

Las secciones teñidas para identificar presencia de NOS se evaluaron semicuantitativamente teniendo en cuenta la intensidad de la tinción.

La intensidad de la marca se cuantificó mediante un score de cruces llevado a cabo por los mismos operadores y en forma independiente. Se procedió al análisis de las muestras tomando los valores negativo (-) para la ausencia de intensidad y fuertemente positivo (+++) para el máximo de intensidad según el modelo de análisis tomado de la revista PLACENTA (134).

Los puntajes promedio para los tres grupos investigados en los tejidos son los siguientes:

Intensidad de la tinción se clasificó como:

- Negativos: -
- Mezcla de negativos y débilmente positivo: - / +
- Positivo: +
- Muy Positivo: + +
- Fuertemente positivo: + + +

DATOS COMPARATIVOS DE ESTUDIOS "IN VITRO" Y PLACENTAS DE ARCHIVO

Se analizaron los datos obtenidos en nuestras experiencias "in vitro" en relación a los resultados del análisis morfológico e inmunohistoquímico placentario. También se estableció una relación entre las alteraciones anatomopatológicas descritas y los aspectos clínicos que presentaron los recién nacidos con y sin transmisión vertical, en relación a la localización de la NOS.

C: ANÁLISIS ESTADÍSTICOS DE LOS DATOS

A: ESTUDIOS "IN VITRO"

Se efectuaron análisis estadísticos determinando los valores centrales y los de dispersión, realizando inferencia estadística con métodos adecuados para cada uno de los experimentos. Niveles de probabilidad de $p < 0,05$ se consideraron como estadísticamente significativos.

Se efectuó el análisis de test-T apareado de Wilcoxon en las determinaciones de concentraciones de NO, considerando los pares (control sin *T. cruzi* y experimental con *T. cruzi*) de la misma placenta. Se determinó la media aritmética +/- error estándar (SE) de 5 experiencias independientes. Algunos experimentos se efectuaron por duplicado, tomando ambos datos como dependientes entre sí y considerando su media como valor único.

La viabilidad del *T. cruzi*, el número de parásitos por nido y superficies ocupadas se analizaron mediante test-T Student, considerando significativas las diferencias con $p < 0,05$.

B: ESTUDIOS EN PLACENTAS DE ARCHIVO

ESTUDIO CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICO

Para variables numéricas: Se aplicó estadística descriptiva, comparaciones de las mismas por medio del test-T representadas a través de gráficos como histogramas, gráficos de caja.

Las variables nominales se describen en proporciones, su comparación en matriz de contingencia, utilizando test exacto de Fisher para su contrastación. La representación de estos valores se realizó a través gráficos sectoriales y de barras.

CAPÍTULO 3: RESULTADOS

A- RESULTADOS DE ESTUDIOS “IN VITRO”.

ANÁLISIS DE LA INFECCIÓN POR *Trypanosoma cruzi* EN LOS EXPLANTOS DE VELLOSIDADES CORIÓNICAS DE PLACENTAS HUMANAS IN VITRO.

Se analizaron los explantos de vellosidades coriónicas co-cultivadas in vitro con trypomastigotes de la cepa Tulahuen de *T. cruzi*. Los cortes en diferentes niveles del tejido placentario se colorearon con Hematoxilina/Eosina. (figura 4)

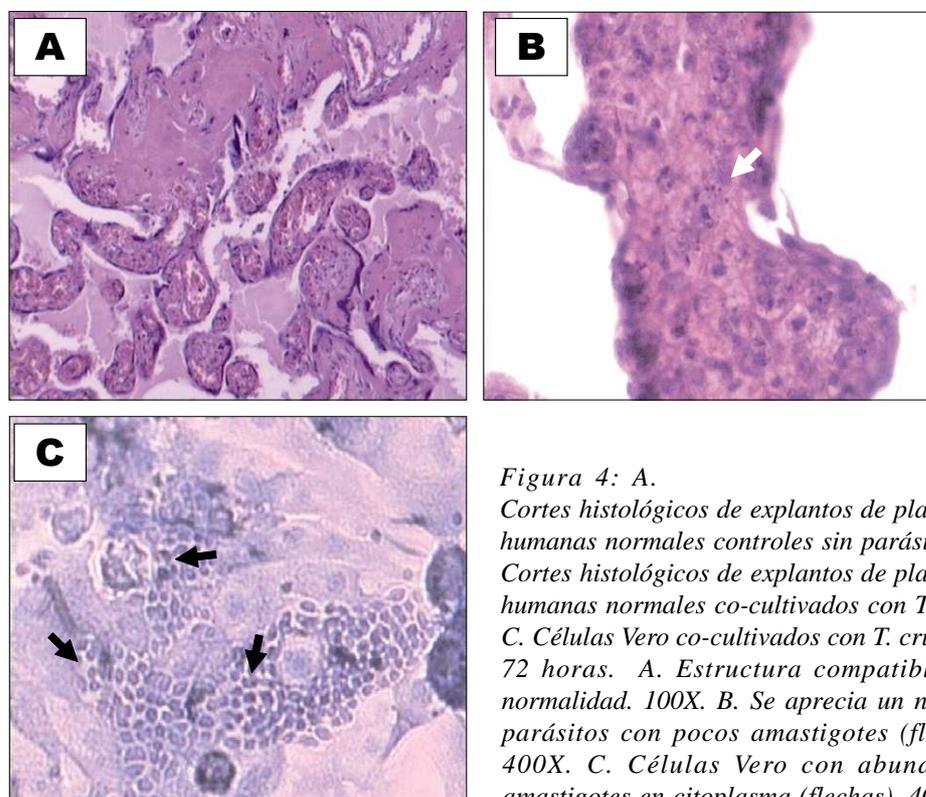


Figura 4: A. Cortes histológicos de explantos de placentas humanas normales controles sin parásito, B. Cortes histológicos de explantos de placentas humanas normales co-cultivados con *T. cruzi* C. Células Vero co-cultivados con *T. cruzi* por 72 horas. A. Estructura compatible con normalidad. 100X. B. Se aprecia un nido de parásitos con pocos amastigotes (flecha). 400X. C. Células Vero con abundantes amastigotes en citoplasma (flechas). 400X

El estudio morfológico de estos cultivos observados con el microscopio fotónico, evidenciaron escasos nidos de parásitos, que se localizaron en el estroma de las vellosidades coriónicas. Con motivo de cuantificar la infección placentaria, se efectuó el recuento de la cantidad de amastigotes por nido y el área ocupada por el *T. cruzi* en los co-cultivos de 72 horas, que es el

tiempo que corresponde en células susceptibles a la reproducción del parásito (135)

La cantidad de parásitos por nido indica una muy baja tasa de reproducción del parásito o una escasa infección del tejido placentario (tabla 3). Estos resultados se compararon con los obtenidos en la infección de las células Vero, susceptibles al *T. cruzi* con diferencias significativas entre ambos tipos celulares ($p < 0,05$).

Tabla 3: Cantidad de amastigotes de *T. cruzi* por nido en el interior de vellosidades placentarias y células VERO a las 72 horas.

Parásitos por nido en placenta	4,5 ± 2
Parásitos por nido en células VERO	55 ± 22

La superficie ocupada por el parásito (media +/- SD) en relación con la superficie total analizada de la placenta, se cuantificó a fin de determinar la infección productiva del *T. cruzi* en relación a la infección con células susceptibles a la infección, como las células VERO empleadas en este trabajo (tabla 4). La superficie total analizada entre el tejido placentario y las células susceptibles no tuvieron diferencias significativas. El área ocupada por el *T. cruzi* en los explantos placentarios fue más de 10 veces menor con respecto a las células Vero. La reproducción parasitaria estaría indicada por la superficie ocupada por el parásito en la placenta, la cual es significativamente inferior ($p < 0,05$) con respecto a células susceptibles a la infección por *T. cruzi*, empleadas como controles.

Tabla 4: Áreas medidas en explantos de placentas humanas y células Vero en co-cultivo con trypomastigotes de *T. cruzi* a las 72 horas y porcentaje de superficie ocupada por *T. cruzi*. Mediciones obtenidas mediante el programa Axiovision® en imágenes digitalizadas de cortes histológicos teñidos con H/E (400x). Los resultados se expresan como Media +/-SD. * $p < 0,05$.

TEJIDO	TIEMPO DE CULTIVO	SUPERFICIE TOTAL MEDIA \pm SD (μM^2)	SUPERFICIE TOTAL DE <i>T. CRUZI</i> MEDIA \pm SD(μM^2)	PORCENTAJE DE SUPERFICIE OCUPADA POR <i>T. CRUZI</i>
PLACENTA HUMANA	72 horas	6189,04 \pm 56,86	*15,76 \pm 3.26	0,057%
CÉLULAS VERO	72 horas	6383,49 \pm 2667	206,74 \pm 189	3,32

VIABILIDAD DE LOS PARÁSITOS EN EL MEDIO DE CULTIVO.

Al finalizar los tiempos de co-cultivos, a las 3 hs y 72 hs, se obtuvieron los medios de cultivos, los cuales se centrifugaron y el pellet de parásitos fue resuspendido para su recuento en cámara de Neubauer. A las 3 hs de co-cultivo, un número importante de parásitos fueron no viables con respecto al control ($p < 0,05$). La viabilidad de los parásitos a las 72 horas en los medios de cultivos placentarios fue casi nula y no se encontraron parásitos viables por test de motilidad y de exclusión de colorantes (figura 5).

CONCENTRACIÓN DE NITRITOS.

Se determinó la concentración de Nitritos como medida de óxido nítrico producido (132) en los medios sobrenadantes de los co-cultivos de placenta y de células Vero con *T. cruzi*. (figura 5).

Los valores de la concentración de nitritos en los medios sobrenadantes de cultivo de placenta - *T. cruzi* se incrementaron aunque no tuvieron significación estadística ($p > 0,05$) con respecto a los explantos de vellosidades coriónicas sin *T. cruzi*. Hubo un incremento en la concentración

de nitritos desde las 3 hs y la mayor concentración de nitritos se halló a las 72 hs con un incremento de aproximadamente el 75% del hallado a las 3 hs. (figura 5). El medio de cultivo sobrenadante proveniente de las células Vero presentó niveles de nitritos muy inferiores con respecto a las concentraciones placentarias y parasitizadas. (figura 5).

ASOCIACIÓN ENTRE CONCENTRACIONES DE NITRITOS Y VIABILIDAD DE *T. CRUZI*.

Se compararon las concentraciones de nitritos en los medios de cultivo al finalizar los tiempos pre-establecidos por un lado y la viabilidad de la célula parasitaria en esos mismos medios por otro, y se estableció una relación entre ambos grupos de datos, tal como lo ilustra la figura 5.

Los tiempos de cultivos placentarios fueron analizados a las 3 y a las 72 hs, y a lo largo de este período se observaron aumento en la concentración de nitritos en el medio y mayor mortalidad parasitaria. La mayor alteración en la célula parasitaria se logró a las 72 hs en que la concentración de nitritos fue máxima, representando niveles de nitritos deletéreos parasitizadas para el *T. cruzi*, según se ha determinado en un sistema libre de células. (133)

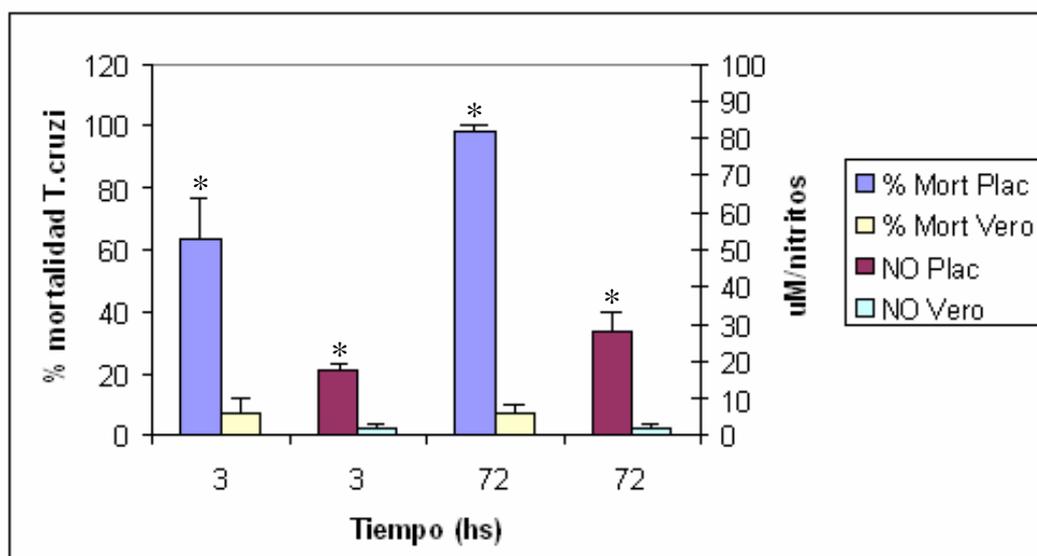


Figura 5: Mortalidad de trypomastigotes al final de los tiempos de co-cultivos explantos placentarios – *T. cruzi* y células Vero – *T. cruzi* expresada en porcentaje y la concentración de nitritos (como

medida de óxido nítrico) en esos mismo medios de cultivos expresada en μM de nitritos. Obsérvese que a las 72 hs de exposición se verifica la mayor concentración de nitritos en el medio y el mayor porcentaje de parásitos muertos en cultivos placentarios.

% Mort Plac: Porcentaje de parásitos muertos (test de motilidad y exclusión de colorante intravital) al final de los tiempos de co-cultivos explantos placentarios-T. cruzi.

% Mort Vero: Porcentaje de parásitos muertos (test de motilidad y exclusión de colorante intravital) al final de los tiempos de co-cultivos de células Vero - T. cruzi.

NO plac: Concentración de nitritos en el medio sobrenadante de cultivo al final de los tiempos de co-cultivos explantos placentarios – T. cruzi.

NO Vero: Concentración de nitritos en el medio sobrenadante de cultivo al final de los tiempos de co-cultivos células Vero - T. cruzi.

** $p < 0.05$ para el dato estudiado y su respectivo control.*

B- RESULTADOS DE ESTUDIOS EX VIVO EN PLACENTAS DE ARCHIVO.

El estudio realizado en ambos hospitales: Materno Provincial y Hospital Universitario de Maternidad y Neonatología, permitió el análisis de 47.195 partos en las dos instituciones en las cuales se encontraron casos con muestras placentarias de las cuatro instituciones consultadas (ver Material y Métodos). Las características de las embarazadas y de los recién nacidos (RN) cuyas placentas se pudieron conseguir se resumen en la tabla 5. El procedimiento de búsqueda (ver Material y Métodos) permitió hallar un número relativamente alto de casos congénitos ($n=9$) para el número de chagásicas halladas ($n=72$), considerando la baja incidencia de transmisión congénita de esta enfermedad. (136) Del universo de las embarazadas chagásicas se obtuvieron 9 recién nacidos con diagnóstico de Chagas congénito y 63 de embarazadas chagásicas no transmisoras. Se obtuvieron 13 tacos de placentas correspondientes a embarazadas chagásicas de los cuales no transmitieron la infección al feto (ChnoC) ($n=8$) y que sí transmitieron la infección congénita (ChC) ($n=5$). Se sumaron 4 tacos de placentas obtenidas de embarazadas normales con partos a término y sin síntomas ni signos clínicos ni de laboratorios que indiquen patologías, como controles. Se refuerza que del total de los 9 RN con transmisión vertical, sólo en 5 de ellos el estudio clínico se completó con el estructural placentario. Esta situación expresa un rasgo deficitario importante de nuestro sistema de salud.

Tabla 5. Características de las embarazadas chagásicas y de sus recién nacidos cuyas placentas se incorporaron al estudio estructural e inmunohistoquímico.

CASO	EDAD (años)	PROCEDENCIA	Nº GESTAS	TERMINACIÓN DEL PARTO	SEXO	APGAR	PESO RN (g)	TRANSMISIÓN VERTICAL
1	32	No End	1	Cesárea	M	6-8	1400	ChC
2	17	No End	1	Cesárea	F	4-6	2820	
3	23	No End	2	PN	M		3000	
4		Endémica	+3	PN	F	7-8	3300	
5	33		+3	PN	M	9-9	3750	
6	33	No End	1	PN	F	9-10	2970	
7	54	Endémica	1	Cesárea	F	9-10	3120	ChnoC
8	19	No End	1	PN	M		2970	
9	32	Endémica	3	PN	M	9-9	3200	
10	23	Endémica	1	PN	M		4050	
11		No End	1	PN	M	9-9	3530	
12	29	Endémica	+3	Cesárea	M	9-9		
13	20	No End	1	PN	M	7-9	3790	

No end: Embarazada proveniente de área no endémica.

PN: parto normal.

F: femenino.

M: masculino.

ChC: Chagas congénito

ChnoC: sin transmisión vertical.

ESTUDIOS PLACENTARIOS: ASPECTOS ESTRUCTURALES

ESTUDIO MACROSCÓPICO PLACENTARIO:

Se obtuvieron los datos macroscópicos de las placentas a través de los informes de anatomía patología correspondientes a las historias clínicas, los cuales se resumen en la tabla 6.

Las tres placentas pertenecientes a los casos congénitos a término, presentaron una media de 695gs superior a los valores de normalidad. Dado que dos casos son insuficientes para un análisis estadístico, los congénitos prematuros se sumaron a los congénitos a término para las determinaciones estadísticas. No hay diferencias significativas en el peso placentario

entre las poblaciones chagásicas con y sin transmisión congénita (tabla 6).

El análisis de la relación entre el peso de cada placenta y el peso del RN respectivo se conoce como Índice Placentario (IP), cuyo valor normal es 0,15 según nuestras placentas normales controles y la bibliografía. (137) Este es un coeficiente que se ha usado como un elemento más de pronóstico en el examen perinatal. El grupo ChnoC presentó un IP de 0,15 que no difiere significativamente de los valores normales (tabla 6). El grupo ChC tuvo un IP de 0,4 cuando se consideran todos los casos congénitos (n= 9) y de 0,21 en aquellos casos de los cuales se obtuvieron los tacos de placentas (n= 5). El IP en el grupo ChC es significativamente mayor que en el grupo ChnoC ($p < 0.05$). Los informes de las historias clínicas respecto a la superficie materna, en 3/5 de los casos de ChC hacen referencia a cotiledones grandes e irregulares y a la sección de éstos refiere un aspecto edematoso del tejido placentario.

En ambos grupos de estudio (ChnoC y ChC) y en relación al cordón umbilical, éste presentó un largo promedio 30 cm, (11- 40), considerado dentro de valores normales. En el 75% de los casos la inserción fue lateral. Los informes de las historias clínicas describen edema de cordón umbilical en el 25% de los casos. Membranas: el 80% (4/5) se describen como completas.

Tabla 6: Datos de los pesos de los RN provenientes de embarazadas chagásicas y de sus placentas.

	CASO	PESO (g)		PESO PLACENTARIO MEDIA \pm EM (g)	ÍNDICE PLACENTARIO (IP)	IP (MEDIA)
		PLACENTA	RN			
CON TRANSMISIÓN CONGÉNITA	1	370	1400	604 \pm 180	0,26	0,21
	2	460	2820		0,16	
	3	750	3000		0,25	
	4	530	3300		0,16	
	5	910	3750		0,24	
SIN TRANSMISIÓN CONGÉNITA	6	470	2970	510 \pm 100	0,15	0,15
	7	350	3120		0,11	
	8	660	2970		0,22	
	9		3200			
	10		4050			
	11	560	3530		0,15	
	12					
	13		3790			
VALORES NORMALES		500 a 600 *1	3000 a 3600 *2			0,15 *3

*1 cita Cunningham, 2001. (132)

*2 cita: Behrman R. y col. 2005. (133)

*3 cita: Salafia y col. 2009. (131)

ESTUDIO ESTRUCTURAL MICROSCÓPICO:

Los datos microscópicos de las placentas se obtuvieron desde las historias clínicas y en la revisión histológica de los preparados en nuestro laboratorio. Se emplearon cortes teñidos con hematoxilina eosina para efectuar el análisis estructural en todas las placentas obtenidas. Los resultados del análisis estructural placentario se presentan en la tabla 7.

Tabla 7: Análisis estructural microscópico de placentas chagásicas y normales.

PLACENTAS	EDAD GESTACIONAL	ESTUDIO MICROSCÓPICO
ChnoC	A Término Con alteración histológica n= 6 Sin alteración histológica n= 2	Infiltrados leucocitarios, fibrinoide, edema, engrosamiento arteriolar, calcificación, necrosis.
ChC	A Término	Alteración histológica mínima: calcificación, depósitos de fibrina.
	Pre-Término	Depósitos de calcio, fibrosis, edema, necrosis colicuativa, lesiones trofoblásticas.
NORMALES	A Término	Sin alteraciones.

Las placentas normales provenientes de embarazadas sin patologías del embarazo ni infecto-contagiosas, presentaron una estructura microscópica compatible con la normalidad. En ninguna de las placentas chagásicas analizadas se observó el *T. cruzi*, ni en los informes de anatomía patológica en las HC ni en nuestras propias observaciones. Las placentas chagásicas no congénitas (ChnoC) presentaron un rango de descripciones histológicas, desde mínimas lesiones casi indistinguibles con la normalidad hasta otros patrones de alteraciones mayores. En seis de estas placentas fue posible observar infiltrados leucocitarios, fibrinoide, calcificaciones, edema, necrosis colicuativa y arteriolas engrosadas (figura 6).

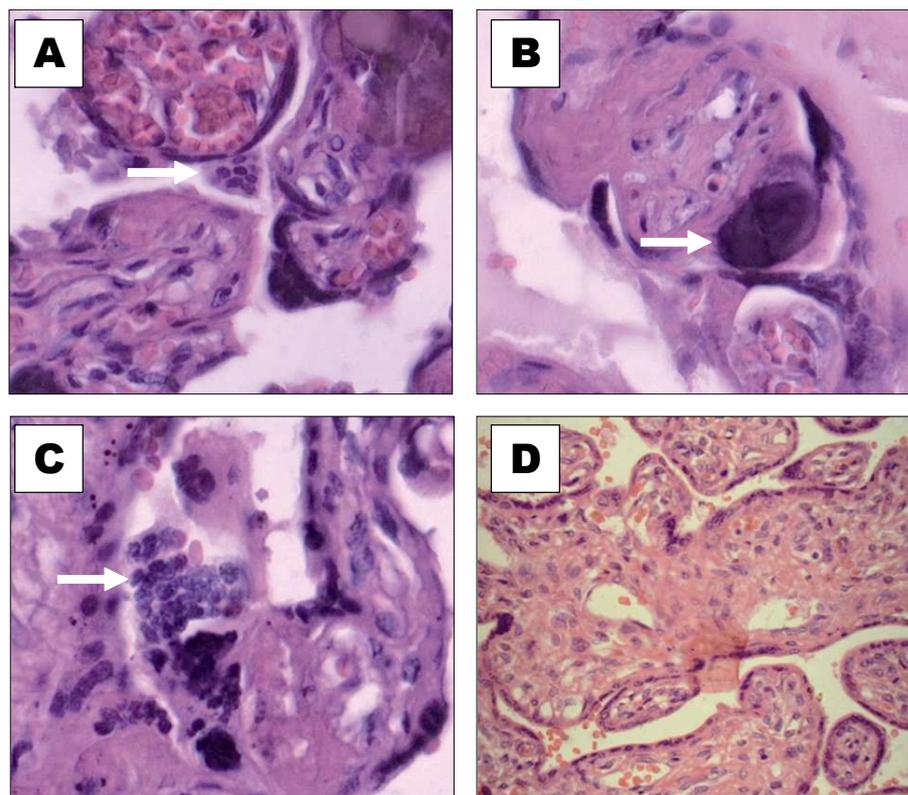


Figura 6: A, B y C. Cortes histológicas de placentas chagásicas sin transmisión congénita y D. placenta normal. 400X. Se observan desprendimiento de sinciciotrofoblasto y proliferación de citotrofoblasto en A (flecha), calcificación en B (flecha) y necrosis y proliferación trofoblástica en C (flecha) D. Placenta compatible con la normalidad.

El grupo de placentas con transmisión congénita (ChC) presentó diferencias estructurales entre los nacidos a término y los pre-término, ya que las primeras tenían una morfología sin lesiones de significación, tales como depósitos de calcio y fibrina (figura 7).

En las placentas pre-término (figura 8) pudo observarse depósitos de fibrina, calcificaciones, edema, necrosis colicuativa, cariorrexis, La fibrosis del estroma compromete el núcleo de las vellosidades, los troncos vellosos y la placa corial. Esta última aparece considerablemente engrosada, siendo la fibrosis muy evidente en las áreas perivasculares. Además, lesiones indicadores de apoptosis y necrosis trofoblásticas, tales como desprendimiento del sinciciotrofoblasto y agrupamientos de citotrofoblasto pudieron ser observados en nuestro laboratorio, ya que no figuraban en los informes de las

HC. Relacionadas a estas alteraciones trofoblásticas, se apreciaron depósitos de fibrinoide (figura 8).

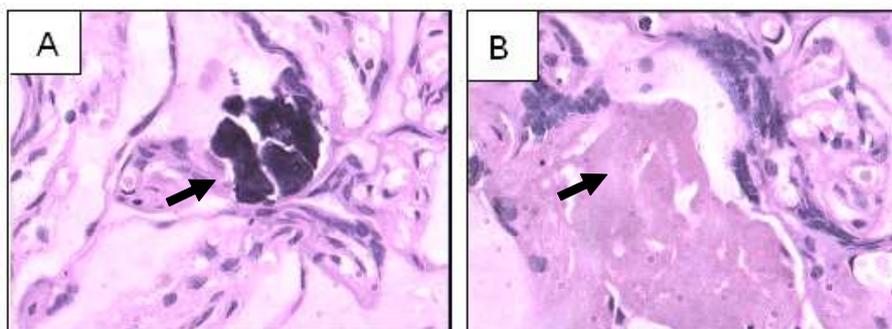


Figura 7: Placentas de término con transmisión vertical de la enfermedad. A. Calcificación (flecha). 400X. B. Fibrinoide (flecha). 400X.

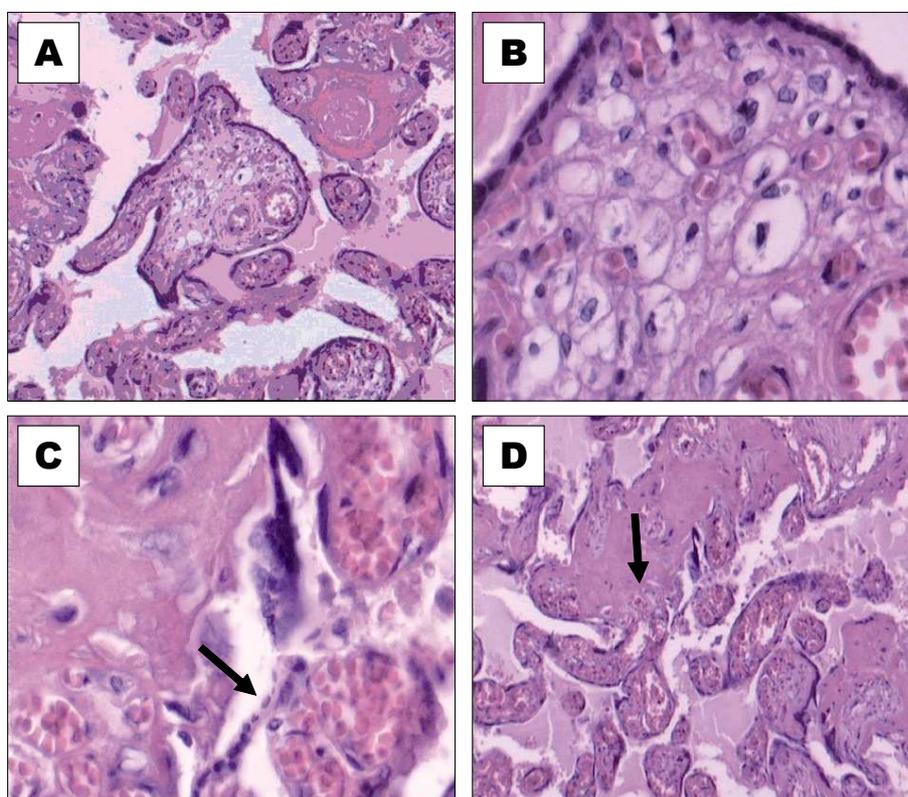


Figura 8: Placentas de pre-término con transmisión vertical de la enfermedad. A. Fibrinoide y necrosis. 100X. B. Edema en vellosidades y células de Hofbauer. 400X. C. Desprendimiento de trofoblasto y necrosis (flecha) 400X. D. Fibrosis y necrosis intravellositarios (flecha) 100X.

DETECCIÓN INMUNO-HISTOQUÍMICA DE LA ÓXIDO NÍTRICO SINTASA (NOS).

El análisis microscópico de la inmuno-histoquímica para eNOS e iNOS se efectuó con objetivos 100X y 400X en un video microscopio fotónico

Zeiss, analizando tres niveles de cortes de cada muestra placentaria correspondientes a placentas normales, y chagásicas con y sin transmisión vertical.

eNOS (ENDOTELIAL O TIPO III): LOCALIZACIÓN.

En las placentas normales empleadas como controles, el epítopo proteico de la enzima eNOS dio reacción positiva a nivel del STB, a nivel del citoplasma apical y lateral a los núcleos, de manera continua en la mayoría de las vellosidades analizadas, tanto troncales como terminales. También la enzima se localizó en el endotelio de los vasos fetales intravellositarios de las vellosidades de mayor tamaño con una coloración marrón evidenciando la presencia de la enzima. Las células deciduales expresan esta enzima en escasas células con tinciones discontinuas y parcialmente en el citoplasma rodeando al núcleo (figura 9).

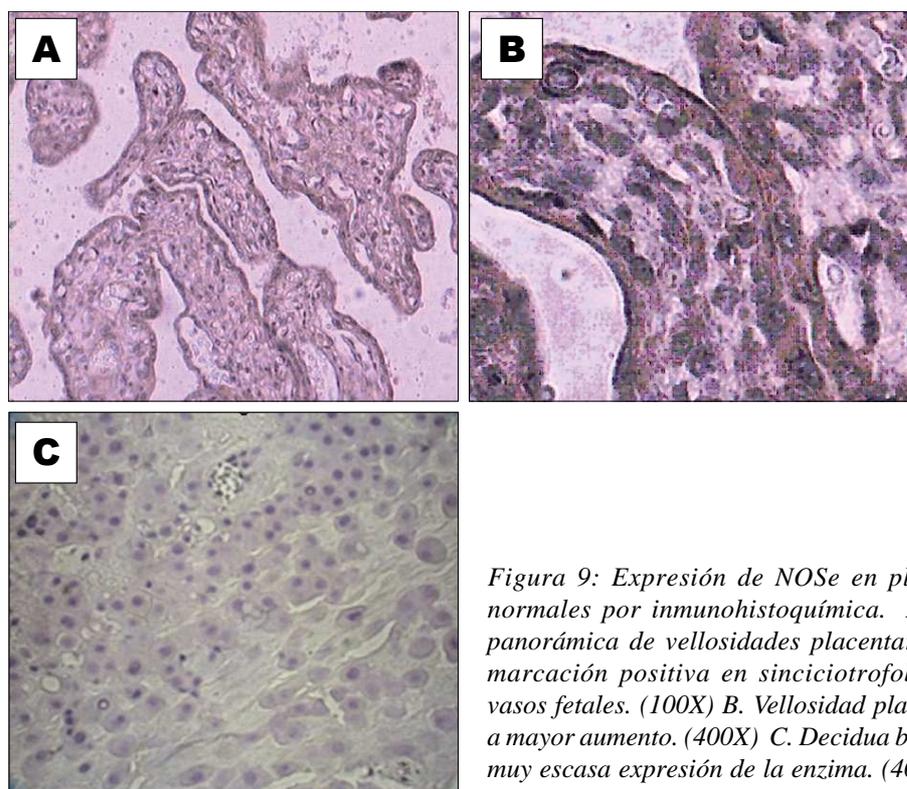


Figura 9: Expresión de NOSe en placentas normales por inmunohistoquímica. A. Vista panorámica de vellosidades placentarias con marcación positiva en sinciotrofoblasto y vasos fetales. (100X) B. Vellosidad placentaria a mayor aumento. (400X) C. Decidua basal con muy escasa expresión de la enzima. (400X)

En las placentas del grupo ChnoC la tinción fue discontinua en el citoplasma apical del sinciotrofoblasto como así también la extensión de la marcación. También hubo tinción de eNOS en vasos fetales de vellosidades de menor calibre de manera discontinua a lo largo del endotelio dentro del mismo vaso, y entre los vasos de diferentes vellosidades. Las células deciduales presentaron reacción positiva para la enzima en el citoplasma alrededor del núcleo. (figura 10)

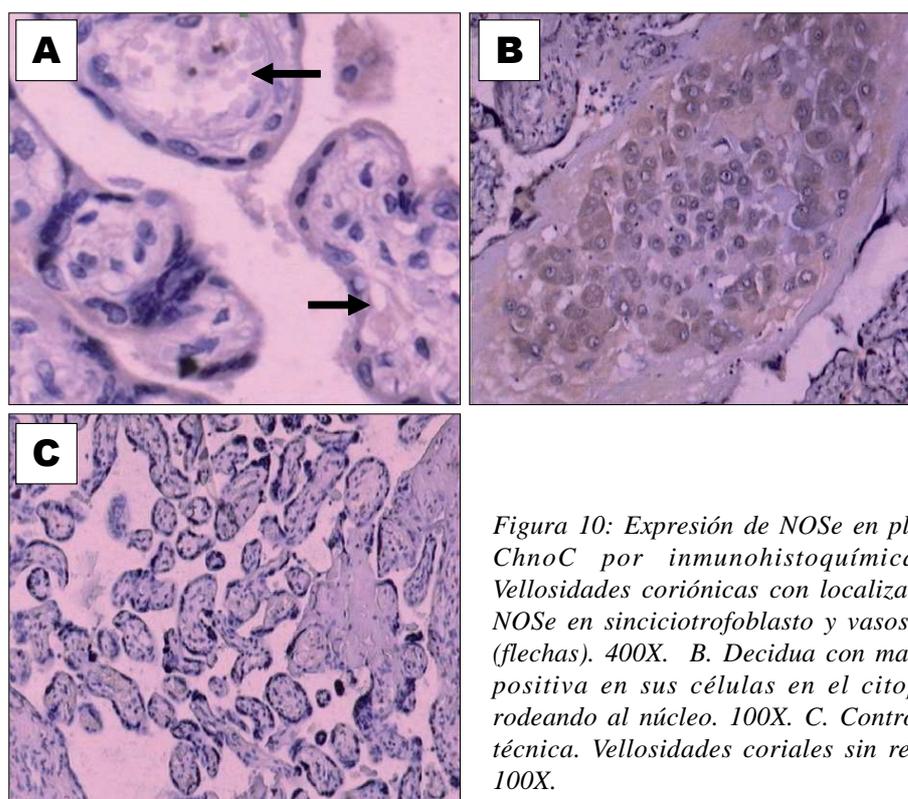


Figura 10: Expresión de NOSe en placentas ChnoC por inmunohistoquímica A. Vellosidades coriónicas con localización de NOSe en sinciotrofoblasto y vasos fetales (flechas). 400X. B. Decidua con marcación positiva en sus células en el citoplasma rodeando al núcleo. 100X. C. Control de la técnica. Vellosidades coriales sin reacción. 100X.

Las placentas provenientes de RN con infección congénita (ChC) presentaron reacción muy discontinua a lo largo del sinciotrofoblasto y con marcación aleatoria entre las distintas vellosidades. (figura 11)

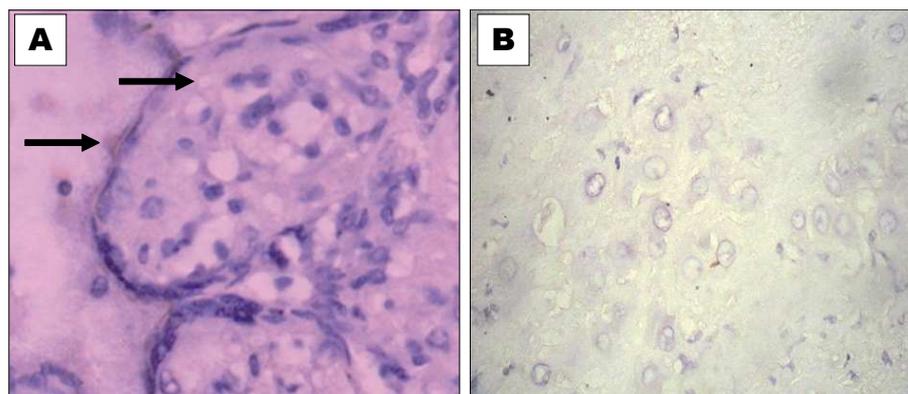


Figura 11: Expresión de NOSe en placentas ChC por inmunohistoquímica. A. Vellosidades coriónicas con localización de NOSe en sinciotrofoblasto y vasos fetales (flechas). 400X. B. Decidua con muy escasa marca en células deciduales. 400X.

iNOS (INDUCIBLE O TIPO II): LOCALIZACIÓN

La evaluación de esta enzima en las vellosidades coriales de las placentas normales fue difícil de evaluar debido a que la localización fue reducida y en cortas extensiones a nivel del citoplasma apical del sinciotrofoblasto en vellosidades de menor calibre. Similar descripción para la marcación en vasos fetales. (figura 12)

En las placentas de ChnoC y ChC se observó marca de la enzima en el citoplasma supranuclear del trofoblasto y del endotelio de los vasos fetales de manera discontinua aunque en extensiones mayores del tejido.

En decidua la marca se localizó en el citoplasma rodeando al núcleo, en forma similar en todas las placentas estudiadas.

En todos los casos las muestras controles de la técnica dieron negativos para las respectivas tinciones.

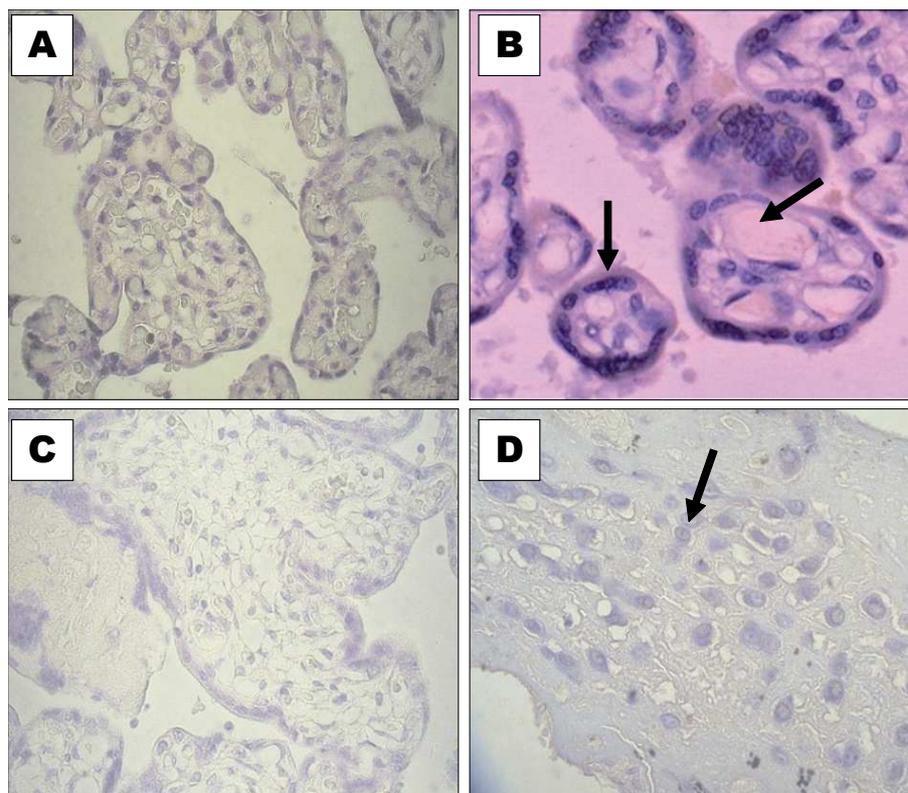


Figura 12: Expresión de iNOS en placentas normales, ChnoC y ChC por inmunohistoquímica. A. Vellosidades de Placentas normales sin marcación visible. 400X B. Vellosidades coriales de placentas ChnoC con marca limitada en trofoblasto (flecha) y vasos fetales. 400X. C. Vellosidades coriónicas de ChC, expresión muy limitada. 400X. D. Decidua de placentas ChnoC. La flecha indica la escasa marca hallada.

eNOS E iNOS: INTENSIDAD.

Se realizó una semicuantificación para determinar la intensidad de marcación de las dos isoformas de la NOS. Para ello se siguió una escala extraída de la Revista Placenta (134) asignando cruces a las distintas intensidades observadas (ver Materiales y Métodos). El estudio se realizó en 10 campos a 400X de cada corte, analizando trofoblasto, vasos fetales y decidua.

La mayor intensidad de eNOS se encontró en trofoblasto y vasos sanguíneos en las placentas normales, asignando tres cruces (+++) a dicha marca; la reacción fue débilmente positiva en decidua. Las placentas ChnoC presentaron una disminución de intensidad evaluándosela como positiva o muy positiva tanto a nivel del trofoblasto como de los vasos fetales. Las célu-

las deciduales dieron una intensidad mayor (positiva) con relación a las observaciones en placentas normales. La menor intensidad de marca en las vellosidades (trofoblasto y vasos) se observó en las placentas ChC siendo débilmente positiva. Una de las placentas dio negativa en forma persistente en todas las repeticiones realizadas y en todos los niveles. A nivel de decidua la reacción fue similar a la de las placentas normales y menor con respecto a ChnoC, tanto las de término como las de pre-término. Estos resultados se expresan en la tabla 8.

Tabla 8: Semicuantificación de intensidad de marca en inmunohistoquímicas para NOSe en placentas normales y chagásicas sin y con transmisión congénita.

	EDAD GESTACIONAL	STB	VASOS FETALES	DECIDUA
PLACENTAS NORMALES (n= 3)	A término	(+++)	(+++)	(+/-)
PLACENTAS CHnoC (n= 8)	A término	(+)	(+ o ++)	(++)
PLACENTAS ChC (n= 5)	A Término	(- o +/-)	(+ o +/-)	(- o +/-)
	Pre-Término	(+/-)	(+ o +/-)	(+/-)

STB: sinciotrofoblasto. ChnoC: placentas del grupo Chagásicas sin transmisión congénita. ChC: placentas del grupo con transmisión congénita.

iNOS tuvo una marcación en vellosidades muy tenue y fue evaluado como negativo, de acuerdo a la escala de García y col., (2007) en placentas normales. (tabla 9) En ChnoC hubo un aumento de intensidad en trofoblasto y en vasos fetales. En ChC también aumentó la intensidad con respecto a placentas normales pero en menor medida y fue evaluado como débilmente positivo en placentas de gestas a término y pre-término. Esta enzima presen-

tó una expresión débil y similar en decidua en los 3 grupos de placentas estudiados.

Tabla 9: Semicuantificación de intensidad de marca en inmunohistoquímicas para iNOS en placentas normales y chagásicas sin y con transmisión congénita.

	EDAD GESTACIONAL	STB	VASOS FETALES	DECIDUA
PLACENTAS NORMALES (n= 3)	A Término	(-)	(-)	(+/-)
PLACENTAS ChnoC (n= 8)	A Término	(+/-)	(+)	(+/-)
PLACENTAS ChC (n= 5)	A Término	(-) (+/-)	(-) (+/-)	(-) (+/-)
	Pre-Término	(+/-)	(+/-)	(+/-)

STB: sinciotrofoblasto.

ChnoC: placentas chagásicas sin transmisión congénita

ChC: placentas chagásicas con transmisión congénita.

ANÁLISIS CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICO.

EDAD MATERNA.

Se analizaron los datos correspondientes a la edad materna consignados en las historias clínicas correspondientes a las gestantes chagásicas con y sin transmisión vertical (figura 13). Considerando el universo de embarazadas chagásicas con y sin transmisión vertical, se observa que la media fue de 28,36 años y de 28,38 años para los grupos ChnoC y ChC respectivamente, no presentando significación estadística (figura 13). Cuando se consideró el grupo de chagásicas con tacs de placentas, las medias fueron de 26,25 años para ChC y de 30 años para ChnoC. Esta diferencia se obtuvo debido a

un caso con dato sesgado, que es una embarazada de 54 años (tabla 5). Cuando no se considera este caso (tabla 5, caso 7) la media es de 26,25 años para el grupo ChC y de 26 años para ChnoC sin diferencias entre ambos grupos.

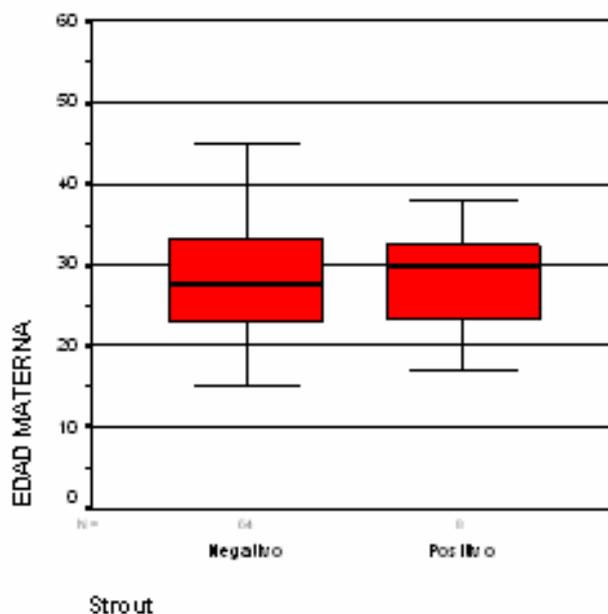


Figura 13: Gráfico comparativo de las edades de madres con serología positiva para Chagas con y sin transmisión vertical.

LUGAR DE PROCEDENCIA.

El área de influencia de los hospitales es amplia y asisten a la demanda espontánea de la población los casos derivados de los centros de salud en carácter de primer eslabón de referencia. La caracterización social de las mujeres que en general acceden al hospital corresponde al perfil típico de la población de escasos recursos. Según nuestros registros el 50 % de la población cuyos hijos desarrollaron ChC provenía de zonas endémicas (Santiago del Estero, Región NO de Córdoba y Bolivia) mientras que el otro 50% correspondía a la capital de la provincia. No se consigna en la historia clínica domicilios previos al embarazo actual y en un caso el dato no se encontraba registrado. En relación a las pacientes cuyos hijos no desarrollaron la parasitosis

(ChnoC) el 49% de ellas provenían de regiones endémicas: Cruz del Eje, Bolivia, Región NO de Córdoba, Catamarca, Santiago del Estero y La Rioja, mientras que el 51% restante tenían consignado como lugar de procedencia regiones no consideradas propias de la patología: Río 1º, Río 2º, Santa Rosa, Pergamino Alta Gracia y un 25% de este porcentaje pertenecían a Córdoba, Capital. Como se observa en la tabla 5 esa misma proporción de áreas endémicas y no endémicas se refleja en las placentas estudiadas.

GESTAS MATERNAS.

Con respecto al número de gestas, sobre el total de las embarazadas chagásicas que transmitieron o no la enfermedad en forma vertical (n= 71), el 71% de las pacientes habían tenido más de una gesta. (figura14)

En relación al número de gestas, no hubo diferencias significativas entre aquellas pacientes que no transmitieron la enfermedad a su descendencia y aquellas cuyos hijos nacieron con diagnóstico de ChC.

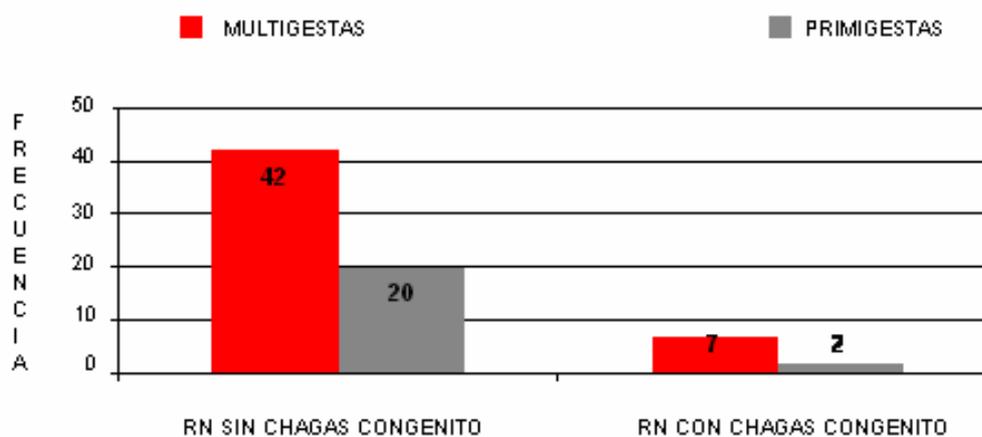


Figura 14: Número de gestas maternas. RN= recién nacido.

FORMA DE TERMINACIÓN DEL PARTO.

Según los datos recabados, tanto en el grupo que transmitió ChC a la descendencia como el otro que no tuvo transmisión vertical prevaleció la forma de terminación por vía vaginal ya sea en forma de parto normal o mediante la utilización de fórceps. (figura 15)

En la serie de casos presentados las causas que determinaron la operación cesárea no se alejaron de las usuales indicaciones obstétricas, cirugías previas, primiparidad añosa, posiciones anómalas, según los datos consignados en las historias clínicas consultadas.

Analizando la forma de terminación del parto, entre los grupos que transmitieron o no la enfermedad a la descendencia, no hubo significación estadística ($p=0.08$).

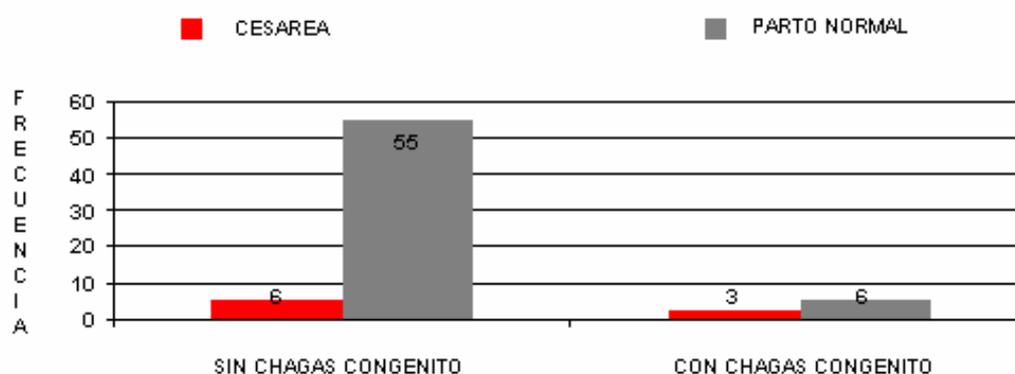


Figura 15: Terminación del parto para embarazadas chagásicas que transmitieron y que no transmitieron la enfermedad en forma vertical. No hay diferencias significativas ($p = 0,08$ Test Exacto de Fisher).

APGAR.

Considerando sólo a los RN con Chagas congénito, aquellos que nacieron a término ($n= 6$) presentaron un APGAR superior a 7. Los recién nacidos pretérmino ($n= 3$) con transmisión vertical fueron los que manifestaron mayor compromiso del estado general en cuanto al cuadro clínico, con un APGAR inferior a 7 al minuto 1, aunque con buena recuperación a los 5 minutos. Todos los RN del grupo ChnoC tuvieron un APGAR superior a 7. El dato estuvo presente en 62/63.

SEXO DE LOS RECIÉN NACIDOS.

En nuestro estudio el grupo de recién nacidos con diagnóstico de Chagas congénito ($n= 9$), presentó diferencia con significación estadística a favor del sexo femenino. (test exacto de Fisher: $p=0.01$) (figura 16). No hubo

diferencia significativa dentro del grupo ChnoC. Las placentas obtenidas correspondieron a un RN varón y a 4 RN femeninos por lo que esta muestra difiere del universo obtenido y no permite la relación con los aspectos morfológicos ni histoquímicos.

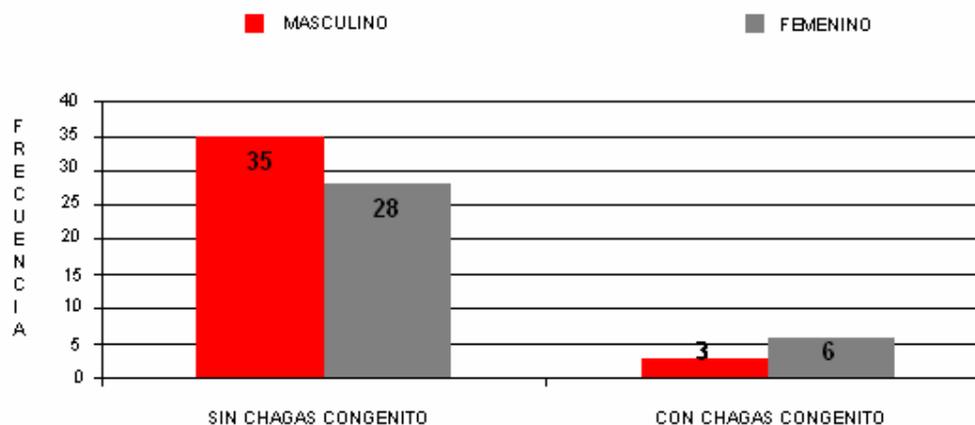


Figura 16: Frecuencia según el sexo de los recién nacidos de madres con serología positiva para Chagas con y sin transmisión vertical. Test Exacto de Fisher: $p = 0.01$

PESO DE LOS RECIÉN NACIDOS.

En el grupo de recién nacidos con diagnóstico de ChC, 3/9 de los niños fueron pretérmino; cuatro del total de los casos pesaron al momento del nacimiento menos de 3.000 gr (tabla 5) y de estos cuatro RN, dos fueron de bajo peso al nacer (<2.500 gr) y presentaron como síntoma cardinal ictericia atribuible al Chagas congénito.

En relación al grupo de RN no infectados la media de peso de los recién nacidos correspondió a 3375 gr considerado dentro de lo normal para los recién nacidos, cuyos valores normales son de 3.000-3.600 gr (139). La media de peso para los RN con infección congénita fue de 2.794 gr representando una disminución significativa con respecto al grupo ChnoC ($p < 0,05$) (figura 17). Las placentas estudiadas corresponden al universo, con una media de peso de RN de 3.375 gr y 2.794 gr para ChnoC y ChC respectivamente (tabla 5).

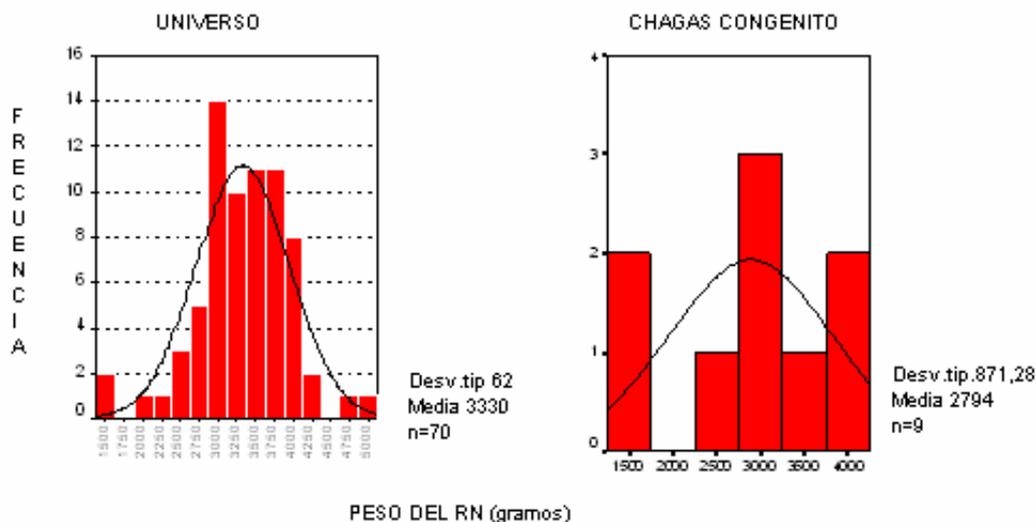


Figura 17: La comparación entre los pesos de los RN correspondientes a los grupos con transmisión vertical de la enfermedad y sin Chagas congénito mostró significación estadística. Prueba T: $p = 0,03$

RELACIÓN MORFOLÓGICO ESTRUCTURAL CON ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS.

En la Tabla 10 se resume el análisis estructural con los datos de la procedencia de las embarazadas, número de gestas, forma de terminación del parto, tiempo de embarazo, el estado del recién nacido al minuto, a los 5 minutos y a su peso. En relación a la procedencia no se encontró una relación con las alteraciones morfológicas ya que estas alteraciones se encontraron en las placentas provenientes de las áreas endémicas y no endémicas. En el caso de las lesiones significativas placentarias de las ChC de pre-término, no es posible establecer una relación con la procedencia no endémica debido al número no significativo de placentas conseguidas para su estudio. Las lesiones placentarias con escasa y alta significancia se presentaron tanto en primigestas como en multigestas. No se puede establecer un patrón de relación directa entre ambos grupos de datos. Tampoco hay relación entre los aspectos estructurales placentarios con el tiempo de gestación, ya que las placentas con lesiones de significación provinieron de embarazos a término y de pretérmino, como tampoco con el estado fetal ni el peso de los RN chagásicos, ni con la transmisión vertical.

Tabla 10: Relaciones entre aspectos morfológicos placentarios y principales manifestaciones clínicas y epidemiológicas de los recién nacidos con y sin transmisión vertical de la enfermedad de Chagas.

ESTUDIO MORFOLÓGICO (Microscopía Óptica)		PROCEDENCIA	Nº GESTAS	PARTO	EDAD GESTACIONAL	APGAR	PESO DEL RN	PLACENTAS
Con alteración histológica n=6	-Infiltrados leucocit., -Fibrinoide, -Calcificación -Edema, -Necrosis colicuativa, -Engrosamiento arteriolar	Endémicas n=3 No Endémicas n=3	Primigesta n=4 Multigesta n=2	Parto natural	A Término	7 o más	Peso normal (3000 g a 3600 g) n=6	ChnoC
Sin alteración histológica n=2	Sin alteraciones de significación	Endémica n=1 No Endémica n=1	Primigesta n=2				Peso inferior a 3000 n=2	
A Término	Alteración histológica mínima: -Calcificación, -Depósitos fibrina	Endémicas n=1 No Endémicas n=1 D.N.=1	Multigesta n=3	Parto natural	A Término	7 o más	Peso normal (3000 g a 3600 g) n=3	ChC
Pre-término	-Depósitos de calcio, -Necrosis (infartos), -Lesiones trofoblást. -Edema, -Fibrosis	Endémica n=0 No Endémica n=2	Primigesta n= 2	Cesárea	Pre-término	1er min.<7 5to min.>7.	Peso inferior al normal (< 3000 g) n=2	
A Término	Sin alteraciones	No endémica		Parto natural	A Término	7 o más	Peso normal	Normal

ChnoC: Chagas no congénito.
ChC: Chagas congénito.

EXPRESIÓN DE LA ENZIMA NOS EN LOS ASPECTOS CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICOS.

Se realizó el análisis de la inmunohistoquímica para NOSe y NOSi en las placentas provenientes de embarazadas chagásicas contemplando la procedencia, número de gestas, forma de terminación del parto, APGAR, Peso del RN, tiempo de gestación y transmisión congénita. Los resultados se expresan en la tabla 11. La intensidad de expresión de iNOS no permite identificar poblaciones homogéneas que conformen un patrón de expresión en alguna de las características clínico-epidemiológicas estudiadas. Se observa que el área endémica o no endémica de las embarazadas no constituye un patrón de expresión de la enzima. Lo mismo ocurre con el número de gestas, si el parto fue por vía natural o cesárea, el estado del RN o su peso. Las diferencias de intensidad de expresión de iNOS se manifestaron en las vellosidades coriales entre las placentas normales y las chagásicas (tabla 9). Este fenómeno no ocurrió a nivel de la decidua. Los antecedentes epidemiológicos analizados en esta tesis no tienen relación con patrones de expresión de la eNOS, pero sí mantienen relación con algunas condiciones clínicas. La semi-cuantificación de la expresión de eNOS da características específicas entre las poblaciones chagásicas con y sin infección fetal. Esta isoforma de la NOS tiene una reacción positiva a muy positiva en las placentas del grupo ChnoC, pero es débilmente positiva en el grupo ChC (tabla 8). En este último grupo una placenta dio persistentemente negativa la reacción.

Tabla 11: Relaciones entre expresión de NOS por inmuno-histoquímica en placentas y datos clínico-epidemiológicos de embarazadas chagásicas y sus recién nacidos.

DATOS EPIDEMIOLOGICO-CLÍNICOS		INMUNOHISTOQUIMICA Placentas Humanas			
		iNOS		eNOS	
		VELLOSIDAD CORIAL	DECIDUA	VELLOSIDAD CORIAL	DECIDUA
PROCEDENCIA	ENDÉMICA	+/- (n=5)	+/- (n=5)	+ o ++ (n=4) - o +/- (n=1)	++ (n=4) - o +/- (n=1)
	NO ENDEMICA	+/- (n=7)	+/- (n=9)	+ o ++ (n=4) - o +/- (n=3)	++ (n=4) - o +/- (n=3)
NÚMERO GESTAS MATERNAS	PRIMIGESTA	+/- (n=8)	+/- (n=8)	+ o ++ (n=6) - o +/- (=2)	++ (n=6) - o +/- (=2)
	MULTIPARA	+/- (n=5)	+/- (n=5)	+ o ++ (n=2) - o +/- (n=3)	++ (n=2) - o +/- (n=3)
FORMA DE TERMINACIÓN DEL PARTO	PARTO NATRAL	+/- (n=10)	+/- (n=10)	+ o ++ (n=8) - o +/- (n=3)	++ (n=8) - o +/- (n=3)
	CESÁREA	+/- (n=3)	+/- (n=3)	- o +/- (n=2)	+/- (n=2)
APGAR	>7	+/- (n=11)	+/- (n=11)	+ o ++ (n=8) - o +/- (n=3)	++ (n=8) - o +/- (n=3)
	<7	+/- (n=2)	+/- (n=2)	- o +/- (n=2)	+/- (n=2)
PESO DE LOS RN (g)	=>3000	+/- (n=10)	+/- (n=10)	+ o ++ (n=8) - o +/- (n=2)	+ o ++ (n=8) +/- (n=2)
	<3000	+/- (n=3)	+/- (n=3)	- o +/- (n=3)	- o +/- (n=3)
TIEMPO DE GESTACIÓN	A TÉRMINO	+/- (n=11)	+/- (n=11)	+ o ++ (n=8) - o +/- (n=3)	+ o ++ (n=8) - o +/- (n=3)
	PRE-TÉRMINO	+/- (n=2)	+/- (n=2)	+/- (n=2)	+/- (n=2)
INFECCIÓN FETAL	NO	+/- (n=8)	+/- (n=8)	+ o ++ (n=8)	++ (n=8)
	SI	+/- (n=5)	+/- (n=5)	- o +/- (n=4)	- o +/- (n=5)

CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN

La enfermedad de Chagas, también llamada tripanosomiasis americana, se debe a la infección por el parásito *Trypanosoma cruzi*. Según las estimaciones más recientes, en todo el mundo hay unos 8 millones de personas infectadas por el parásito y en 2008 se registraron 11.000 defunciones. (60) Se calcula que el 25% de la población de Latinoamérica, unos 100 millones de personas, estarían en riesgo de contraer la enfermedad (74). De esta forma el “mal de Chagas” sigue siendo un gran problema de salud en muchos países de América Latina.

Si bien la transmisión vectorial, es la principal vía de contagio, la infección prenatal por vía trasplacentaria de *Trypanosoma cruzi* en la circulación materna con infección aguda o crónica, es posible, pero no obligada. Schijman (136), señala que la relevancia de la transmisión congénita de la enfermedad y su impacto en Salud Pública se pone de manifiesto, al lograrse un control adecuado sobre insectos vectores y también en los bancos de sangre. Frade (140) por su parte, resalta que por cada contagio del mal de Chagas debido a la picadura de una vinchuca, se calcula que habría alrededor de diez casos congénitos usualmente asintomáticos en los que la transmisión se da entre la madre y el hijo, durante la gestación o en el momento del parto. Por cada uno de estos casos congénitos que se detecta y notifica al Ministerio de Salud, habría entre 6 y 12 que no se descubren ni se tratan.

Nuestra serie de estudio presenta 72 casos de embarazadas chagásicas obtenidas, mediante la búsqueda manual de historias clínicas, debido a la ausencia de sistemas informáticos actualizados, en dos de las cuatro instituciones donde el subsector público de salud se atiende en la ciudad de Córdoba, totalizando un período de 10 años. Como se observa en las tablas 5 y 6, la ausencia de datos es una constante en las historias clínicas. Este registro deficitario es una característica de nuestro sistema de salud manifestándose a través de historias clínicas incompletas, en la evidencia de

registros de madres que fueron dadas de alta con diagnóstico tardío de Chagas congénito a sus hijos o porque fueron asistidas en nuestros hospitales y tuvieron en más de una gesta, hijos con esta parasitosis.

La enfermedad de Chagas congénita constituye por importancia epidemiológica la tercera vía de transmisión del *T. cruzi* al hombre, (141) se sospecha en todo RN de mujer embarazada infectada por el parásito, sin interesar la fase de su enfermedad. La prevalencia de mujeres embarazadas infectadas con *T. cruzi* en la Argentina se sitúa entre el 4% (142) y el 52%, (143) según la zona estudiada. La transmisión congénita de *T. cruzi* oscila entre 0,7% y el 10%, según diversos autores (86, 141, 144, 145). No se conocen bien los mecanismos de esta baja incidencia de transmisión (136), pero los factores de riesgo que pueden participar son, entre otros, la edad materna, tener un hermano con infección congénita, lugar de procedencia, número de gestas, sexo, edad gestacional. (97, 98, 146, 147) En esta tesis analizamos: edad materna, lugar de procedencia, número de gestas, sexo, edad gestacional, forma de terminación del parto, APGAR e índice placentario. Freilij, (94) propone que la ausencia de manifestaciones clínicas y electrocardiográficas en las embarazadas que transmiten el *T. cruzi* a su descendencia podría deberse a que la edad de mayor fertilidad es inferior a los 30 años, mientras que la aparición de los trastornos cardiológicos en la enfermedad de Chagas se evidencian generalmente a partir de los 40 años. De igual forma las pacientes embarazadas que integraron nuestra serie de estudio no presentaron signos ni síntomas atribuibles a la infección chagásica con una edad promedio de 28,36 años para el grupo ChnoC y 28,38 años para ChC, (figura 13) que sólo por el laboratorio de rutina de su embarazo dan cuenta de la enfermedad. De las 72 pacientes con serología positiva para Chagas ninguna presentó signos o síntomas de complicaciones cardiovasculares o digestivas atribuibles a la enfermedad de Chagas. Nuestro estudio es válido por consi-

guiente para la población de RN de embarazadas chagásicas en fase indeterminada de la enfermedad. Tampoco presentaban patologías propias del embarazo como diabetes e hipertensión arterial, siendo por consiguiente una población homogénea para los objetivos de esta tesis.

El riesgo de infección por *T. cruzi* está directamente relacionado con la pobreza (60). Respecto a la distribución de los pacientes infectados chagásicos, el cambio en el mapa de dispersión de la enfermedad ha hecho que en la actualidad prácticamente la mitad de los mismos resida en las grandes ciudades, muchos de ellos en asentamientos irregulares donde las condiciones de pobreza y marginalidad se perpetúan (148, 149). Nuestra realidad no es ajena a estos conceptos y es así que en este estudio llevado a cabo en maternidades de nuestra ciudad, la población estaba conformada por pacientes provenientes de áreas endémicas y de áreas no endémicas. Sin embargo no hubo diferencias según procedencia entre los casos con transmisión congénita y los no congénitos; ya que el 49% de los casos provenían de áreas endémicas (Bolivia, Santiago del Estero y región NO de Córdoba), mientras que el otro 51% vivían en Córdoba, departamento Capital y en sus historias clínicas no se registraban domicilios previos ni otros datos como transfusiones de sangre. Las diferencias regionales en las tasas de incidencia han sugerido diferencias geográficas en la transmisión congénita (Freilij 1994). Nuestra población de estudio no demuestra diferencias entre áreas endémicas y no endémicas. La importancia de la endemidad como factor de riesgo para la transmisión vertical, puntualmente no ha sido analizada como otro factor epidemiológico, por lo que nuestros datos sugieren que las diferencias geográficas descritas en la bibliografía probablemente pueden estar debidas a diferencias constitucional-genéticas de las poblaciones. Este aspecto se confirma con el trabajo de Sánchez-Negrette y col., (147) realizado en área no endémica en el cual encuentran familias transmisoras de *T. cruzi* y al mismo

tiempo señala como un factor de riesgo a tener en cuenta la presencia de un hermano con esta parasitosis. Nuestro estudio conjuntamente con la bibliografía indica que el huésped juega un rol importante y que las diferencias geográficas en la incidencia del Chagas congénito no se deben a diferencias en la procedencia de la embarazada. Sin embargo, la permanencia en el área endémica puede implicar reinfecciones de la embarazada con posibles aumentos de la parasitemia y aumento teórico de la posibilidad de transmisión vertical (98). De acuerdo a un trabajo de Torrico y col., (89) las reinfecciones participan en la infección congénita, pero según Moretti y col., (91) no se detectó infección del RN en un caso de Chagas agudo con alta parasitemia. Estos datos abren una nueva perspectiva relacionada con la transmisión vertical de la enfermedad y que puede tener mecanismos diferentes a la sola elevación de la parasitemia. En conclusión la procedencia no participaría en la transmisión congénita, dando más relevancia a las características del huésped. De esta forma se plantea la necesidad de proponer nuevos estudios que determinen mecanismos precisos por los que las reinfecciones y la parasitemia actuarían; mecanismos que a la luz de nuestras conclusiones serían semejantes en las áreas endémicas y no endémicas.

La literatura evalúa como otro factor de riesgo, la edad materna, así como el número de gestas, indicando que mujeres jóvenes y con menor cantidad de gestas tienen una mayor incidencia de recién nacidos con Chagas congénito (87, 150). En nuestra serie, la media de edad de las madres fue semejante en ambos grupos (ChC y ChnoC), y el 71% de todas ellas tenían más de una gesta. Nuestra estadística, no mostró diferencias significativas entre los grupos que transmitieron Chagas congénito y en el que no se produjo la transmisión vertical, manteniéndose las características de multiparidad para el grupo mayormente afectado por la parasitosis. Nuestros datos difieren de lo aportado por la Dra. Bittencourt (98) en Brasil, y tal vez sea debido a dife-

rencias regionales, pero se encontrarían en concordancia con los datos de Azogue, (97) en Bolivia a partir de sus estudios: madres – familias transmisoras. Se han propuesto la edad y número de gestas como factores de riesgo, al mismo tiempo que se postula que ambos factores pueden actuar a través de la parasitemia, ya que ésta va declinando en la evolución natural de la enfermedad y por lo tanto la posibilidad de parasitemias mayores en mujeres jóvenes con pocos números de gestas sea mayor. (136) Nuestro estudio no analizó la parasitemia de las embarazadas, pero sí las edades de las gestantes que transmitieron y no transmitieron la infección al recién nacido, así como el número de gestas y no hubo diferencias entre ambos grupos. Estos resultados no nos permiten obtener conclusiones sobre este tema, pero el análisis del mismo permitiría caracterizar grupos de riesgo. Una explicación posible sería que nuestra población proviene predominantemente de las regiones centro y centro-oeste de la Argentina. Debido a que se han descrito severidades diferentes del Chagas congénito en distintas regiones de América (98), sería necesario un estudio multicéntrico con estratificación en áreas geográficas que analicen y otorguen especificidad a la edad materna y al número de gestas como posibles factores de riesgo.

En cuanto a la forma de terminación del embarazo, y si la misma depende de la transmisión vertical del *T. cruzi* al feto intraútero, es un aspecto no analizado por otros autores. En nuestra serie sólo tres casos de la población estudiada requirieron de la realización de una cesárea. Todos los demás nacimientos sin transmisión (n= 63) y con transmisión vertical (n= 6) fueron mediante parto natural. De acuerdo a nuestros datos, la etapa indeterminada del Chagas en la embarazada no constituye una indicación formal de cesárea para finalizar el embarazo.

Analizando la relación entre enfermedad de Chagas congénito y peso de los RN, nuestro estudio evidencia que los neonatos cuyas madres presen-

taron serología positiva pero sin transmisión vertical tuvieron un peso adecuado para la edad gestacional. En cambio, de los 9 casos congénitos que presentamos 6 nacieron a término con un caso de bajo peso y 2 fueron prematuros con pesos inferiores a 2500 g (figura 17). En relación a los RN en la Argentina, existe un bajo índice de prematuridad (151, 152, 153). En la gran mayoría de los niños con enfermedad de Chagas congénita el ECG y la Rx de tórax no presentan alteraciones (153, 154). Lugones y col., (155) tampoco encuentran mayor frecuencia de prematuros en los casos de enfermedad de Chagas congénita, y señalan a la hepatoesplenomegalia como el signo más común. Para nuestra provincia, Moya y col., (156) presentaron series de estudios con RN con transmisión congénita asintomáticos, a diferencia de lo observado en Bahía, Brasil (150) con una mayor severidad de la transmisión vertical. En nuestro estudio y ya desde el punto de vista clínico, 3 de los 9 RN con diagnóstico de ChC nacieron antes de las 38 semanas con ictericia y 2 de ellos completaron su cuadro clínico con hepatoesplenomegalia y anemia.

De acuerdo a la evolución natural de la enfermedad luego de la infección, el feto puede sufrir alteraciones en su viabilidad y/o en su crecimiento, dependiendo del momento en el que suceda la parasitación. Están descriptos como consecuencia de la enfermedad de Chagas congénita: aborto espontáneo, nacimiento prematuro, y mortinatos (136) aunque un buen número de RN se presentaron asintomáticos. Se ha hallado lesión del trofoblasto en RN prematuros y de bajo peso por causas no chagásicas (157). Maythew (158) y posteriormente Crocker (159) explicitan que cuando el STB sufre daños o se produce una perturbación en la condición de renovación normal se altera el recambio celular y esto se asocia a embarazos anormales. En este sentido el análisis de las placentas de archivo utilizadas en nuestra investigación puso de manifiesto alteraciones estructurales en aquellas placentas pertenecientes a RN con transmisión vertical de la enfermedad, en donde se observan zonas

de desprendimiento del STB y agrupamientos del CTB, como datos no descritos en la bibliografía. Otros parásitos protozoarios como el Plasmodium sp producen también alteraciones estructurales del STB que origina zonas de necrosis en el tejido placentar (160). El desprendimiento del STB y agrupamientos de CTB indican una alteración en la renovación normal del trofoblasto vellositario. (11) El hecho de que el trofoblasto placentario sea un epitelio que se renueva constantemente, promueve la idea de un equilibrio dinámico entre los compartimentos de citotrofoblasto y sinciciotrofoblasto. La relación entre citotrofoblasto y sinciciotrofoblasto en una placenta normal en el tercer trimestre es de 1:9; cualquier alteración en la proliferación o fusión del citotrofoblasto o pérdida del sinciciotrofoblasto, nos producirá perturbaciones en el volumen y grosor del trofoblasto (159). Se han descrito estas alteraciones del trofoblasto en placentas pertenecientes a RN con bajo peso, preeclampsia y restricción del crecimiento intrauterino, signos que también han sido descritos en el Chagas congénito en un 20% de los casos (94). El 66% de los recién nacidos con diagnóstico de ChC que forman parte de nuestra investigación, nacieron a término. De ellos, el 77% presentaron peso adecuado para la edad gestacional, fueron asintomáticos y con puntaje de APGAR por encima de 7 al momento de nacer, lo que permite valorar el estado fisiológico y la reactividad de los neonatos, y por ende su probabilidad de sobrevivir. El 33% restante, fueron pre-término, dos de ellos tuvieron bajo peso al nacer, y todos presentaron ictericia atribuible al diagnóstico de ChC. En nuestro estudio fue significativa ($p < 0,05$) la diferencia de peso entre quienes nacieron con ChC en relación a quienes no desarrollaron la enfermedad. Las alteraciones del trofoblasto halladas pueden ayudar a explicar dichos signos en la transmisión de la embarazada a su hijo.

El crecimiento del feto depende de los factores que actúan sobre las madres y fundamentalmente de la placenta para su nutrición y crecimiento

in útero; es así que el peso y la talla del RN son buenos indicadores del desarrollo intrauterino. El índice placentario (IP) resulta de la relación entre el peso de la placenta sobre el peso del RN y es un coeficiente que se ha usado como un elemento más de pronóstico en el examen perinatal (5). Referido a su verdadera importancia pronóstica y a las correlaciones encontradas a partir del índice placentario, éste señala la relación entre el desarrollo placentario y el fetal. Se encuentra aumentado en pre-eclampsia, incompatibilidad Rh, sífilis, toxoplasmosis y citomegalovirus. En las pacientes pre-eclámpicas y en las fumadoras se cree que el aumento del IP sería como mecanismo compensatorio a la hipoxia crónica, esto llevaría a un retardo en la multiplicación celular y por ende a un menor desarrollo fetal (5). El análisis y la comparación con el peso fetal de los casos con diagnóstico de ChC estudiados determinaron un IP de 0,21 siendo el valor considerado normal 0,15. Trabajos recientes relacionan el IP con poblaciones de diferentes orígenes y encuentra modificaciones del mismo dependiendo de la raza y de patologías como diabetes y pre-eclampsia (137). Nuestra población de embarazadas chagásicas proviene geográficamente en su mayoría de Argentina y es por lo tanto relativamente homogénea en cuanto a la procedencia. El IP representa una elevación sobre los valores considerados normales. Aunque las alteraciones placentarias de los grupos ChC y ChnoC no repercuten en diferencias de peso entre las mismas y con las placentas de embarazos normales y el peso de los RN, la relación ente cada RN y su placenta es un factor que sí se modifica (IP). Dado que las dos variables (peso placenta y peso RN) son de fácil realización y sin costos, podría representar un estudio sencillo de gran valor en RN nacidos de embarazadas chagásicas para la búsqueda específica del *T. cruzi* en esos RN. Esto se realizará mediante otros tests específicos pero de mayor dificultad técnica como el microhematocrito, hemocultivo o xenodiagnóstico (162, 163).

La puntuación de APGAR, es un método clínicamente útil para valorar el estado fisiológico y la reactividad del neonato (118). En nuestra serie, los RN con Chagas congénito de pre-término fueron los que manifestaron mayor compromiso del estado general en cuanto al cuadro clínico, si a este dato lo relacionamos a la puntuación de APGAR. Estos niños tuvieron en proporción los valores más bajos con un puntaje de APGAR inferior a 7 al momento de nacer pero a los 5 minutos el score era normal. Los demás niños chagásicos a término presentaron puntuación de APGAR superior a 7. Se sugiere por lo tanto que la baja puntuación de APGAR pareciera relacionarse a la prematurez y no a la condición de poseer la enfermedad. Se ha descrito una alta frecuencia de nacimientos prematuros entre casos infectados congénitamente (90). También se afirma que existe una muy alta asociación de infección en prematuros cuando se compararon RN maduros (8,7%) y prematuros (50%) de madres serológicamente positivas para Chagas (147). El bajo peso del RN es otro factor de riesgo, independiente de la edad gestacional, para la infección congénita del Chagas (136). Los únicos tres casos con bajo peso y prematurez tuvieron infección congénita y sus placentas presentaron alteraciones microscópicas mayores tales como necrosis colicuativa, desprendimiento de trofoblasto, nudos sinciciales, además de calcificaciones, edema y fibrinoide, alteraciones que no se presentaron con esa severidad en las placentas de los RN congénitos a término. Cabe especular por consiguiente que la asociación entre prematurez y transmisión vertical del *T. cruzi* dependen del momento en que ocurre la transmisión y apoyado por la severidad de las alteraciones placentarias. Para apoyar esta sugerencia se ha observado que en un estudio sobre nacidos muertos y mortinatos, la mayor frecuencia de transmisión ocurrió entre las semanas 22 a 26 (98) y que en otro estudio en Bolivia en el cual se analizaron nacidos vivos, la transmisión ocurrió entre las semanas 26 a 37 (164). La mayor severidad de alteraciones microscópicas

placentarias en los casos de prematuros con infección congénita y el APGAR disminuido al primer minuto, en relación a los RN congénitos a término con alteraciones placentarias mínimas y APGAR normal de nuestro estudio pueden sugerir que las diferentes modalidades de presentación del Chagas congénito ocurriría en relación a la etapa del embarazo en el cual se produce la infección transplacentaria, y no por la ubicación geográfica de las madres, debido a que como mencionamos previamente en nuestra serie la procedencia no constituyó un determinante en la transmisión congénita. En apoyo de esta conclusión se ha observado infección masiva por *T. cruzi* de las placentas con importante proceso inflamatorio en nacidos muertos de embarazadas chagásicas (165). El motivo de las diferencias en la edad gestacional para la transmisión pudiera depender de la constitución materno-placentaria y de la forma de producir agentes trypanocidas por parte de la placenta humana. El puntaje de APGAR por consiguiente no es un valor diagnóstico ni pronóstico de la enfermedad congénita de Chagas, según nuestros datos, pero se sugiere en este trabajo que las diferencias de infección en cuanto a edad gestacional puede depender de la forma de reacción de la placenta, tales como las de producción de agentes trypanocidas, entre los que se destaca el óxido nítrico.

Se han descrito varias rutas por las cuales el *T. cruzi* pudiera acceder al feto en las embarazadas con parasitemia. A través de la barrera placentaria (98) y por la placa coriónica mediante vía hematógena sin intervención del trofoblasto (108, 112, 136). El mecanismo preciso no es bien conocido todavía (136), pero el *T. cruzi* (*trypomastigotes*) circulante en la sangre materna en los espacios intervillosos placentarios penetran el trofoblasto. Se diferencian a amastigotes con multiplicación principalmente en las células de Hofbauer. La ruptura de los nidos de amastigotes (seudoquistes) expande la infección y pueden provocar reacción inflamatoria y necrosis de la vellosidad corial. Los trypomastigotes viables luego pueden invadir otras células y alcan-

zar la circulación fetal conduciendo a la infección congénita (98). No se conocen en forma precisa los mecanismos de la baja incidencia del Chagas congénito ni los mecanismos por los cuales la barrera placentaria previene la infección fetal. Estudios *in vitro* han demostrado que agentes presentes en la fracción lisosomal pueden restringir la propagación del parásito en la placenta (100), que la reproducción del parásito en la placenta es escasa (166) y que agentes placentarios son deletéreos para la célula parasitaria (104), incluso en forma diferencial dependiendo de la cepa del *T. cruzi* (167), Esto sugiere la existencia de agentes placentarios deletéreos contra el parásito que pudieran participar como barreras contra la infección.

Los estudios *in vitro* demuestran una significativa disminución del área del parásito en el tejido placentario con respecto al control, lo que sugiere que la interiorización y ciclos de reproducción en las vellosidades coriales, están severamente disminuidos. Estos datos concuerdan con la muy disminuida viabilidad de la célula parasitaria en el medio de cultivo, en el cual no hay parásitos vivos a las 72 hs de cultivo. Dado que el óxido nítrico ha sido descrito como tripanocida (133) involucrado en la fisio-patogénesis de la enfermedad de Chagas en corazón (168) y que la placenta posee dos de las tres isoformas que forman este gas (169) medimos nitritos, como indicador del óxido nítrico producido *in vitro*. Se establece así, una relación entre la disminución de viabilidad del *T. cruzi* con el aumento de los niveles de nitritos (figura 5). La transmisión del *T. cruzi* al feto ha sido descrita cuando los parásitos fueron identificados en el cordón umbilical y membranas extraplacentarias (164), pero pudo estar ausente cuando el trofoblasto y la vellosidad coriónica estaban parasitadas (94, 98, 116). Nuestros resultados *in vitro* apoyan estos datos donde los componentes normales de la barrera placentaria son capaces de limitar la infección por el *T. cruzi* mediante agentes presentes en la placenta y/o en el medio ambiente placentario.

La detección de las enzimas productoras del óxido nítrico, las Óxido Nítrico Sintetasas III y II han sido localizadas en las placentas humanas (169, 170, 171). La isoforma que predomina a nivel del trofoblasto durante la gestación es la tipo 3 o endotelial; pero tanto la localización de la isoenzima como su intensidad varía a lo largo de las gestaciones normales (50) interpretándose esto como mecanismo de adaptación a los requerimientos fetales. La isoenzima 2 o inducible (iNOS) se expresa fundamentalmente a nivel uterino (decidua), sin variar sus concentraciones a lo largo de la gestación normal (54). La expresión de eNOS en nuestras placentas normales mostró localización a nivel del citoplasma del trofoblasto, del endotelio de los vasos fetales en el interior de la vellosidad corial de manera uniforme en el STB en la mayoría de las vellosidades, y con una intensidad fuertemente positiva, en concordancia con la bibliografía (172). La expresión en las células deciduales fue casi negativa.

La localización de eNOS en las vellosidades coriales de las placentas chagásicas no tuvo diferencias con la de las placentas normales, ya que hubo marcación positiva en el STB y vaso fetal, independientemente si las placentas provienen de ChC o de ChnoC. Sin embargo en las placentas ChC la marcación fue discontinua y más apical en el STB, indicando un aparente cambio de ubicación intracelular de la enzima, y no hubo diferencias entre los prematuros y los nacidos a término. Se ha descrito que la eNOS sufre cambios de ubicación intracelular entre caveolas y citoesqueleto y aparato de Golgi, que pueden repercutir en la actividad de la misma (173). Las placentas de madres que transmitieron la infección al feto, además del cambio intracelular, manifestaron una disminución marcada en la expresión de la enzima según los datos que se obtuvieron al analizar la intensidad de la misma, siguiendo la técnica y el score de García y col. (134). Para placentas humanas, esto podría repercutir en una menor y severa disminución en la producción de óxido nítri-

co, por los dos motivos expuestos, el cambio intracelular y la disminución proteica de la NOS, evaluada por inmunohistoquímica. El óxido nítrico, producto de la NOS, es un gas con variadas funciones en el embarazo: regulación del tono muscular vascular, inflamación, inmunidad y coagulación (40), y la menor producción teórica de ON podría estar repercutiendo en sus funciones placentarias y fundamentalmente, no se estaría cumpliendo la actividad trypanocida en estas placentas como fue demostrado *in vitro* en placentas normales. (167) Dado que estas placentas corresponden al grupo que transmitió la infección al feto, se puede sugerir una asociación entre la disminución de la enzima con la transmisión vertical del *T. cruzi*.

Las placentas ChnoC manifiestan expresión de eNOS con similar localización pero menor intensidad que las placentas normales. La marca fue discontinua en la vellosidad corial, tanto en STB como en los vasos fetales, de localización principalmente citoplasmática de manera similar a las placentas normales. La intensidad de expresión de la proteína fue muy positiva a positiva y por lo tanto menor que en las placentas normales. Estas placentas por lo tanto expresaron la eNOS en forma más discontinua y con menor intensidad que las placentas normales, indicando un cambio enzimático determinado posiblemente, por la condición chagásica materna, es posible inferir esta conclusión debido a que este grupo de embarazadas no manifestaba entre sus antecedentes otra situación patológica como se mencionó anteriormente. Se han descrito modificaciones en la expresión de la eNOS en placentas en otras situaciones mórbidas, tales como diabetes e hipertensión de la embarazada. (169) También se ha observado mediante inmunohistoquímica y RT-PCR que las placentas de madres diabéticas presentan un aumento de la isoforma endotelial de la Óxido Nítrico Sintasa, pero una disminución de la misma en las placentas de pre-eclampsia. Sin embargo Shaamash y col., (174) encontraron un aumento de la enzima en pre-eclampsia. Estas modificaciones de la

enzima sugieren un cambio adaptativo de la placenta ante la elevada resistencia vascular, para favorecer el flujo sanguíneo en la placenta. Las diferencias de expresión de la eNOS en la misma situación nosológica hallados por diferentes autores pueden deberse a diferentes períodos del proceso de adaptación placentaria. El presente trabajo reporta por primera vez cambios en la enzima placentaria productora del óxido nítrico, el principal agente trypanocida en la enfermedad de Chagas que pudiera representar adaptaciones de la placenta ante la presencia del *T. cruzi* en la sangre materna o el cambio inmunológico materno (74, 175). Se desconocen actualmente si los cambios en los niveles de ON repercuten en posibles modificaciones funcionales en las placentas humanas en gestantes con enfermedad de Chagas. Nuestros datos sugieren la necesidad de realizar estudios tales como ecografías doppler en las embarazadas chagásicas destinados a identificar alteraciones en el flujo sanguíneo placentario derivadas de los cambios en la producción de óxido nítrico.

Tanto la continuidad de marca como la intensidad de eNOS fueron mayores en las placentas ChnoC (positivo o muy positivo) con respecto al grupo ChC (discontinuo y débilmente positivo). Estos hallazgos representan presencia de la proteína enzimática y por lo tanto la posibilidad de producir ON. Desde el primer caso comprobado de transmisión vertical en Venezuela por Dao (80), se han descrito diferentes signos clínicos en el Chagas congénito, entre ellos prematuridad, abortos, restricción de crecimiento intrauterino y bajo peso del RN (94), aunque la mayoría de los nacimientos son asintomáticos (108). Se ha observado disminución de la NOS en placentas de embarazos con restricción de crecimiento fetal intrauterino por causas no chagásicas (176). En nuestras placentas hemos detectado disminución de la NOS en los 5 órganos analizados, proviniendo dos de ellas de nacimientos prematuros y las otras tres de nacimientos a término con RN de peso normal. La disminución de

expresión de la eNOS por lo tanto tiene relación con la transmisión vertical pero no tendría asociación con algunos signos clínicos del Chagas congénito. Sin embargo no se descarta que posibles modificaciones de NOS en placentas chagásicas asociadas a otras alteraciones no analizadas en nuestro material permitan explicar algunos signos clínicos descritos en el Chagas congénito, tales como abortos y retardos en el crecimiento intrauterino del RN (97).

eNOS dio escasa reacción en decidua de nuestras placentas normales con muy escasas células marcadas positivamente en forma discontinua. Sin embargo, se apreció localización de la enzima en el citoplasma de muchas de las células deciduales presentes en las placentas provenientes de embarazadas chagásicas que no transmitieron la infección a la descendencia (ChnoC). Esta expresión en decidua en este grupo fue más continua y con mayor intensidad lo que pudiera compensar la reducción de eNOS detectada a nivel de las vellosidades coriales. El aumento de expresión de la enzima no se presentó en la decidua del grupo que transmitió la infección fetal (ChC), y que presentó por consiguiente una marcación discontinua y débilmente positiva semejante a la de las placentas normales. La posible compensación en la producción de ON entre vellosidades coriales y decidua que se apreció en ChnoC, no se presentó en el grupo ChC, con disminución importante de expresión de la NOS tanto en vellosidades como en decidua, lo cual posibilitaría la transmisión de la infección fetal. Se han detectado cambios en la expresión de la NOS en vellosidades y decidua en otras patologías, que pudieran sugerir procesos de compensación en la producción de ON (169, 177, 178). Según nuestros resultados en vellosidades coriónicas y decidua, las modificaciones halladas en la expresión de NOS podrían participar en la transmisión congénita intraútero a través de la placenta, pero no a través de otros mecanismos descritos en la transmisión vertical como el canal de parto o la placa coriónica (136).

Las placentas humanas expresan la isoforma inducible de la NOS (178, 179, 180). Nosotros pudimos detectar la presencia de iNOS aunque en su mínima expresión en las placentas normales. iNOS es calcio independiente y se expresa por inducción de citoquinas entre otros factores, principalmente en macrófagos (181). El trofoblasto y otras células placentarias de estirpe macrofágica expresan diferentes citoquinas, entre ellas las correspondientes al sistema pro-inflamatorio como IF-gamma y TNF-alfa que son potentes inductores para la producción de ON a través de la iNOS (182). La presencia del *T. cruzi* en las placentas puede desencadenar una respuesta pro inflamatoria con diferentes grados de lesiones (9). Los antecedentes sobre la enfermedad y el papel protagónico del macrófago durante su fase aguda, mediado por óxido nítrico, así como el conocimiento de diversas cepas del parásito, han postulado a esta célula y al ON como claves en la relación hospedero-parásito, al menos experimentalmente (183). Dada la complejidad de esta interacción, cualquier alteración en la cantidad o calidad de la producción de citoquinas que dirigen la acción del fagocito puede ser indicador del desarrollo de evasión por parte del parásito y de la evolución de la infección a la fase crónica de la enfermedad (183). A nivel experimental en ratones infectados con *T. cruzi* se ha demostrado aumento de TNF-alfa en un estudio para analizar la transmisión vertical (184). Se ha propuesto que el ambiente proinflamatorio en las embarazadas se asocia a villitis con infiltrado de células macrofágicas y linfocitos T, necrosis del trofoblasto, presencia de *T. cruzi* y RN muertos (165). Nuestras placentas chagásicas ChnoC manifestaron una leve tendencia al aumento de iNOS con respecto a las placentas normales y a las ChC a nivel de las vellosidades coriales. En decidua la expresión de iNOS fue semejante en todos los grupos de placentas analizados. Nuestros datos apoyan una tendencia al aumento de ON por expresión y actividad de la isoforma inducible de la NOS en las placentas chagásicas sin transmisión

fetal de la enfermedad, de acuerdo a la leve tendencia al aumento de la enzima detectada por inmuno-histoquímica. Cabría esperar un aumento considerable de citoquinas e inducción de iNOS por los resultados de Altemani y col. (165), pero eso no ocurre en forma importante en nuestras placentas. Esta diferencia en los resultados obtenidos podría deberse a que todos nuestros RN nacieron vivos y las placentas no presentaron alteraciones histológicas de importancia ni se observaron nidos de parásitos. A los fines de ahondar en los mecanismos de la infección placentaria y fetal, sería importante investigar la expresión de NOS en las placentas de los casos con abundancia de parásitos, necrosis, macrófagos MAC387+, baja relación CD4+: CD8+ linfocitos T y RN muertos (165). La infección por *T. cruzi* de la madre induce la activación de los linfocitos T del feto in útero. Los linfocitos de los neonatos no infectados, nacidos de madre con enfermedad de Chagas produjeron factores proinflamatorios (IL-1, IL-6 y TNF) y anti-inflamatorios (IL-10 y TNF-receptor) en presencia de antígeno del parásito (110, 181). Esta modulación materna de la inmunidad innata podría tener efectos protectores, limitando la infección transplacentaria por activación de la iNOS. La tendencia al aumento en nuestras placentas ChnoC podría representar un mecanismo compensatorio deletéreo para el *T. cruzi*.

La alteración principal de las placentas chagásicas estudiadas se manifestó a nivel de la isoforma constitutiva de la NOS con disminución en las vellosidades de placentas sin transmisión fetal pero con aumento de expresión en la decidua con respecto a las placentas normales; y una importante reducción tanto en las vellosidades como en la decidua en las placentas de los casos congénitos. Es posible que el ligero aumento de iNOS en ChnoC, aumento no observado en el grupo ChC, permita compensar la producción de ON a nivel de las vellosidades, con el posible efecto parasiticida. Este fenómeno no se manifiesta en el grupo con transmisión congénita. Los experimen-

tos en ratones knockout con déficit en alguna de las isoformas de la NOS permitieron observar la expresión de una isoforma en la ausencia de otra (186, 187). Lo cual sería una posible explicación en nuestro material de estudio.

Bittencourt (98) propone en estudios clínicos y experimentales una mayor susceptibilidad del sexo femenino a la infección congénita por *T. cruzi*, confirmada por Azogue y Urioste (188) en Bolivia. En nuestra serie y dentro del grupo que transmitió ChC a la descendencia, 6 de los RN fueron sexo femenino y 3 de sexo masculino por lo que posiblemente el microclima hormonal imperante en el embarazo podría ser un factor más a considerar. En otras parasitosis el ambiente hormonal favorece el crecimiento del agente etiológico, por ejemplo en la malaria (*Plasmodium falsiparum*) (189) y en estudios in vitro con la *Entamoeba histolítica* (190). Se desconocen los mecanismos por los cuales se establece esta prevalencia por el sexo femenino, aunque cabría pensar en un factor hormonal, que no influye en el curso de la infección parasitaria sino que modularía el sistema inmune con el que interaccionan los parásitos. El hiperestrogenismo propio del embarazo explica un reclutamiento sistémico de la NOS endotelial, actuando sobre el sistema colinérgico (191).

Las modificaciones de la NOS en nuestro material placentario se asocian a la transmisión congénita de esta parasitosis, pero no a las alteraciones histológicas placentarias del Chagas descritas como no patognomónicas de la enfermedad (108), ni a otros rasgos epidemiológicos de las madres que integraron la serie de estudio tales como la procedencia, número de gestas, tiempo de gestación o forma de terminación del parto. Esta asociación refuerza el concepto de la preeminencia del huésped en la infección vertical del Chagas sobre la distribución geográfica u otros factores epidemiológicos postulados en la bibliografía (136, 147). Aunque no se descarta la influencia de la cepa del *T. cruzi* con sus diferencias biológicas. Así, se han descrito conductas diferentes según las cepas del *T. cruzi* en el am-

biente placentario, como también respuestas diferentes ante el estrés oxidativo por diferencias en la presencia de enzimas en las células parasitarias. (2009)

La capacidad de defensa inmunológica de la placenta para limitar la infección reproductiva del *T. cruzi* dentro del tejido placentario estaría disminuída, como ha sido demostrado in vitro con placentas normales. En nuestros estudios y a partir de las modificaciones de la expresión proteica de la NOS y su consecuente alteración en la producción de ON se pueden explicar los casos de transmisión congénita. La asociación de modificaciones en la expresión de la NOS con la transmisión congénita del *T. cruzi*, constituyen factores de riesgo para la transmisión vertical independientemente de los hallazgos epidemiológicos y refuerzan la interpretación de los datos hallados en esta tesis. En el grupo de placentas chagásicas que no transmitió la infección al RN (ChnoC), la disminución de expresión de eNOS en vellosidades, pudo verse compensada por el aumento en decidua y por leve aumento de iNOS, con posible producción de ON suficiente para limitar la infección por *T. cruzi*. En estudios in vitro se ha observado que se requiere de un mínimo de concentración de ON para que el mismo sea deletéreo contra la célula *T. cruzi* (133, 192), concentración que pareciera ser suficiente en las placentas que no transmitieron la infección a la descendencia, pero cuya producción pareciera ser insuficiente en las placentas con transmisión congénita.

El estudio de las isoformas de las óxido nítrico sintasas ha permitido reconocer características estructurales, funcionales y genéticas que las diferencian en sus múltiples localizaciones. Hoy, este grupo de enzimas aparece como un grupo filogenéticamente antiguo que ha ido adquiriendo diferentes aptitudes funcionales fenotípicas evolutivas.

Numerosas enfermedades pueden estar vinculadas a la inducción, cambios en los mecanismos de represión o en la activación-inactivación de los procesos intracelulares de trasmisión de señales, es así que el conoci-

miento de las óxido nítrico sintasas y sus propiedades trajo aparejado un progreso terapéutico en enfermedades tan dispares como los procesos neurodegenerativos, o la hipertensión arterial, entre otras. Los resultados hallados en este trabajo mediante los estudios in vitro y ex vivo demuestran que la NOS podrían participar en forma importante en la transmisión congénita del Chagas, y diseñar futuras investigaciones dirigidas a la prevención de esta forma endémica de enfermedad en Latino América, la enfermedad de Chagas congénita.

CONCLUSIONES

A lo largo de nuestro trabajo se evidenció un déficit en la sistematización de datos que refleja deficiencias estructurales en el sistema salud, las que no permiten adecuar medidas de acción pertinentes para la prevención y control adecuado de la población.

Las vellosidades coriónicas de la placenta humana normal no representan un tejido apto para la reproducción parasitaria. Siendo el *T. ON* un agente trypanocida.

El análisis de las placentas de archivo puso de manifiesto alteraciones estructurales en aquellas placentas pertenecientes a RN con transmisión vertical de la enfermedad, en donde se observan zonas de desprendimiento del STB y agrupamientos del CTB.

Se registró un índice placentario (IP) diferente al descrito como valor normal (0,15) en el grupo de estudio que transmitió la enfermedad en forma vertical ChC (0,21).

La incidencia de casos congénitos en nuestro estudio (12,5%) representa un alto porcentaje para la transmisión congénita de Chagas, influenciado posiblemente por las deficiencias estructurales del sistema de salud a la que hacíamos mención y por el mecanismo de búsqueda empleado.

La edad para las gestantes con enfermedad de Chagas que transmitieron la infección fetal fue compatible con la bibliografía. Las mismas se

encontraban en la etapa indeterminada de la enfermedad.

En nuestra estadística, no hubo diferencias significativas entre los grupos que transmitieron Chagas congénito y en el que no se produjo la transmisión vertical, analizando la paridad, manteniéndose las características de multiparidad para el grupo mayormente afectado por la parasitosis.

Las diferencias geográficas observadas en la población estudiada en relación a la endemidad pueden ser atribuidas a variaciones genéticas de los individuos que componen la muestra.

La marcación de NOS tuvo la misma localización en todos los grupos analizados a nivel de las vellosidades y la decidua placentaria. Las diferencias en la expresión inmuno histoquímica entre los grupos por lo tanto no están referidos a cambios en la ubicación tisular de la enzima.

La expresión de eNOS en vellosidades placentarias fue significativamente menor en ChC con respecto a las placentas normales y ChnoC. Este hallazgo permitiría sugerir que la menor producción de ON podría vincularse con la transmisión congénita del Chagas.

El aumento de marca positiva para eNOS en decidua en ChnoC, puede implicar un cambio adaptativo funcional ante la disminución de expresión en vellosidades. Esto sugiere que la decidua podría ser una posible vía de entrada del parásito debido a la ausencia de expresión compensatoria en el grupo que transmitió el Chagas congénito.

Nuestras placentas chagásicas ChnoC manifestaron aumento de la

iNOS con respecto a las placentas normales y a las ChC a nivel de las vellosidades coriales. Esto podría interpretarse como un aumento del ON ya que no se evidencia en este grupo (ChnoC) transmisión vertical de la enfermedad.

Las modificaciones de la NOS en nuestro material placentario se asocia a la transmisión congénita de la enfermedad, pero no a factores epidemiológicos asociados a la patología. Esta correlación refuerza el concepto de la preeminencia del huésped en la infección vertical del Chagas sobre la distribución geográfica u otros factores epidemiológicos.

Las modificaciones de la expresión proteica de la NOS y su consecuente alteración en la producción de ON hallada *in vitro* y con efecto deletéreo para el *T. cruzi*, pueden explicar los casos de transmisión congénita en nuestro grupo de placentas ChC. La disminución significativa de expresión de eNOS en vellosidades en placentas de ChC, podría representar una disminución severa en la producción de ON y en su función trypanocida en el medio ambiente placentario. Este mecanismo permitiría inferir que la capacidad de defensa inmunológica de la placenta sería un factor limitante para la infección reproductiva del *T. cruzi* dentro del tejido placentario, como ha sido demostrado *in vitro* con placentas normales. Es posible asociar modificaciones en la expresión de la NOS a la transmisión congénita y sostener el concepto que la situaciones epidemiológica no constituyen un factor de riesgo para la transmisión vertical de esta patología reforzando los hallazgos obtenidos en este trabajo de tesis. Finalmente es posible concluir que la NOS pudiera participar en la transmisión congénita del Chagas dando origen a estudios dirigidos a la prevención de esta patología endémica en Latinoamérica.

CAPÍTULO 5: BIBLIOGRAFIA

1. Boyd JD y Hamilton WJ (1970) The human placenta. Heffer Cambridge Book Review 365.
2. Benirschke K (1981) Anatomy. In: Berger GS, Brenner WE, Keith LG (eds) Second trimester abortion (Part II 4- The second trimester of Pregnancy. John Wrigth. PSG Inc, Boston, MA, 39-56.
3. Pritchard JA, MacDonald PC y Gant NF (1984) Williams obstetrician, 3ra edición, Texas, Ed. SALVAT 93-111.
4. Kliman JH (1998) From trophoblast to human placent. Enciclopedia of reproduction. Academia Press. Oxford. 83-100.
5. Rizzi R (1981) Indice placentario Córdoba: [s.n.]Tesis Solicitar por: T R-41.
6. Sadler TW (2001) Langman Embriología Médica con orientación médica clínica. Panamericana .8ª edición. Buenos Aires. 139.
7. Junqueira LC y Carneiro J (2000) Histología Básica. 5ª Ed. Masson.
8. Altshuler G y Hydee S (1996) Clinicopathologic Implications of Placental Pathology. Clinical Obstetrics and Gynecology. 39: 549-570.
9. Bittencourt AL (1976) Congenital Chagas disease Am J. Dis Child, 130: 97-103.
10. Pinjenborg R, McLaughlin P, Vercruyssen L, Hanssens M, Johnson P, Keith J, Van Assche F (1998) Immunolocalization of tumor necrosis factor a in the placental bed of normotensive and hypertensive human pregnancies. Placenta, 9: 231-239.
11. Huppertz B, Rote NS, Nelson DM, Reister F, Black S, Hunt JS (2001) Apoptosis: Molecular control of placenta function. Placenta, 22(15):101-103.
12. Bredt DS, Soregaroli M, Aiello S, Noris M, Donadelli R, Lojcono A, Benigni A (1990) Cloned and expressed nitric oxide synthase in the human placenta: regional distribution and proposed regulatory role at the feto-maternal interface. Placenta, 15:257-265.

13. Palmer RMJ, Moncada S (1989) A novel citrulline-forming enzyme implicated in the formation of nitric oxide by vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 59:348-352.
14. Kubes PM, Susuki M, Granger DN (1991) Nitric oxide: an endogenous modulator of leucocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci USA*, 88:4651-4655.
15. Benirschke K, Kaufmann P. (2000) *Pathology of the Human Placenta*, 4th ed. New York, Springer-Verlag.
16. Kaplan CG (1996) Postpartum examination of the placenta. *Clin Obstet Gynecol*. 39:535-548.
17. McDonald LJ, Murad F (1996) Nitric oxide and cyclic GMP signaling. *Proc Soc Biol Med*; 211(1):1-6.
18. Ignarro LJ (1990) Biosynthesis and metabolism of endothelium derived nitric oxide. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*; 30: 535.
19. Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncada S (1987) Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium - derived relaxing factor. *Nature*; 327: 524-526.
20. Rubany GM (1986) Flow-induced release of endothelium derived relaxing factor. *Am J Physiol*; 250:1145.
21. Mark AP (1997) Nitric oxide synthase inhibition impairs delayed recall in mature monkeys. *Pharmacol Biochem Behav*; 56:81-87.
22. Palmer RMJ, Ashton DS, Moncada S (1988) Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature (Long)*; 333: 664-666.
23. Remezal M (1994) Etiopatogenia endotelial de la hipertensión. *Rev Sistole*; 152:24-25.
24. Radi R (1996) Reactions of nitric oxide with metallo proteins. *Chem Res Toxicol*; 9: 828-835.
25. Knowles RG, Moncada S (1993) Nitric oxide as a signal in blood vessels. *Trends Biochem Sci*; 17: 399.

26. Denicola A, Souza J, Radi R, Lissi E (1996) Nitric oxide diffusion in membranes determined by fluorescence quenching. *Arch Biochem Biophys*; 208-212.
27. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA (1991) Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacological Revs*; 43:109-141
28. Sakuyama I, Stuehr DJ, Gross SS, Nathan C & Levi R (1988) Identification of arginine as a precursor of endothelium-derived relaxing factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 85, 8664-8667.
29. Mayer B, Schmidt K, Hubert P & Bohme E (1989) Biosynthesis of endothelium-derived relaxing factor: a cytosolic enzyme in porcine aortic endothelial cells Ca^{+2} dependently converts L-arginine into an activator of soluble guanylyl cyclase. *Biochem Biophys Res Commun* 164, 678-685.
30. Busse R & Mulsch A (1990) Calcium dependent nitric oxide synthase in endothelial cytosol is mediated by calmodulin. *FEBS Lett* 265,133-136.
31. Nathan C (1992) Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J* 6, 3051-3064.
32. McCall TB & Vallence P (1992) Nitric oxide takes centre-stage with newly defined roles. *Trends Pharmacol Sci* 13, 1-6.
33. Nathan C & Xie QW (1994) Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. *Cell* 78, 915-918.
34. Robbins RA, Hamel FG, Florean AA, Gossman GL, Nelson KJ, Belenky S & Rubinstein I (1993) Bovine bronchial epithelial cells metabolise L-arginine to L-citrulline: possible role of nitric oxide synthase. *Life Sci* 52,709-716.
35. Rees DD, Palmer RMJ, Hodson HF & Moncada S (1989) A specific inhibitor of nitric oxide formation from L-arginine attenuates endothelium-dependent relaxation. *Br J Pharmacol* 96,418-424.
36. Rees DD, Palmer RM, Schulz R, Hodson HF & Moncada S (1990) Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro

- and in vivo. *Br J Pharmacol* 101:746-752.
37. Muruganandam A, Mulus B (1994) Isolation of nitric oxide synthase from human platelets. *Biochem Biophys Acta*; 1200: 1201.
38. Rebeca J (1995) Nitric oxide. *Molecular medicine today*; 1(8): 358.
39. Garthwaite, J (1993) Nitric oxide signaling in the nervous system. *Sem Neurosci*; 5:171-180.
40. Forstermann U, Schmidt HHHW, Pollock JS, Sheng H, Mitchell JA, Warner TD, Nakane M & Murad F (1991) Isoforms of nitric oxide synthase. *Biochem Pharmacol* 42, 1849-1857.
41. Knowles RG (1994) Nitric oxide synthase in mamma *Biochem J* 298:249.
42. Chuman AJ, Krishma MT, Holgate ST (1996) A etiology of asthma:how public health and molecular medicine work together. *Molecular Med Today*; 2(5):192-197.
43. Bredt DS, Hwang PM & Zinder SH (1990) Localization of nitric oxide synthase indicating a neuronal roles for nitric oxide. *Nature* 347, 768-770.
44. Jorens PG, Van Overvel FJ, Bult H, Vetmeite PA & Herman A (1991) L-arginine-dependent production of nitrogen oxides by rat pulmonary macrophages. *Eur J Pharmacol* 200,205-209.
45. McCall TB, Palmer RM & Moncada S (1991) Induction of nitric oxide synthase in rat peritoneal neutrophils and its inhibition by dexamethasone. *Eur J Immunol* 21, 2523-2527.
46. Iijima H, Duguet A, Eum SY, Hamid Q & Eidelman DH (2001) Nitric oxide and protein nitration are eosinophil dependent in allergen-challenged mice. *Am J Respir Crit Care Med* 163,233-240.
47. Zanardo RCO, Costa E, Ferreira HHA, Antunes E, Martins AR, Munrad F & De Nucci G (1997) Pharmacological and immunohistochemical evidence for a functional nitric oxide synthase system in rat peritoneal eosinophils. *Proc Natl Acad Sci USA* 94, 14111-14114.

48. Asano K, Chee BE, Gaston B, Lilly CM, Craig G, Drazen JM & Stamler JS (1994) Constitutive and inducible nitric synthase gene expresión, regulation and activity in human lung epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 91, 10089-10093.
49. Redington AE, Meg QH, Springall DR, Evans TJ, Creminon C, Maclouf J, Holgate ST, Howarth JPH & Polar JM (2001) Increased expresión of inducible nitric oxide synthase and cyclo-oxygenase-2 in the airway epithelium of asthmatic subjets and regulation by corticosteroid treatment. *Thorax* 56, 335-336.
50. Winfried G, Rossmanith U, Hoffmeister, Wolfahrt S, Bernhard K, McLean M, Jacobs RA and Grossman AB (1999) Expression and functional analysis of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) in human placenta *Molecular Human Reproduction*, 5 (5): 487-494.
51. Tempfer C, Unfried G, Zeillinger R, Hefler L, Nagele F, Huber J, (2001) Endotelial nitric oxide synthase gene polymorphism in women with idiopathic recurrent miscarriage. *Human Reproduction*. 16:1644-1647.
52. Savvidou MD, Vallence P, Nicolaides K, Hingorani A (2001) Endotelial niric oxide synthase gene polymorphism and maternal vascular adaptation to pregnancy. *Hipertensión*. 38:1289-1293.
53. Gragea JP, Alexander BT, Llinas MT, Bennett WA, Khalil RA (2001) Phthophysiology of hypertension during preeclamsia linking placental ischemia with endotelial dysfunction. *Hypertension*. 38: 718-722.
54. Cummings KL and Tarleton RL (2004) Inducible Nitric Oxide Synthase is not essential from control of *Tripanosoma cruzi* infection in mice *Infection and Immunity*. 72, N° 7. 4081-4089.
55. Xia G, Sun Y (2001) Expression of apoptosis and inducible nitric oxide synthase in trophoblast in early spontaneous abortion. *CMJ*, 114:104-109.
56. Denis M (1991) Tumor necrosis factor and granulocyte macrophage-colony

- stimulating factor stimulate human macrophages to restrict growth of virulent *Mycobacterium avium* and to kill avirulent *M. avium*: killing effector mechanism depends on the generation of reactive nitrogen intermediates. *J Leukocyte Biol*; 49: 380-387.
57. Muñoz-Fernandez, MA, Fernandez MA, Fresno A (1992) Synergism between tumor necrosis factor -and interferon - on macrophage activation for the killing of intracellular *Trypanosoma cruzi* through a nitric oxide-dependent mechanism. *Immunol Letters*; 33: 35-40.
58. Wolf DJ, Vmansky (1994) The inhibition of the constitutive bovine endothelial nitric oxide synthase by imidazole and indazole agents. *Arch Biochem Biophys* 314:360-366.
59. Reif DW, McCreedy SA (1995) N-nitro-L-arginine and N-nanomethyl-L-arginine exhibit a different pattern of inactivation over the three nitric oxide synthases. *Arch Biochem Biophys*; 320:170-176.
60. OMS (2009)-62^a Asamblea mundial de la salud A62/17 Enfermedad de Chagas: control y eliminación. Ginebra. Suiza.
61. Schofield CJ, Jannin J, Salvatella R (2006) The future of Chagas disease control. *Trends Parasitol.* Dec; 22(12):583-588.
62. AVADS Chagas: Meta: eliminación de transmisión de Chagas para el año 2010.
63. Storino R (2000) "La cara oculta de la Enfermedad de Chagas". *Rev Fed Arg Cardiol.* 29(1):31-44.
64. WHO/TDR - World Health Organization (2006) Report of the Scientific Working Group on Chagas disease, Buenos Aires, Geneva, 7.
65. Mitelman J (2005) Chagas un compromiso moral permanente. *Revista Argentina de Cardiología* 73 (2): 135-136.
66. OMS (1991) Control de la Enfermedad de Chagas Ed. OMS Serie Inf. Tec. Nº 811; Ginebra. Suiza.
-

67. Levine ND, Corliss JO, Cox PEG (1980) A newly revised classification of the protozoa. *J Protozool*; 27: 37-58.
68. Steindel M, Kramer Pacheco L, Scholl D (2008) Characterization of *Trypanosoma cruzi* isolated from humans, vectors, and animal reservoirs following an outbreak of acute human Chagas disease in Santa Catarina State, Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis*; 60(1):25-32.
69. shikanai-Yasuda MA, Marcondes CB, Guedes LA (1991) Possible oral transmission of acute Chagas' disease in Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*; 33(5): 351-357.
70. Altech J, Moreno R, Freilij H, Mariani G, De Risso A, Alvarez M, Riarte A, Higa M, Pennisi A, Bulstein D, Ortiz de Zárate M, Angel S, Guarnera E; Fritsches C y Hirt J (1999) IV Infecciones perinatales parasitarias Arch. Argentinos de Pediatría. 97:103.
71. Gürtler RE, Segura EL, Cohen JE (2003) Congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* infection in Argentina. *Emerg Infect Dis*; 9(1): 29-32.
72. Santos FC, Amato NV, Gakiya E (2003) Microwave treatment of human milk to prevent transmission of Chagas disease. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*;45: 41-42.
73. Meyer h, De Souza W (1976) Electron microscopic study of *Trypanosoma cruzi* periplast in tissue cultures. I. Number and arrangement of the peripheral microtubules in the various forms of the parasites. *J Protozool*, 23: 385-390.
74. Carlier Y, Torrico F, Basso B, Moretti E, Moya P, Sartori MJ et al. (2003) Congenital infection with *Trypanosoma cruzi*: From mechanisms of transmission to strategies for diagnosis and control. *Rev Soc Bras Med Trop*; 36: 767-771.
75. Hoff R, Teixeira RS, Carvalho JS (1978) *Trypanosoma cruzi* in the cerebrospinal fluid during the acute stage of Chagas' disease *N Engl J Med*

- 16;298 (11) :604 -606.
76. Tanowitz HB, Kirchhoff LV, Simon D, Morris SA, Weiss LM and Wittner M. (1992) Chagas' disease. *Clin Microbiol Rev.* October; 5(4): 400–419.
77. Fretes RE, Paglini P, Fernández AR, Enders J, Fabro SP (1999) *Trypanosoma cruzi*: increased 5' nucleotidase activity associated with dysfunction adrenergic receptors in acutely infected albino Swiss mice. *J Parasitol*, 85 (5): 970-972.
78. Tarleton RL and Cummings KL (2003) Rapid quantitation of *Trypanosoma cruzi* in host tissue by real-time PCR. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 129:53-59.
79. Apt B, Werner, Heitmann G, Ingrid, Jercic L, M Isabel et al. (2008). Guías clínicas de la enfermedad de Chagas: Parte II. Enfermedad de Chagas en el adulto, la infancia y adolescencia. *Rev. Chil. Infectol.* 25 (3):194-199.
80. Howard JE (1957) Enfermedad de Chagas Congénita. *Bol. Chil. Parasitol.* 12:42.
81. Howard JE (1962) La enfermedad de Chagas congénita. Tesis de Doctorado. Universidad de Chile, Santiago, Chile.
82. Rezende JM (1959) Forma digestiva da moléstia de Chagas. *Rev Goiana Med* 5: 193-227.
83. Bittencourt AL (1959) Sobre la forma congênita de Chagas. Estudio anatomopatológico de seis casos. *Rev Inst. Méd. Trop. Sao Paulo*, 2 (6): 319-334.
84. Bittencourt AL, Barbosa HS, Santos I, Ramos MEA (1974) Incidencia da Transmissão congénita da doenças de Chagas em partos a termo. *Ver. Inst Méd Trop S Paulo*, 16: 197-199.
85. Schmuñis GA & Szarfman A (1977) La enfermedad de Chagas congénita. *Medicina. (Buenos Aires)*, 37: 47-53.

86. Torrico F, Alonso-Vega C, Suarez E, Rodriguez P, Torrico MC, Dramaix M, Truyens C & Carlier I (2004) Maternal Trypanosoma cruzi infection, pregnancy outcome, morbidity, and mortality of congenitally infected and non-infected newborns in Bolivia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 70:201-209.
87. Moya P, Basso B, Moretti E (2005) Enfermedad de Chagas congénita en Córdoba Argentina: aspectos epidemiológicos, clínicos, diagnósticos y terapéuticos. Experiencia de 30 años de seguimiento. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*; 38 (Supl 2):33–40.
88. Torrico F, Alonso-Vega C, Suarez E, Tellez T, Brutus L, Rodriguez P, Torrico MC, Schneider D, Truyens C & Carlier I (2006) Are maternal re-infections with Trypanosoma cruzi associated with higher morbidity and mortality of congenital Chagas` disease? *Trop. Med. Int. Health.* 2:628-635.
89. Bittencourt AL, Barbosa HS (1972) Incidência da transmissão congênita da doenças de Chagas em partos a termo. *Rev. Ins Med. Trop S Paulo* 14: 257-259.
90. Moretti E, Basso B, Castro I, Carrizo Paez M, Chaul M, Barbieri G, Canal Feijoo D, Sartori MJ, Carrizo Paez R (2005) Chagas' disease: study of congenital transmission in cases of acute maternal infection. *Rev Soc Bras Med Trop.* 38 (1): 53-55.
91. Delgado M; Santos-Buch C (1978) Transplacental transmisión and fetal parasitosis of Trypanosoma cruzi in outbred white Swiss mice. *Am J trop Med Hyg*, 27: 1108-1115.
92. Bittencourt AL, Sadigursky M, Silva A, Menezes CA, Marianetti MM, Guerra SC, et al. (1988) Evaluation of Chagas`s disease transmission through breast-feeding. *Mem Ins. Oswaldo Cruz.* 83: 37-39.
93. Freilij H, Altcheh J, and Sorino R, Miles J (1994) Chagas congénito. En *enfermedad de Chagas*, Ed. Doyma Argentina, 267-278.

94. Bittencourt AL (2000) Trasmisión Vertical da Doença de Chagas em *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. Eds Brener Z., Andrade Z.A. & Barral Netto M.2da ed Guanabara-Koogan, Rio de Janeiro. Brasil. 16-20.
95. Blanco SB, Segura EL, Gurtler RE (1999) Control of congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* in Argentina *Medicina (B Aires)* 59 Suppl II:138-42.
96. Fretes RE, Fabro SP (1994) Aumento de las células de Hofbauer en placentas humanas co cultivadas in vitro con *Trypanosoma cruzi*. *Rev Fac Cienc Méd Córdoba*, 52:55.
97. Azogue E (1993) Women and congenital Chagas` disease in Santa Cruz. Bolivia: epidemiological and sociocultural aspects. *Soc Sci Med*. 37: 503-511.
98. Bittencourt AL (1992) Posible risk factors for vertical transmisión of Chagas` disease. *Rev Ins Med Trop .San Pablo*, 34: 403-408.
99. Fretes RE, Fabro SP (1995) In Vitro analysis of lysosomes and acid phosphatase activity in human chagásicas placentas. *Exp Mol Pathol*, 63:153-160.
100. Fretes RE, Fabro SP de (1991) Quantitative ultraestructural and Ultracytochemical analysis of lysosomes in the trophoblast of human placentas at term. *Rev Fac Cienc Méd Córdoba*, 49:23-25.
101. Buttery LDK, McCarthy A, Springall DR, Sullivan MHF, Elder MG, Michel T, Polar JM (1994) Endothelial nitric oxide synthase in the human placenta: regional distribution and proposed regulatory role at the feto-maternal interface. *Placenta*, 15: 257-265.
102. Rottemberg M, Castaños Velez E, de Mezquita R, Vanguardia O, Biberfeld P, Örn A (1996) Intracellullar co-localization of *Trypanosoma cruzi* and inducible nitric oxide synthase (iNOS) evidence for dual pathway of iNOS induction. *Eur J Immunolo*, 26:3203-3213.

103. Frank MF, Sartori MJ, Asteggiano C, Lin S, Fabro SP de, Fretes RE (2000) The effect of placental subfractions on *Trypanosoma cruzi*. *Exp Mol Pathol*, 69: 144-151.
104. Fretes RE, Fabro SP (1990) *Trypanosoma cruzi*: modification of alkaline phosphatase activity induced by trypomastigotes in cultured human placental villi. *Rev Inst Med Trop*, 32 (6):403.
105. Sartori MJ, Lin S, Fretes RE, Ruiz Moreno L, Goldemberg L, de Fabro SP. (1997) Alkaline phosphatase activity in plasma of pregnant chagasic patients. *Rev Fac Cien Med Univ Nac Cordoba*. 55(1-2): 5-8.
106. Sarasúa W, Sanchez, M, Calegari A, Andrade E (1986) Chagas congénito. Placenta chagásica. *Rev. Méd Uruguay*; 2: 149-154.
107. Moya P, Villagra L, Risco J (1979) Enfermedad de Chagas congénita: hallazgos anatomopatológicos en placenta y cordón umbilical. *Rev Fac Cienc Med Univ (Córdoba)* 37:21.
108. Freilij H, Biancardi M. (2002) Enfermedad de Chagas Congénito Laboratorio de Parasitología y Enfermedad de Chagas. Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez. Buenos Aires, Argentina. Revisión bibliográfica.
109. Riera C, Guarro A. Kassab HE, Jorba JM, Castro M, Angrill R, Gállego M, Fisa R, Martin C, Lobato A, Portús M (2006) Congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* in Europe (Spain): a case report. *Am J Trop Med Hyg.*, 75:1078-1081.
110. Juliano PB, Blotta MH, Altemani AM (2006) ICAM-1 is overexpressed by villous trophoblasts in placentitis. *Placenta.*, 27(6-7):750-757.
111. Fernandez-Aguilar S, Lambot MA, Torrico F, Alonso-Vega C, Cordoba M, Suarez E, Noel JC, Carlier Y (2005) Las lesiones placentarias en la infección humana por *Trypanosoma cruzi*. *Rev Soc Bras Med Trop.*; 38 Suppl 2:84-86.

112. Truyens C, Mijhdi K, Lambot MA, Rivera MT, Noel JC, Carlier Y (2005) Efectos de la infección aguda y crónica por *Trypanosoma cruzi* en la gestación de los ratones. Laboratoire de Parasitologie, Faculte de Medecine, Universite Libre de Bruxelles, Belgium.
113. Fretes RE, Fabro SP de (1990) Human chagasic placenta: localization of enzymes associated to syncytiotrophoblast membrane. *Comun Biol*, 9:51.
114. Barcillos JM. (1960) Contribución a la patogenia de la enfermedad de Chagas congénita. Río de Janeiro. Facultad de Medicina. Tesis.
115. Bittencourt AL (1975) Aspectos anatomopatológicos da pele na doença de Chagas congênita. *Rev. Inst. Méd. Trop. Sao Paulo*. 17(3): 135-139.
116. Szarfman A, Urman J, Otalora A, Larguia A & Yanovsky JF (1975) Specific agglutinins and immunoglobulins levels in congenital Chagas infection. *Medicina (B. Aires)*. 35: 245.
117. Apgar V (1953) A proposal for a new method of evaluation of the newborn infant. *Curr. Res. Anesth. Analg.* 32 (4): 260–267.
118. Finster M, Wood M (2005) The Apgar score has survived the test of time. *Anesthesiology* 102 (4): 855-857.
119. Docampo R (1990) Sensitivity of Parasites to Free Radical Damage by Antiparasitic Drugs. *Chem.-Biol.Interactions* 73, 1-27.
120. Cançado JR (1999) Criteria of Chagas disease cure. *Mem. Inst.Oswaldo Cruz* 94 (Sup1), 331-336.
121. Andrade SG, Rassi A, Magalhães JB, Ferrioli Filho F, Luquetti AO (1992) Specific chemotherapy of Chagas' disease: a comparison between the response in patients and experimental animals infected with the same strains. *Trans.Roy.Soc.Trop.Med.Hyg.* 86, 624-626.
122. Sosa Estani S, Segura EL, Ruiz AM, Velazquez E, Porcel BM, Yampotis C, (1998) Efficacy of chemotherapy with benznidazole in children in the indeterminate phase of Chagas disease. *Am.J.Trop.Med.Hyg.* 59,526-529.

123. Sosa Estani S, Segura EL (1999) Treatment of *Trypanosoma cruzi* infection in the undetermined phase. Experience and current guidelines in Argentina. *Mem.Inst.Oswaldo Cruz* 94 (Sup.1), 363-365.
124. Silveira CAN, Castillo E, Castro C (2000) Avaliação do tratamento específico para o *Trypanosoma cruzi* en crianças, na evolución da fase indeterminada. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 33,191-196.
125. Solari A, Ortiz S, Soto A, Arancibia C, Campillay R, Contreras M, Salinas P, Rojas A, Schenone H (2001) Treatment of *Trypanosoma cruzi*-infected children with nifurtimox: a 3-year follow-up study. *J. Antimicrob. Chemother.* 48, 515-519.
126. Vila Petroff MG (2000). Rol y mecanismos subcelulares del óxido nítrico en la regulación de la contractilidad miocárdica. *Rev Fed Arg Cardiol* 29: 501-507.
127. Ferrer D, Fonseca C. (1999) Radicales Libres y su papel en la Homeostasia Neuronal. *Medisan* 3 (3): 5-11
128. Lanas A, Bajador E (2000) Nitrovasodilatadors, Low-Dose Aspirin, Other Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs, and the Risk of Upper Gastrointestinal Bleeding. *The New England Journal of Medicine* 343 (12): 834-839.
129. Reese H, Clark, MD, y colaboradores (2000) Low-Dose Nitric Oxide Therapy for Persistent Pulmonary Hipertensión of the Newborn. *The New England of Medicine* 342(7):469-474.
130. Escolar Castellón J (1998) Principios de Morfometría. Ed. Prensas Universitarias de Zaragoza. España. 21.
131. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tonnenbaum SR (1982) Analysis of nitrate and N¹⁵ nitrate in biological fluids. *Analytical Biochemistry*, 126:131-135.
132. Villalta F, Zhang Y, Bibb KE, Kappes JC, Lima MF (1998) The cysteine-cysteine family of chemokines RANTES, MIP-1alpha, and MIP-1beta indu-

- ce trypanocidal activity in human macrophages via nitric oxide. *Infect Immun.* 66(10):4690-4695.
133. García MG, Tirado-Gonzalez I, Handjiski B, Tometten M, Orsal AS, Hajos SE, Fernández N, Arck PC, Blois SM (2007) High expression of survivin and down-regulation of Stat-3 characterize the feto-maternal interface in failing murine pregnancies during the implantation period. *Placenta*; 28 (7):650-657.
134. Hyde TP, Dvorak JA (1973) *Trypanosoma cruzi* – Interaction with vertebrate cells in vitro: II quantitative analysis of the penetration phase. *Exp Parasitol* 34: 284-294.
135. Schijman AG (2007) *Congenital Chagas Disease Congenital and Other Related Infectious Diseases of the Newborn* Ilsa K. Mushahwar (Editor) Elsevier B.V. All rights reserved DOI 10.1016/S0168-7069(06)13012-18223.
136. Salafia CM, Misra DP, Yampolsky M Charles AK, Miller RK (2009) Allometric Metabolic Scaling and Fetal and Placental Weight *Placenta* 30 355–360.
137. Cunningham FG, Gant NF. (2001) *La placenta y las membranas fetales*. En: Williams. *Obstetricia*. 21^a ed. Cap 5. Editorial Panamericana; 72-91.
138. Behrman R, Kliegman R, Jenson H. Nelson (2005) *Tratado de Pediatría*. 17 Ed. Madrid, España: Elsevier.
139. Frade (2005) *El Paciente Chagásico en Zona Urbana: Chagas Agudo Connatal y Transfusional*. Federación Argentina de Cardiología.
140. Torrico F, Alonso-Vega C, Suarez E, Rodríguez P, Torrico MC, Dramaix M, Truyens C, Carlier Y (2005) Endemic level of congenital *Trypanosoma cruzi* infection in the areas of maternal residence and the development of congenital

141. Barousse A, Esposto M, Mandel S. (1975) Evolución sexológica de recién nacidos de madres chagásicas en área no endémica. *Medicina (Buenos Aires)* 35: 436-437.
142. Freilij H, Mülle C, Gonsales Cappa SM (1983) Direct Micromethod for diagnosis of acute and Congenital Chaga's Disease *J. Clin. Microb.* 18: 327.
143. Howard JE (1976) Clinical Aspects of Congenital Chagas Disease in American Trypanosomiasis Research PAHO scientific Publication 318; 212.
144. Schmunis GA (1994) American trypanosomiasis as a public health problem. In: "Chagas disease and the nervous system". 3- 29. PAHO. Washington DC.
145. Basombrio MA, Nasser J, Segura MA, Marco D, Sánchez Negrete O, Padilla M, Mora MC (1999) La transmisión de la enfermedad de chagas en salta y la detección de casos congénitos. *Medicina (Buenos Aires)* 59 (Supl II): 143-149.
146. Sánchez Negrette O, Mora MC, Basombrío MA, (2005) High prevalence of congenital *Trypanosoma cruzi* infection and family clustering in Salta, Argentina. *Pediatrics* 115: 668–672.
147. Kirchhoff LV (1993) American Trypanosomiasis (Chagas' disease). A tropical disease now in the United States *N Engl J Med* 329: 639-644.
148. Ghio T (2005) Nociones Básicas. Curso Intensivo sobre enfermedad de Chagas. Federación Argentina de Cardiología.
149. Bittencourt AL, Vieira G & Tavares HC (1984) Esophageal involvement in congenital Chagas' disease. Report of a case with megaesophagus. *Amer. J. trop. Med. Hyg.*, 33: 30-33.
150. Pehrson PO, Wahlgren M & Bengtsson E (1982) Intercranial calcifications probably due to congenital Chagas' disease. *Amer. J. trop. Med. Hyg.*, 31: 449-551.

151. Marchese C (1982) Infecciones agregadas a la gestación: enfermedad de Chagas. En Votta, R y col. *Obstetricia*. Ed. López Libreros Buenos Aires.
152. Votta RA, Parada OH, Marchese CA, Paton AA, Cervio MG, Tijan C. (1984) Enfermedad de Chagas durante el embarazo y el recién nacido (Resumen). *Enfermedad de Chagas. Aportes del Programa Nacional de investigación de Enfermedades Endémicas SECyT. Argentina.* 114.
153. Votta RA, Marchese CA, Sousa Martinez F et al (1974) La enfermedad de Chagas en la embarazada y en el recién nacido. *Rev Soc Obst Ginecol (Buenos Aires)*, 53: 56-68.
154. Lugones H, Ledesma O (1979) Enfermedad de Chagas en la embarazada y Chagas congénito. II Simposio Internacional de Enfermedad de Chagas (FLAP), Buenos Aires.
155. Moya P, Barousse A (1983) Enfermedad de Chagas congénita. Aportes del Programa Nacional de Investigación de Enfermedades Endémicas. SECyT Argentina.
156. Chan G, Hemmings DG, Yurochko AD, and Guilbert LJ (2002) Human Cytomegalovirus-Caused Damage to Placental Trophoblasts Mediated by Immediate-Early Gene-Induced Tumor Necrosis Factor. *American Journal of Pathology.* 161, No 4.
157. Maythew TM (2001) Villous trophoblast of human placenta: a coherent view of its turnover, repair and contributions to villous development and maturation. *Histol Histopathol*;16 (4):1213-1224.
158. Crocker IP, Tanner OM, Myers JE, Bulmer JN, Walraven G, Baker PN (2004) Syncytiotrophoblast degradation and the pathophysiology of the malaria-infected placenta. *Placenta*; 25: 273-82.
159. Walter PR, Garin Y, Blot P, (1982) Placental pathologic changes in malaria. A histologic and ultrastructural study. *Am J Pathol* 109: 330–342.

160. Crocker I (2007) Gabor Than Award Lecture 2006: pre-eclampsia and villous trophoblast turnover: perspectives and possibilities. *Placenta*. 28 Suppl A: S 4-13.
161. Guerreiro C, Machado A (1913) Da reação de Bordet e Gengou na moléstia de Carlos Chagas como elemento diagnóstico. *Brasil. Med.* 27:225-226.
162. Strout RG (1962) A method for concentrating hemoflagellates. *J. Parasitol.*; 48:100-108.
163. Azogue E, Darras C (1991) Prospective study of Chagas disease in newborn children with placental infection caused by *Trypanosoma cruzi* (Santa Cruz-Bolivia) *Rev Soc Bras Med Trop.* 24 (2):105-109.
164. Altemani AM, Bittencourt AL, Lana AM (2000) Immunohistochemical characterization of the inflammatory infiltrate in placental Chagas' disease: a qualitative and quantitative analysis. Vol 97:103. *Am J Trop Med Hyg.* 62(2):319-324.
165. Díaz Luján C, Triquell MF, Sembaj A, Guerrero CE, Fretes RE (2004) *Trypanosoma cruzi*: Production infection is not allowed by chorionic villous explant" *Experimental Parasitology.* 108 (3-4):176-181.
166. Triquell MF, Díaz Luján C, Freilij H, Paglini P, Fretes RE (2009) Placental infection by two subpopulation of *Trypanosoma cruzi* is conditioned by differential survival of the parasite in a deleterious placental medium and not by tissue reproduction. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 103 (10):1011-1018.
167. Postan M, Arnaiz MR, Fichera LE (1999) Respuesta de las células musculares cardíacas a la infección com *Trypanosoma cruzi*. *Medicina (Buenos Aires)*; 59 (Supl.II): 57-62.
168. Rossmannith WG, Hoffmeister U, Wolfahrt S, Kleine B, McLean M, Jacobs RA and Grossman AB (1999) Expression and functional analysis of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) in human placenta *Molecular Human*

- Reproduction, Vol. 5, No. 5, 487-494.
169. Baylis C, Beinder E, Mohaupt MG, Schlembach D, Fischer T, Sterzel RB, Lang N (1999) Nitric oxide synthase activity and Doppler parameters in the fetoplacental and uteroplacental circulation in preeclampsia. *Hypertens Pregnancy*; 18 (2): 115-127.
170. Myatt L, Brockman DE, Eis AL, Pollock JS (1993) Immunohistochemical localization of nitric oxide synthase in the human placenta. *Placenta*; 14 (5):487-495.
171. Myatt L, Eis AL, Brockman DE, (1997) Immunolocalization of the inducible nitric oxide synthase isoform in human fetal membranes. *Am J Reprod Immunol*; 38(4):289-294.
172. Zimmermann K, Opitz N, Dedio J, Renee C, Muller-Esterel W, Oess S. Nostrin: (2002) A protein modulating nitric oxide released and subcellular distribution of endothelial nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci USA*.; 99:17167-17172.
173. Shaamash AH, Elsonosy ED, Zakhari MM, Radwan SH, El-Dien HM (2001) Placental nitric oxide synthase (NOS) activity and nitric oxide (NO) production in normal pregnancy, pre-eclampsia and eclampsia. *Int J Gynaecol Obstet*.; 72(2):127-133.
174. Cardoni R; Antunez MI, Abrami A (1999) Respuesta TH1 en la infección experimental con *Trypanosoma cruzi* / TH1 response in the experimental infection with *Trypanosoma cruzi* *Medicina (B.Aires)*; 59(supl.2):84-90.
175. Dao LL (1949) Otros casos de enfermedad de Chagas en el Estado Guárico (Venezuela). Formas agudas y crónicas. Observación sobre enfermedad de Chagas congénita. *Revista Policlínica de Caracas*, 17: 17-32.
176. Schiessi B, Mylonas I, Hantschmann P, Kuhn C, Schulze, Susi Kunze S, Friese K and Jeschke U (2005) Expression of Endothelial NO Synthase,

- Inducible NO Synthase, and Estrogen Receptors Alpha and Beta in Placental Tissue of Normal, Preeclamptic, and Intrauterine Growth-restricted Pregnancies *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. Vol 53 (12): 1441-1449.
177. Di Paolo S, Volpe P, Grandaliano G, Stallone G, Schena A, Greco P, Resta L, Selvaggi L, Cincione R, Schena FP, Gesualdo L (2003) Increased placental expression of tissue factor is associated with abnormal uterine and umbilical Doppler waveforms in severe preeclampsia with fetal growth restriction. *J Nephrol*. 16(5):650-657.
178. Marinoni E, Di Lorio R, Lucchini C, Di Netta T, Letizia C, Cosmi EV (2004) Adrenomedullin and nitric oxide synthase at the maternal-decidual interface in early spontaneous abortion. *J Reprod Med*. 49(3):153-161.
179. Kakui K, Sagawa N, Itoh H, Yura S, Korita D, Takemura M, Nuamah MA, Fujii S (2003) Expression of nitric oxide synthase isoforms in the human placenta is not altered by labor. *Endocr J*. 50 (5):535-544.
180. Rajagopal M, Moodley J, Chetty R. *Acta Obstet Gynecol Scand*. (2003) Nitric oxide: does it have an etiological role in pre-eclampsia? 82(3):216-9
181. Hermann E, Truyens C, Alonso-Vega C, Rodriguez P, Berthe A, Torrico F, Carlier Y (2004) Congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* is associated with maternal enhanced parasitemia and decreased production of interferon-gamma in response to parasite antigens. *J Infect Dis*. 1;189 (7):1274-81.
182. Hauguel-de Mouzon S, Guerre-Millo M (2006) The placenta cytokine network and inflammatory signals. *Placenta*. 27(8):794-8.
183. Cárdenas Angelote ME, Torres Dueñas D, Pardo Cobos MJ (2000) Macrófago y Oxido nítrico en la tripanosomiasis Americana. *MedUNAB* 3 (7): 24-30.
184. Mjihdi A, Truyens C, Detournay O, Carlier Y (2004) Systemic and placental products of tumor necrosis factor contribute to induce fetal mortality in

- mice acutely infected with *Trypanosoma cruzi*. *Exp Parasitol* 107 (1-2):58-64.
185. Vekemans J, Truyens C, Torrico F, Solano M, Torrico MC, Rodriguez P, Alonso-Vera C, Carlier Y (2000) Maternal trypanosome cruzi infection upregulates capacity of uninfected neonate cells to produce pro-and inflammatory cytokines. *Infect Immun*, 68: 5430-5434.
186. O'Dell TJ, Huang PL, Dawson TM, Dinerman JL, Snyder SH, Kandel ER, Fishman MC (1994) J Endothelial NOS and the blockade of LTP by NOS inhibitors in mice lacking neuronal NOS. *Science*. ul 22;265(5171):542-546.
187. Huang PL, Huang Z, Mashimo H, Bloch KD, Moskowitz MA, Bevan JA, Fishman MC (1995) Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase. *Nature*. Sep 21;377(6546):196-197.
188. Azogue E, Urioste G (1985) Transmisión Congénita de la enfermedad de Chagas III Aspectos Clínicos y Anatomopatológicos del Recién Nacido *Bol. Científico del CENETROP*. Vol. XI único 21-30.
189. Dhangadamajhi G, Mohapatra BN, Kar SK, Ranjit M (2009) Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and *Plasmodium falciparum* infection in Indian adults. *Infect Immun*. 77(7):2943-2947.
190. Ramirez-Emiliano J, Flores-Villavicencio LL, Segovia J et al. (2007) Participación del óxido nítrico durante el desarrollo del absceso hepático amebiano. *Medicina (B. Aires)* 67(2):167-176.
191. Bhuiyan B, Murad F, Fant ME. (2006) The placental cholinergic system: localization to the cytotrophoblast and modulation of nitric oxide. *Cell Communication and Signaling*, 4:4-11.
192. Lima, MF, Villalta F (1988) Host-cell attachment by *Trypanosoma cruzi*: identification of an adhesion molecule. *Biochem Biophys Res Commun*. Aug 30; 155(1):256-262.

ANEXO

ANEXO 1

PUBLICACIONES EN REVISTAS CIENTIFICAS (TRABAJOS COMPLETOS Y ABSTRACTS)

Normal placental chorionic villi does not allow *Trypanosoma cruzi* productive infection in vitro. Diaz Luján C, Triquell MF, Sembaj A, Guerrero CE, Fabro SPde, Fretes RE *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 44: 84, 2002.

Trypanosoma cruzi: productive infection is not allowed by chorionic villous explant from normal human placenta in vitro. Diaz-Luján C, Triquell MF, Guerrero CE, Lin S, Fretes RE. *Exp Parasitol*, 108: 176-181, 2004.

In vitro ability of *Trypanosoma cruzi* to produce infection of chorionic villi explants from human normal placentas Triquell MF, Diaz Luján C, Guerrero CE, Sembaj A, Diaz IN, Pereira MI, Fabro SPde, Fretes RE. *BIOCELL*, 28 (3): 328, 2004. (Abstrac)

“Posible interrelación entre citoesqueleto y óxido nítrico sintetasa (NOS) en placentas humanas a término con relación al *Tripanosoma Cruzi*” Triquell MF, Díaz Luján C, Guerrero CE, Díaz NI, Fretes RE. *Acta bioquímica clínica Latinoamericana. Supl III*: 112.2005. (Abstrac)

Human placental nitric oxide might participate in the control of chorionic villi *Trypanosoma cruzi* infection in vitro Díaz Luján C, Triquell MF, Guerrero CE, Fretes RE *BIOCELL*, 29 (2): 225, 2005. (Abstrac)

Immunohistochemical characterization of the nitric oxide synthase in chagasic placentas. Guerrero CE, Bolatti E, Diaz-Luján C, Triquell MF, Fretes RE. *Manuscrito en preparación*. 2009.

PONENCIAS PRESENTADAS Y PUBLICADAS EN ACTAS DE REUNIONES CIENTIFICAS CON REFERATO.

“Explantos de vellosidades coriales de placentas humanas normales limitarían la infección productiva in vitro por el *Trypanosoma cruzi*” Díaz Luján C, Triquell MF, Sembaj A, Guerrero CE, Fretes RE .IV Jornadas Científicas de la Facultad de Ciencias Médicas. 2003 Córdoba.

La Placenta humana en la transmisión congénita de la Enfermedad de Chagas. Iller. Encuentro de Investigadores de la Enfermedad de Chagas. Fretes RE, Diaz Luján C, Triquell MF, Guerrero CE Escuela de Graduados de la Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba. 7 noviembre 2003.

In vitro capacidad infectiva del *Trypanosoma cruzi* en explantos de vellosidades placentarias humanas normales Triquell MF, Díaz Luján C, Guerrero CE, Sembaj A, Diaz IN, Pereira MI, Fabro SPde, Fretes RE. XX Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Protozoología. Rosario, Argentina. Acta de Congreso, N°30. 26 – 28 mayo, 2004.

En el tejido placentario humano a término el óxido nítrico participaría en el control de la infección por *Trypanosoma cruzi* in vitro. Díaz Luján C, Triquell MF, Guerrero CE, Fretes RE. XV Jornadas Científicas Sociedad Biología Córdoba. Villa Giardino, Córdoba. 4-6 agosto, 2005.