

INCREMENTO DE LIPIDOS EN PLACENTAS CHAGASICAS HUMANAS: ESTUDIO CITOQUIMICO Y BIOQUIMICO *

Andrés E. Fabro y Gustavo Calzolari

Iida. Cátedra de Histología, Embriología y Genética. - Universidad Nacional de Córdoba -
Facultad de Ciencias Médicas - La Noria 1262 - 5000 Córdoba - Argentina.

Este trabajo obtuvo el premio ESTIMULO 1988 de la SOCIEDAD ARGENTINA DE
CIENCIAS MORFOLOGICAS.

RESUMEN

Se ha demostrado que el trofoblasto humano normal posee gránulos lipídicos que contienen triglicéridos y fosfolípidos cuya significación no está aún aclarada. Con el objeto de analizar el efecto que la enfermedad de Chagas induce en estas estructuras se propuso el siguiente estudio para determinar la relación entre el grado de lesión placentaria, la presencia de lípidos y el estado fetal y del recién nacido.

Se utilizaron placentas humanas de madres con enfermedad de Chagas Crónica detectada por las pruebas de Machado Guerreiro y de Inmunofluorescencia. Se efectuó la técnica del Red Oil O para la localización histoquímica de lípidos. Homogeneizados de vellosidades placentarias se analizaron para determinar lípidos totales, triglicéridos y colesterol.

Los hijos de las madres estudiadas fueron controlados para establecer su estado general y peso.

Las placentas chagásicas presentaron un notable incremento de gotas lipídicas en el trofoblasto y en áreas del mesénquima próximas a los vasos. Estas imágenes aparecieron localizadas, con lesiones tisulares evidentes alternando con regiones aparentemente normales. La determinación de lípidos demostró un aumento significativo de triglicéridos y en menor proporción de colesterol. Los hijos de estas madres, con excepción de dos, no fueron chagásicos aunque presentaron una disminución significativa de peso y una mayor incidencia de prematuros sobre un total de 89 embarazadas.

Estos resultados demuestran que las alteraciones placentarias inducidas por la enfermedad de Chagas se acompañan del incremento de lípidos con aumento específico de triglicéridos y colesterol lo que indicaría modificaciones de estos componentes de la placenta y del suero materno. Ocurrirían así variaciones en el desarrollo fetal, pudiendo, eventualmente, condicionar la infección del feto a través de complejos mecanismos de interacción entre las estructuras placentarias y el *T. cruzi*.

Palabras claves: Placenta - Lípidos -
Enfermedad de Chagas.

INTRODUCCION

Más de 20 millones de personas de latinoamérica están afectadas por la enfermedad de Chagas.

La infección puede transmitirse al feto originando el Chagas Congénito.

En zonas endémicas de nuestro país se ha establecido una incidencia del 2 al 5 % de Chagas Congénito.

Andrade² y Cunio¹¹, Delgado y Santos-Buch¹² han demostrado en animales de laboratorio que la placenta está involucrada en el pasaje del parásito al feto.

Bittencourt y col.^{4,5,6,7} estudiando placentas humanas y recién nacidos de madres chagásicas describen lesiones placentarias inespecíficas las que influirían en el peso del recién nacido.

Calderón y Fabro⁸, han demostrado que la interacción "in vitro" del trofoblasto humano y el *Trypanosoma cruzi* es un fenómeno relativamente específico y que el *Trypanosoma* induce el pro-

ceso de fusión en las fracciones de membranas de trofoblasto y de glóbulos rojos, lo que indicaría que los lípidos de membranas son afectados por el parásito, postulándose la infección placentaria por un proceso de endocitosis.

Las lesiones de placentas chagásicas configuran un cuadro histopatológico específico según lo demostrado en nuestro laboratorio¹⁹ y se describen tanto al microscopio óptico como electrónico alteraciones de glicoproteínas, glicosaminoglicanos y disminución de enzimas asociadas a membranas tales como la fosfatasa alcalina, 5-nucleotidasa, ATPasa e incremento de fosfatasa ácida relacionada con la actividad lisosomal. Además, observaciones sistemáticas, mediante microscopía demuestran la presencia de abundantes gránulos similares a gotas lipídicas en el estroma y trofoblasto de placentas chagásicas^{13, 15, 16, 17, 18, 24, 25}.

Teniendo en cuenta el fenómeno de fusión de membranas inducidas por el *T. cruzi*, las alteraciones enzimáticas y las características citopatológicas de las placentas chagásicas, se propuso el estudio de lípidos de placentas chagásicas mediante técnicas citoquímicas y bioquímicas con el objeto de determinar si el parásito induce cambios en estas estructuras moleculares y si esas variaciones repercuten en el desarrollo fetal.

MATERIAL Y METODOS

Se estudiaron 89 placentas de embarazadas chagásicas cuya edad gestacional varió entre las 38 a 40 semanas. Se analizó un grupo control de 89 embarazadas normales. Todas las pacientes estudiadas concurren al Hospital Materno Provincial de la Ciudad de Córdoba.

Para determinar la presencia de enfermedad de Chagas se realizó la reacción de Machado Guerreiro y el Test de Inmunofluorescencia (T.I.F.).

Las pacientes chagásicas estudiadas no presentaron otra patología. Se efectuó el estudio macroscópico de las placentas, el que consistió en la determi-

nación de peso, diámetro, espesor, forma de inserción del cordón umbilical, aspecto de las membranas, presencia de infartos, etc.

Se realizaron cortes en forma de cuña desde la inserción del cordón a la periferia. Se tomaron muestras de un cm de espesor de las regiones fetal, materna y media de las cuñas y se fijaron en formol-calcio a pH 7.4 durante 48 a 72 hs. Una parte de las muestras se incluyeron en parafina y se procedió a su posterior coloración con Hematoxilina y Eosina y con el método de Gallego, el que es usado para facilitar la visualización de los parásitos.

Otro grupo de muestras fijadas en formol-calcio fueron incluidas en gelatina. Se obtuvieron cortes de 8 a 10 μ m con criostato Ames (Miles Co.). Los cortes se montaron en portas y se realizó la técnica de Oil Red O para la determinación de lípidos³.

Se efectuó además la técnica de PAS y Alcian Blue para la detección de lípidos complejos^{3, 10, 19}.

Trozos de placenta fresca fueron cortados y lavados 3 veces en buffer de fosfato pH 7.4 y homogeneizados con motor durante 10 a 20 minutos.

Una muestra de este homogeneizado se usó para dosaje de proteínas por el método de Lowry²⁰ y el resto se destinó para la determinación de lípidos totales¹⁵, colesterol¹ y triglicéridos²².

Como estudios complementarios se efectuó el análisis de lípidos en el suero de estas embarazadas chagásicas y normales. Los niños nacidos tanto de partos normales como por cesárea fueron medidos, pesados y clínicamente estudiados por el neonatólogo.

Los resultados fueron sometidos al cálculo estadístico aplicándose el Test Student. Se consideraron significativos aquellos datos con valores de $p \leq 0.05$.

RESULTADOS

Las placentas de madres chagásicas demostraron ser significativamente menores en sus dimensiones con relación a las normales (Tablas I y II).

No se detectaron diferencias con relación a inserción del cordón y presencia de infartos. El parásito se observó en 25 placentas (Figura 1 a).

Tanto el trofoblasto como el estroma presentaron un incremento de gotas li-

pídicas con relación a las normales cuando se usó la técnica de Oil Red O (Figuras 1 b y c).

El PAS y el Alcian Blue no permitió establecer ninguna relación entre esas granulaciones y las estructuras coloreadas con estas técnicas.

TABLA I

PLACENTAS
PESO EN GRAMOS

EDAD GESTACIONAL (semanas)	NORMALES	CHAGASICAS
38 (12) *	540 ± 1.5 **	449 ± 0.8
39 (15)	552 ± 0.1	470 ± 0.3
40 (62)	560 ± 0.1	485 ± 0.3

* Número de casos.

** Desviación Standard.

TABLA II

PLACENTAS
DIMENSIONES

EDAD GESTACIONAL (semanas)	NORMALES		CHAGASICAS	
	DIAMETRO (cm)	ESPESOR (cm)	DIAMETRO (cm)	ESPESOR (cm)
38 (12) *	16.80 ± 0.38 **	3.05 ± 0.05	12.49 ± 0.09	1.87 ± 0.05
39 (15)	18.09 ± 0.05	3.17 ± 0.12	12.01 ± 0.19	2.01 ± 0.03
40 (62)	17.73 ± 0.04	3.07 ± 0.02	13.42 ± 0.01	2.35 ± 0.01

* Número de casos.

** Desviación Standard.

Las determinaciones bioquímicas demostraron que los lípidos totales analizados no están modificados, en cambio son significativos los incrementos registrados en el colesterol y triglicéridos (Figura 3).

También se determinó un aumento significativo de los triglicéridos en el suero de embarazadas chagásicas, siendo normales los lípidos totales y el colesterol (Figura 4).

El peso de los recién nacidos en estas madres chagásicas fue significativamente menor que el de los normales (Tabla III).

TABLA III
RECIENTE NACIDOS

EDAD GESTACIONAL (semanas)	PESO EN GRAMOS	
	MADRES NORMALES	MADRES CHAGASICAS
38 (12) *	3.106 ± 0.81 **	2.349 ± 0.45
39 (15)	3.205 ± 0.50	2.570 ± 0.49
40 (62)	3.525 ± 0.30	2.859 ± 0.41

* Número de casos.

** Desviación Standard.

DISCUSION

Se ha postulado que el *Trypanosoma cruzi* infecta a la célula hospedadora mediante una actividad endocitósica de la célula invadida. Este mecanismo implica, entre otros procesos, fisión y fusión de membranas plasmáticas. Este fenómeno se acompaña de las modificaciones de las proteínas integrales en las que ocurre segregación o bien agregación, lo que induce a la formación de regiones enriquecidas en lípidos y explicaría la fusión de membranas²³.

Se ha demostrado que el *Trypanosoma cruzi* produce fusión en glóbulos rojos de pollo y además que, entre fracciones de sincitiotrofolasto humano y del parásito, existe una interacción preferencial entre ambas membranas en las que participan lípidos y proteínas. Este efecto ha sido corroborado por la acción de tripsina y fosfolipásas^{8,9}.

Además el uso de lípidos fusogénicos induce alteraciones en el patrón proteico de fracciones de sincitiotrofolasto humano normal, lo que modifica a los lípidos mencionados. Estos cambios son similares a los que producen en la placenta, fracciones antigénicas del *Trypanosoma cruzi* "in vitro" y a los detectados en las placentas de madres chagásicas.

De los resultados expuestos se puede concluir que, el *Trypanosoma cruzi* altera los lípidos de las placentas infectadas y que en estas modificaciones estarían involucrados lípidos de membranas, las que contienen colesterol, gli-

colípidos y en menor proporción triglicéridos, entre otros componentes.

El parásito actuaría también sobre ciertos lípidos cuyas concentraciones normales cambian, tanto en el suero, como en las fracciones subcelulares de placentas de madres chagásicas.

Se podría considerar que los lípidos de reserva quedan acumulados como grasas neutras o triglicéridos en los gránulos lipídicos detectados en placentas chagásicas, lo que dificultaría la vehiculización de los mismos de la madre al feto, con el consiguiente efecto sobre el desarrollo fetal.

Este mecanismo y otros postulados por Fabro, S. P. y col.^{8,13,17,18,24,25} podrían explicar las alteraciones placentarias citopatológicas, su disfunción y el bajo peso fetal del recién nacido de embarazadas chagásicas.

BIBLIOGRAFIA

1. Abell LL., Levig BB., Grodie BB., Kendall, Fe.: A simplified method for the estimation of total cholesterol in serum and demonstration of its specificity. *J. Biol Chem* 195:357, 1952.
2. Andrade Z. e Andrade S.: Estudio inmunocitoquímico da doença de Chagas experimental. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 11:44-47, 1969.
3. Barka T. and Anderson PJ.: *Histochemistry. Theory practice and bibliography* Hoeber Medical Division New York, Evanston and London Edit. Harper and Row publishers, 1963.
4. Bittencourt Al., Gómez MC.: Gestacoes sucessivas da uma paciente chagásica com ocorrência de casos de transmissao congénita de doença. *Gaz Méd Bahía*, 67:166-177, 1967.

5. Bittencourt AC., Lisboa C.: Incidencia de transmissao congénita da doenca de Chagas en partos prematuros na maternidad Tsylla Balbino. (Salvador-Bahia). Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 14:131-134, 1972.
6. Bittencourt AC., Lisboa C. e Barbosa HS.: Importancia do estado do feto macerado para o diagnóstico da forma congénita da doenca de Chagas. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 14:260-263, 1972.
7. Bittencourt Al.: Congenital Chagas disease. Am J Pis Chil. 130:97-103, 1976.
8. Calderón R. O., Fabro S. P.: *Trypanosoma cruzi*: Fusogenic ability of membranes from cultured epimastigotes in interaction with human syncytiotrophoblast. Exp Parasitol. 56:169-179, 1983.
9. Calderón R.O. y col.: *Trypanosoma cruzi*; Variable fusogenic activity by different growth phases. Exp Parasit. 62:453-455, 1986.
10. Conejos M.: Tinción de leishmanias por el Método de Gallego al formol. Anales del Inst Med Reg. 1:305-307, 1958.
11. Cunio Rw y col.: Chagas Mazza congénito experimental. Medicina 40 (Supl. 1): 50-55, 1980.
12. Delgado M. and Santos-Buch C.: Transplacental transmission and fetal parasitosis of *Trypanosoma cruzi* in outbred white, Zwiss mice, Am J Trop Med Hyg. 27:1108-1115, 1978.
13. Fabro S. P., Goldemberg: Modificaciones enzimáticas producidas por la enfermedad de Chagas en la embarazada y el niño. Medicina 40 (Supl. 1): 240-241, 1980.
14. Flegg A.: Comparative analysis of lipids in human serum. Ann Clin Biochem 10:79, 1973.
15. Fretes R.E.: Chagas Congénito: Alteraciones ultraestructurales y ultracitoquímicas inducidas por el *Trypanosoma cruzi* en la placenta humana. Tesis Doctoral. Fac. de C. Médicas, U. N. Cha., 1986.
16. Fretes R. E., Fabro S. P. de: Alkaline phosphatase activity in placental villi cultured with *Trypanosoma cruzi*; biochemical and cytochemical studies. Comun Biológicas 4:483, 1986.
17. Fretes R., Fabro S. P. de: Human chagasic placenta: localization of enzymes associated to syncytiotrophoblast membranes. Comun Biol 9:51-59, 1990.
18. Fretes R., Fabro S. P. de: *Trypanosoma cruzi*; modification of alkaline phosphatase activity induced by trypomastigotes in cultured placental villi. Rev Inst Med trop S. Pablo, 32:320-329, 1990.
19. Hessel M. M. de: Variaciones citológicas y citoquímicas de los tejidos de embarazadas chagásicas. Tesis Doctoral, Fac. de C. Médicas, U. N. Cha., 1982.
20. Lowry O. H., Rosebrough M. H., Farr A. L., Randall R. J.: Protein measurement with the folin phenol reagent. J Biol Chem, 193: 265-275, 1951.
21. Mac Mannus J. F. A., Mowry R. W.: Técnicas histológicas. 1ra. edición. Atika, S.A. Madrid, 1968.
22. Nasht: The colorimetric estimation of formaldehyde by means of the Hantzsch Reaction. Biochem J, 55: 416, 1953.
23. Quirk S. J., Ahkong Q. F., Botham G. M., Vos J., Lucy J. A.: Membrane proteins in human erythrocytes during cell fusion induced by oleoglycerol. Biochem J 176: 159-167, 1978.
24. Ruiz Moreno L., Fabro S. P. de: Effect of *Trypanosoma cruzi* on the protein pattern of human syncytiotrophoblast. Comun Biol. 8: 351-360, 1990.
25. Ruiz Moreno L., Fabro S. P. de: Modifications of human syncytiotrophoblast protein pattern induced by *T. cruzi* glycerol mono-oleate (GMO) and Ca^{2+} . Commun Biol. 6: 154, 1987 b.

SUMMARY

It has been demonstrated that the normal human trophoblast has lipidic granules that contain triglycerides and phospholipids of yet unclear significance. With the purpose of analyzing the effect of Chagas disease on these structures, the present study was undertaken with the purpose of determining the relationship between the degree of placental lesion, the presence of lipids and the general condition of the fetus and newborn. Human placentas from mothers with chronic Chagas disease detected by the Machado Guerreiro test and immunofluorescence were used. Red Oil O technique was used for the histochemical localization of lipids. Homogenates of placental villi were analyzed to determine total lipids, triglycerides and cholesterol.

The children of the studied mothers were controlled to establish their general condition and weight.

The chagasic placentas presented a marked increase of lipidic droplets in the trophoblast and in mesenchymal areas next to blood vessels. These images appeared localized, with evident tissues alterations that alterned with apparently normal regions. Lipid determination showed a significant increment of triglycerides and, in a lesser proportion, of cholesterol. With two exceptions, the children of these mothers were not chagasic, although they

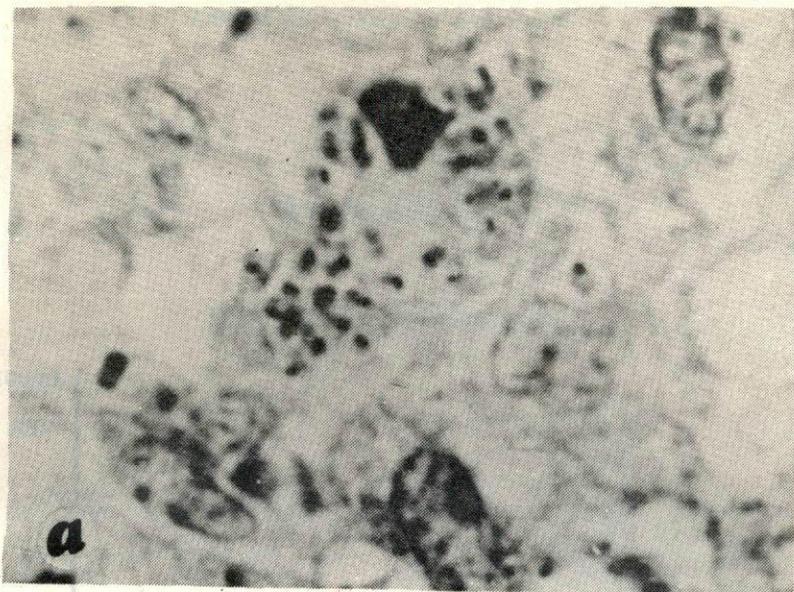
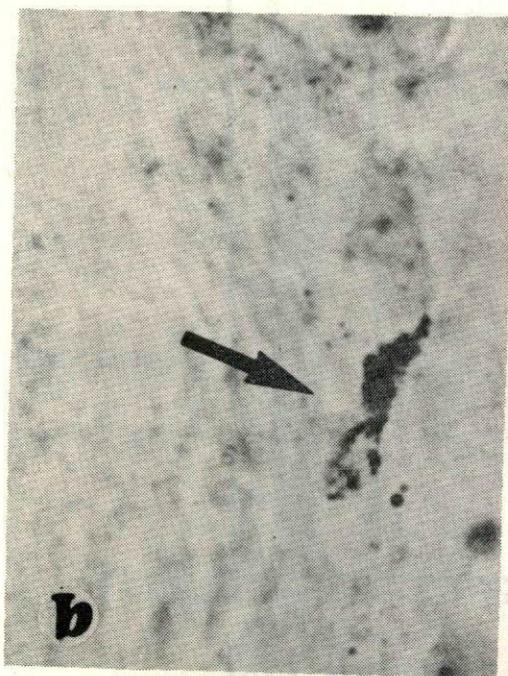
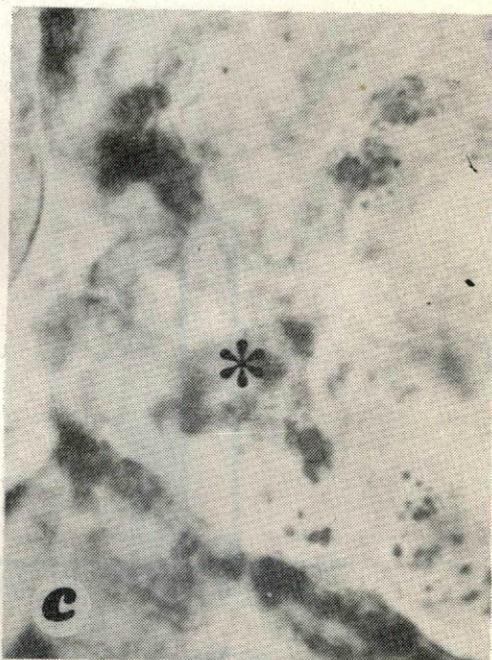


Figura 1: Placenta chagásica.

a- Parásitos próximos al trofoblasto y en el estroma. Técnica de PAS. Aumento 1.000X.



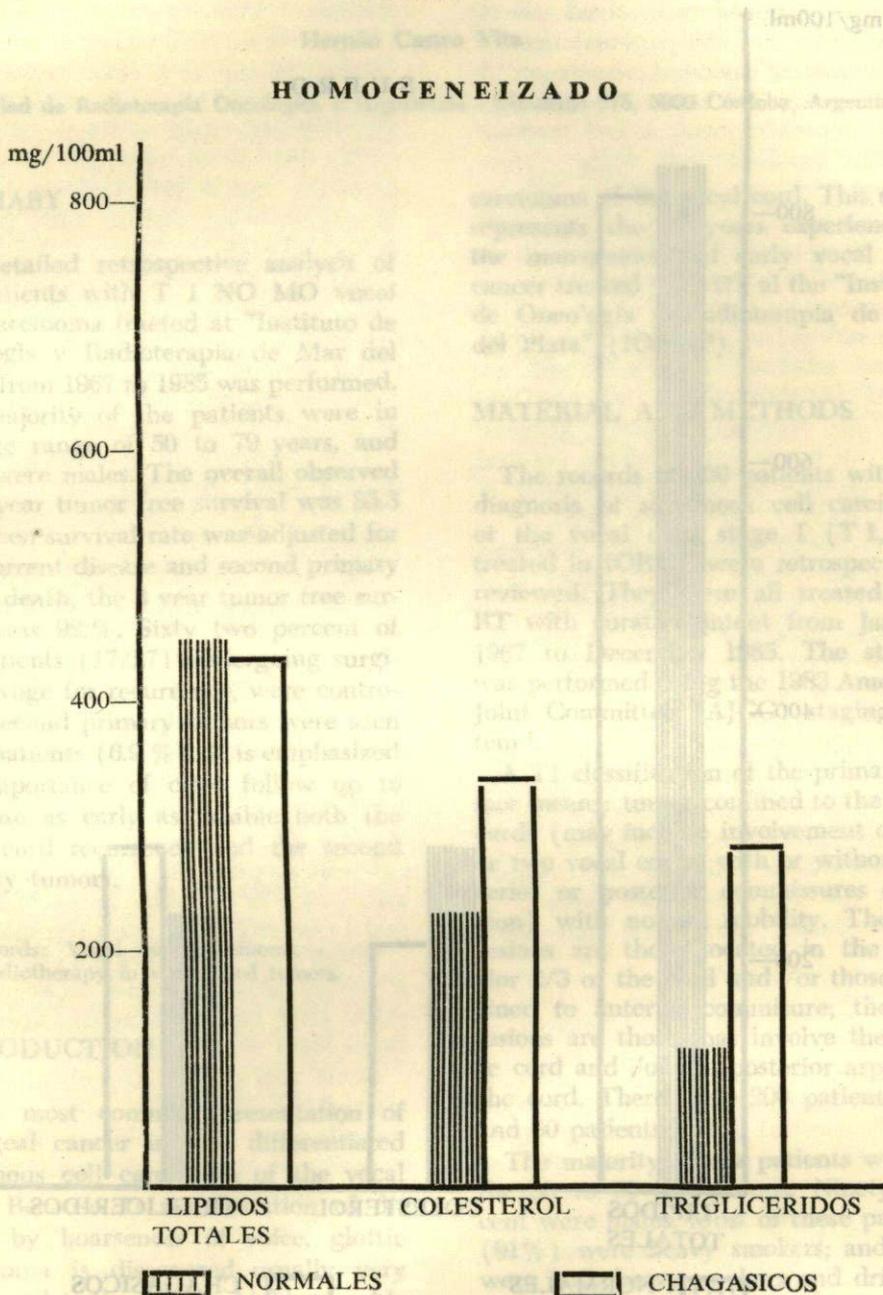
b- Acúmulo de gránulos intensamente reactivos en trofoblasto (flecha). Técnica OIL RED O. Aumento 400X.



c- Granulaciones lipídicas en estroma (*). Técnica OIL RED O. Aumento 400X.

RADIATION TREATMENT OF EARLY VOCAL CORD CARCINOMA. EIGHTEEN YEARS EXPERIENCE AT "INSTITUTO DE ONCOLOGIA Y RADIOTERAPIA DE MAR DEL PLATA". FIGURA Nº 3

HOMOGENEIZADO



SUMMARY

A detailed retrospective analysis of 270 patients with T1 NO MO vocal cord carcinoma treated at "Instituto de Oncología y Radioterapia de Mar del Plata" from 1967 to 1985 was performed. The majority of the patients were in the age range 50 to 79 years, and 173 were males. The overall observed three year tumor free survival was 58.3%. After survival rate was adjusted for intercurrent disease and second primary tumor deaths, the three year tumor free survival was 92.5%. Sixty two percent of the patients (177) were undergoing surgical salvage. Second primary tumors were seen in 18 patients (6.7%). It is emphasized the importance of follow up to diagnose as early as possible both the vocal cord recurrence and second primary tumors.

Key words:

INTRODUCTION

The most common localization of laryngeal cancer is in the glottis. It is characterized by a high curability rate. Laryngeal cancer ranks among the most common tumors in Argentina's male population. Radiation therapy (RT) is accepted in Argentina and the rest of the world as a primary treatment modality for early

This study represents the 18 years experience in the management of early vocal cord cancer treated at the "Instituto de Oncología y Radioterapia de Mar del Plata" (1967-1985).

MATERIAL AND METHODS

The records of 270 patients with the diagnosis of squamous cell carcinoma of the vocal cord, stage I (T1, N0) treated in 1967-1985 were retrospectively reviewed. They were all treated with RT with curative intent from January 1967 to December 1985. The staging was performed using the 1983 American Joint Committee on Cancer staging system.

The classification of the primary tumors was restricted to the vocal cord (cases including involvement of one or two vocal cords) without any extension or metastatic appearances elsewhere with some exceptions. The T1a cases are the ones in the anterior 3/4 of the cord and/or those confined to interarytenoid space; the T1b cases are the ones that involve the entire cord and/or the posterior aspect of the cord. There were 130 patients T1a and 140 patients T1b.

The majority of patients were in the age range 50 to 79 years, and 173 were males; and 52% were smokers; and 52% were drinkers. The patients were referred from different physicians, usually ENT (ear, nose and throat) specialists from Mar del Plata. All patients underwent a complete clinical evaluation in the IORMP, including a physical examination and indirect laryngoscopy. In most cases a

FIGURA N° 4

