

24.28



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

**Escuela Nacional de Estudios Profesionales
"ZARAGOZA"**

**CARACTERIZACION BIOLOGICA DE TRES CEPAS DE
Trypanosoma cruzi AISLADAS DE DIFERENTES
FUENTES DEL ESTADO DE OAXACA**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
Químico Farmacéutico Biólogo**

P R E S E N T A :

JUANA ANGELA RIVERA ISLAS

Asesor: Q.B.P. Federico Martínez Gómez



1 9 8 6



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

CONTENIDO

- I. INTRODUCCION**
- II. FUNDAMENTO DE LA ELECCION DEL TEMA**
- III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**
- IV. OBJETIVOS**
- V. HIPOTESIS**
- VI. MATERIAL Y METODOS**
- VII. RESULTADOS**
- VIII. DISCUSION Y CONCLUSIONES**
- IX. BIBLIOGRAFIA**

I. INTRODUCCION

La enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana - se debe a la infección por Trypanosoma cruzi, un flagelado que vive en la sangre y los tejidos del hombre, pertenece a la familia Trypanosomatidae. Este parásito fué descubier to por Carlos Chagas en Brasil en 1909, en el intestino de un hemíptero Panstrongylus megistus "chinche hocicona", - (2, 10).

La enfermedad de Chagas esta ampliamente distribuida en la mayoría de los países del continente americano y a - fecta sobre todo a las poblaciones rurales que habitan en viviendas construidas de adobe, paja, carrizo o palma. Los países con mayor índice de infección son: Brasil, Argenti - na, Uruguay, Venezuela, Costa Rica y Chile. Se estima que por lo menos 35 millones de personas en Fberoamerica estan expuestas a esta infección y que más de siete millones pa - decen la parasitosis (10, 16).

Morfología de Trypanosoma cruzi.

Cuando este parásito infecta al hombre, se encuentran circulando en sangre los tripomastigotes, los cuales son - flagelados delgados de unas 20 micras de largo. En las pre - paraciones fijas y teñidas tienen forma de U o de S, con - un flagelo libre de la tercera parte de la longitud total del cuerpo, citoplasma granuloso, núcleo central y un gran cinetoplasto, así como una membrana ondulante. En los teji - dos se encuentran dentro de células, la fase de amastigote

la cual es redonda, mide de 1.5 a 4 micras de diámetro y carece de flagelo. Los tripomastigotes representan una forma infecciosa no multiplicativa, cuando aparecen en sangre se les denomina tripomastigotes sanguíneos, para distinguirlos de los que se encuentran en el intestino del transmisor que se conocen como tripomastigotes metacíclicos. - Los primeros son la fase que infecta al transmisor y los segundos infectan al hombre (Fases de transmisión en la naturaleza).

Transmisión.

Los reduvidos hematófagos o triatomas son los transmisores principales de Trypanosoma cruzi. La transmisión de la enfermedad es por contaminación de la pequeña herida causada por el piquete del triatoma al alimentarse, ya que este hemíptero, defeca durante el proceso de alimentación y así deposita sobre la piel los tripomastigotes metacíclicos (fase infectiva para el hombre), los cuales penetran fácilmente por el orificio que causó la picadura, sobre todo si el individuo se rasca la piel. Posteriormente los tripanosomas infectantes penetran en las células y se multiplican en forma de amastigotes formando los pseudoquistes, que son células repletas de amastigotes y al romperse éstas, se liberan los parásitos y se transforman en promastigotes y epimastigotes alcanzando finalmente la forma de tripomastigote en sangre periférica.

Curso de la infección y patología de la enfermedad.

La enfermedad de Chagas en el hombre y los animales presenta cuatro fases distintas.

1. El período de incubación, se realiza con la proliferación de amastigotes dentro de las células, la transferencia de una célula a otra en forma de tripomastigote y la introducción de éstas en la sangre. Esta fase dura de dos a tres semanas.

2. Fase aguda, se caracteriza por chagoma, fiebre y hepatoesplenomegalia. En las lesiones presentadas por la vía de entrada se caracteriza por un infiltrado casi exclusivamente mononuclear. Los ganglios linfáticos que drenan el lugar se dilatan y muestran inflamación no específica. A menudo la enfermedad aguda va acompañada de una parasitemia franca, con la consecuente invasión de las células de numerosos órganos en las que proliferan. La capacidad del parásito para invadir determinados sistemas orgánicos varía según las cepas. Esta fase dura de dos a tres semanas.

3. Fase latente, se presenta parasitemia baja; debido a la constante multiplicación intracelular del parásito en varios órganos. Esta fase puede durar indefinidamente o convertirse en enfermedad de Chagas crónica.

4. Fase crónica, por lo general aparece a los 10 años o después de la infección inicial. Se caracteriza por miocarditis progresiva o dilatación irreversible de vísceras huecas. La lesión cardíaca presenta infiltración de células mononucleares, destrucción de fibras miocárdicas y fibrosis intersticial (6, 7, 18).

La enfermedad de Chagas empieza a alcanzar en nuestro país, importancia epidemiológica, como lo demuestra el creciente número de informes que sobre ella se han hecho en -

relación con su seroepidemiología, casos clínicos y presencia de reservorios.

Mazzotti (1940) presentó los dos primeros casos humanos autóctonos en México, originados en Teojomalco Oaxaca, infectados por T. cruzi los cuales fueron comprobados parasitológicamente por hallazgo del tripanosoma en sangre u otros órganos. Palómo (1946) informó de otros dos casos en Mérida Yucatán. Biagi y colaboradores (1958) confirmaron el quinto caso humano de la enfermedad de Chagas en Tuxtepec estado de México. Posteriormente varios autores refieren casos humanos comprobados parasitológicamente en diversas localidades: Palencia y Montaño (1959) en Guaymas Sonora; Biagi, Tay y col. (1964) en Tetitlán Guerrero; Tay y col. (1966) en el municipio de Tuxpan Michoacán; Cuartero y col. (1967) informaron de cinco casos humanos en el estado de Jalisco y Zacatecas; Quintal y col. (1975) en el estado de Yucatán. En los últimos años se ha demostrado la presencia de numerosas infecciones humanas, tanto por el hallazgo de parásitos como por reacciones inmunológicas en diferentes estados de la República.

Con el objeto de estudiar los diferentes grados de virulencia de las cepas de T. cruzi aisladas en varios países de América y diversas entidades de la República Mexicana se han efectuado varios trabajos, en los cuales nos dan datos diferentes, siendo este tema de discusión, así tenemos: Mazzotti (1937) descubrió por primera vez en el país T. cruzi en un lote de Triatoma phyllosoma y al hacer la inoculación en ratones blancos encontró que uno de ellos, -

llegó a presentar 20 tripanosomas por campo microscópico - (obj. 30x; ocular 10x), apareciendo los primeros flagelos a los 11 días de haber sido inoculados.

Mazzotti (1940) continua el estudio de la virulencia de cepas de T. cruzi aisladas en diferentes localidades de la República encontrándose cepas de alta virulencia ya que de diez ratones inoculados morían nueve en término medio de 30 días, y otras de baja virulencia con las cuales casi todos los ratones se restablecieron o las inoculaciones fueron negativas.

Pérez Reyes (1953), con una cepa obtenida de Dipetalogaster maximus de Baja California, inoculó dos ratones blancos encontrando parásitos escasos a los 30 días, los cuales desaparecieron más tarde.

Bice y Zeledón (1970) compararon cinco cepas de T. cruzi con relación a su infectividad y su organotropismo en ratones. Esta observación se basa en la parasitemia y el número de pseudoquistes producidos. Norman y Kagan (1960) sugieren que el incremento en la virulencia puede ser debido al aumento de tripomastigotes metacíclicos en el cultivo. Fay y col. (1969) reportaron haber encontrado una cepa de T. cruzi aislada de Triatoma phyllosoma intermedia procedente de Zacatecas que mostró alta virulencia sobre ratón blanco con producción de nidos de amastigotes en corazón, músculo esquelético y cerebro, muriendo todos los ratones entre los 15 y 20 días después de la inoculación. En la región donde fue aislada esta cepa se reportaron cinco casos humanos (Cuartero 1965).

Salazar y col. (1975) encontraron una cepa de T. cruzi aislada de Triatoma phyllosoma maggotti de la población de Cocula en el estado de Jalisco, de gran virulencia para el ratón blanco, en donde produjo la muerte en todos los ratones inoculados hasta con inoculos muy reducidos de tripomastigotes. Es de hacer notar que en este estado de la República ya se han reportado casos humanos de enfermedad de Chagas. Así mismo en 1978 estudiaron la patogenicidad en ratón blanco de cuatro cepas de T. cruzi aisladas de casos humanos y de ejemplares de Triatoma barberi - encontrando que las que presentan mayor virulencia fueron las aisladas de casos humanos.

De las cepas aisladas en México, se considera que la mayoría son poco virulentas; sin embargo se han aislado algunas que matan a los ratones en poco tiempo (11).

El hecho de encontrar variaciones de virulencia, patogenicidad, morfología, organotropismo, así como el número y tiempo de aparición de los tripanosomas en sangre, en cepas americanas y sudamericanas ha sido objeto de múltiples estudios explicándose por un gran número de hipótesis tales como: factores externos, resistencia natural a la enfermedad, hábitos de triatomíneos, etc. pero aún no se conocen con precisión los diversos factores que se encuentran involucrados.

II. FUNDAMENTO DE LA ELECCION DEL TEMA

En 1909, Carlos Chagas descubrió el T. cruzi causante de la enfermedad de Chagas existente en América (2, 10). - Los cuadros clínicos dados por esta enfermedad presentan - gran variación de una zona a otra y de un país a otro. En algunos lugares se presentan muertes súbitas muy frecuentes en personas infectadas por este tripanosoma, mientras que en otros aún cuando la población se encuentra muy infectada con índices importantes, los síntomas clínicos que presentan son muy leves y en ocasiones las personas infectadas están asintomáticas (3, 9, 20, 25).

La presencia o ausencia de síntomas clínicos puede ser debida a las diferencias de virulencia de las distintas cepas de T. cruzi. "Mazzotti (1940) encontró que en ratones y cobayos se obtuvieron resultados diferentes después de inocularlos con cepas obtenidas a partir de diferentes especies de triatóminos y que esas cepas diferían en virulencia aún cuando fueron obtenidas de la misma especie de chinche en distintas localidades" (10).

Este puede ser uno de los muchos factores que posiblemente intervienen en la diferencia de los síntomas clínicos presentados por esta enfermedad.

En México por muchos años se creyó que la infección por T. cruzi en el hombre no causaba enfermedad, ya que aparentemente nuestras cepas son poco virulentas para el hombre (3, 24), pero mediante varios estudios realizados -

en diferentes regiones del país se han encontrado casos humanos con la enfermedad de Chagas (21, 30). Estas razones nos han motivado para elegir el tema de caracterización biológica de las cepas de T. cruzi aisladas del estado de Oaxaca, ya que una vez caracterizadas, se podrán utilizar en los laboratorios como modelos biológicos para continuar los estudios sobre la enfermedad de Chagas.

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En varios países, año tras año se han venido realizando trabajos para determinar el poder patógeno y virulento que presentan distintas cepas de T. cruzi aisladas en diferentes regiones de América (9, 12, 15, 23), así como también el investigar las variantes de comportamiento que presentan las cepas que se aíslan en diferentes localidades de un mismo país (5).

En la República Mexicana ya se han hecho estudios de laboratorio sobre el comportamiento de diversas cepas de T. cruzi, aisladas en diferentes regiones del país (17, 21, 22) es decir se han realizado estudios experimentales infectando ratones en los cuales se han determinado sus parasitemias y su tropismo que presenta hacia diversos tejidos y órganos, así como el daño que provocan en ellos (17, 21).

En los resultados de tales trabajos se ponen de manifiesto las variaciones que se observan entre las diversas cepas que se han aislado en distintas regiones del país, así como también se ha observado que las cepas más virulentas para el ratón, son aquellas que se han aislado de casos humanos. Estas variaciones podrán ser un factor importante en la diferencia de síntomas clínicos presentados en la enfermedad de Chagas.

Motivados por lo anterior nos planteamos el siguiente problema: en un estudio epidemiológico sobre la enfermedad de Chagas se aislaron tres cepas de T. cruzi del estado -

de Oaxaca, dos de ellas se aislaron de casos humanos y la tercera a partir de las deyecciones del Triatoma pallidipennis. De estas tres cepas de T. cruzi se van a estudiar sus características biológicas en ratón blanco; determinando sus curvas de parasitemia, su tropismo hacia líquidos corporales, su morfología, así como su comportamiento en dos cepas diferentes de ratón blanco.

IV. OBJETIVO GENERAL

Conocer las características biológicas de tres cepas de Trypanosoma cruzi utilizando como huésped experimental al ratón blanco (*Mus musculus*).

OBJETIVOS ESPECIFICOS

a. Determinar las curvas de parasitemia de las tres cepas de T. cruzi, con dos dosis diferentes infectivas de Tripomastigotes sanguíneos.

b. Conocer el comportamiento de las tres cepas de T. cruzi en dos cepas de ratón blanco (cepa NHI y CD-I).

c. Estudiar la morfología de los tripomastigotes sanguíneos de las tres cepas de tripanosomas.

d. Conocer el tropismo de las tres cepas hacia líquidos corporales.

V. HIPOTESIS

Las cepas de Trypanosoma cruzi aisladas tanto de casos humanos como de triatóminos posiblemente presentarán características biológicas totalmente diferentes entre ellas, no obstante pertenecer a la misma región geográfica.

VI. MATERIAL Y METODOS

a.- Material biológico.

Ratones blancos cepa NHI hembras (peso de 18 a 20g).

Ratones blancos cepa CD-I hembras (peso de 18 a 20g).

Tres cepas de T. cruzi

Triatoma: Triatoma pallidipennis

b.- Método.

Tres cepas de T. cruzi fueron aisladas del estado de Oaxaca, dos de ellas se aislaron de casos humanos por xenodiagnóstico (cepa NIGUZ y NINOA) y la tercera cepa fué aislada de las deyecciones de un triatoma colectado en una casa habitación (cepa ZAACHILA).

Los triatomas infectados con cada una de las cepas de T. cruzi, se alimentaron sobre ratones limpios (previamente inmovilizados), una vez alimentados se procedió a coleccionar las deyecciones de los triatomos, los cuales se diluyeron en solución salina (0.9%), para inocular ratones blancos (cepa NHI) por vía intraperitoneal, con el objeto de incrementar y de conservar las cepas en el laboratorio.

Una vez establecidas las tres cepas de T. cruzi en el ratón, se inocularon con tripomastigotes sanguíneos, por vía intraperitoneal diez ratones blancos (cepa NHI) con cada una de las cepas de T. cruzi. Cuando se encontraron en su más alto grado de parasitemia, se obtuvo la sangre por punción cardíaca, se colocó en solución salina para hacer una suspensión homogénea. Se contaron los tripomastigotes

en cámara de Neubauer usando una dilución 1:5 con cloruro de amonio (0.9%). De acuerdo a la cantidad que se obtuvo por mililitro, se ajustó a una cantidad apropiada para realizar las inoculaciones.

Inoculación a ratones para experimentación.

1o. Experimento.- Se inocularon seis ratones blancos (cepa CD-I) con cada una de las cepas de T. cruzi, administrando por vía intraperitoneal la suspensión de tripansomas cuyo inóculo fué de 1×10^5 tripomastigotes.

2o. Experimento.- seis ratones blancos (cepa NHI), - se inocularon con cada una de las cepas de T. cruzi, con una dosis de 1×10^5 tripomastigotes por vía intraperitoneal.

3o. Experimento.- seis ratones blancos (cepa CD-I) - se inocularon con cada una de las cepas de T. cruzi, administrando por vía intraperitoneal una dosis de 2×10^4 tripomastigotes.

Determinación de las parasitemias.- se realizó revisando los ratones de sangre periférica cada tercer día comenzando en el sexto día después de la inoculación. Se hizo un pequeño corte en la cola del animal y se tomó la muestra directamente con la pipeta para la cuenta de glóbulos blancos hasta la marca de 0.2, se aforó con cloruro de amonio hasta la marca de uno, lográndose una dilución de 1:5, enseguida se procedió a contar en la cámara de Neubauer, con objeto de determinar la cantidad de tripomastigotes sanguíneos por mililitro, con los datos que se obtu-

vieron se hicieron curvas gráficas.

Revisión de exudado peritoneal.- Al mismo tiempo de que se revisó la sangre periférica se tomó exudado peritoneal de cada ratón. Se realizó inoculando 0.5 ml. de solución salina por vía intraperitoneal a los ratones y enseguida se les extrajo el exudado, se revisó al microscopio para la búsqueda de tripanastigotes.

También se hicieron extensiones sanguíneas y frotis de exudado peritoneal, tñiéndolos por la técnica de Giemsa para observar la morfología durante diferentes etapas de la infección.

VII. RESULTADOS

PARASITEMIAS EN SANGRE

Con los resultados promedio de las parasitemias encontradas en los ratones inoculados por cada cepa de T. cruzi se construyeron en papel semilogarítmico curvas gráficas de las parasitemias, donde se relaciona el número de tripanosomas por milímetro cúbico, contra tiempo en días (fig. No.1-No.3).

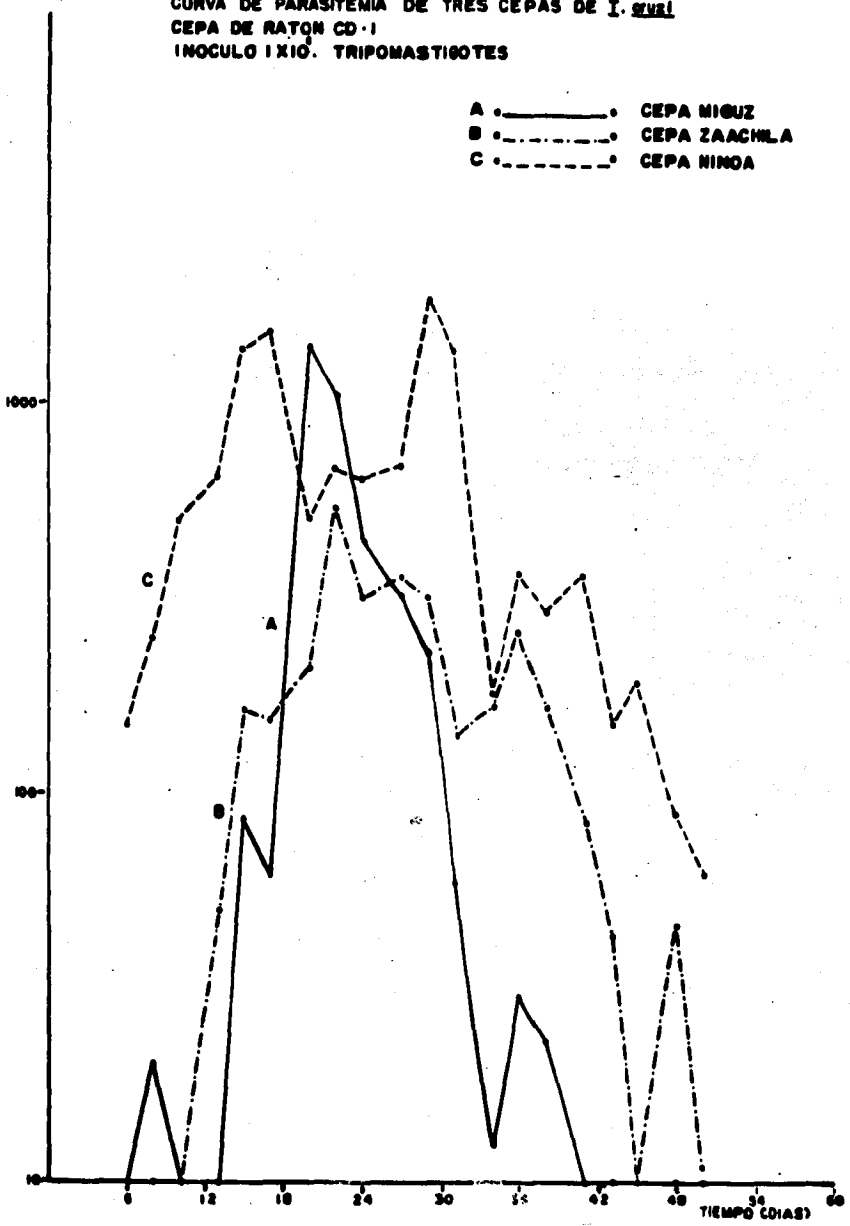
1o. Experimento (fig. No.1).- el curso de la infección fué como sigue: los primeros tripanosomas aparecieron en sangre circulante, al 3o. día en la cepa MIGUZ y ZAACHILA; y en la cepa NINOA al 6o. día. En cuanto a las parasitemias más altas se observó que la que presentó un número mayor fué la cepa NINOA con 1811 tripanosomas/mm³ a los 29 días; le sigue la cepa MIGUZ con 1394 trip./mm³ a los 20 días; mientras que la cepa ZAACHILA fué la más baja con 546.4 trip./mm³ a los 22 días.

También se observa, que las curvas que corresponden a las tres cepas son muy diferentes, en las dos primeras (MIGUZ y ZAACHILA), se puede ver que los parásitos aumentan rápidamente y descienden así mismo, hasta hacerse negativos: por lo contrario en la cepa NINOA, desde el inicio de la infección se presenta un número mayor de parásitos y en ella se aprecia un aumento significativo en el número de tripanosomas, descendiendo poco a poco, pero siempre fueron positivos.

PARASITOS / ml

FIGURA No. 1
CURVA DE PARASITEMIA DE TRES CEPAS DE I. SP
CEPA DE RATON CD-1
INOCULO IXIC. TRIPOMASTIGOTES

A ———• CEPA MIGUZ
B - - - - • CEPA ZAACHLA
C - - - - • CEPA NINOA



2o. Experimento (fig. No. 2).- se presentó el siguiente curso de la infección: los primeros tripanosomas aparecieron en la sangre circulante, en la cepa MIGUZ en el octavo día después de la inoculación; la cepa ZAACHILA al 10o. día y la cepa NINOA al 6o. día.

El número más alto de parásitos lo presentó la cepa NINOA con 703 tripanosomas/ mm^3 a los 15 días después de la inoculación; enseguida tenemos a la cepa ZAACHILA con 325 tripanosomas/ mm^3 a los 22 días; la más baja fué la cepa MIGUZ con 255 tripanosomas/ mm^3 a los 22 días.

Las curvas que corresponden a las tres cepas de T. cruzi son diferentes, pero ninguna de ellas presentó valores muy altos; la cepa MIGUZ asciende a su punto máximo y baja rápidamente de 255 tripanosomas/ mm^3 a 75 trip./ mm^3 en tres días y después poco a poco, hasta dar valores negativos; la cepa ZAACHILA, una vez que aparecen los parásitos en sangre, aumentan rápidamente hasta su punto más alto y enseguida desciende no volviendo a tener otro aumento significativo; la cepa NINOA es la primera en aparecer, con un número de 50 trip./ mm^3 , da dos aumentos notables, el primero de 703 trip./ mm^3 y el segundo de 605 trip./ mm^3 , a partir del cual empieza a disminuir poco a poco.

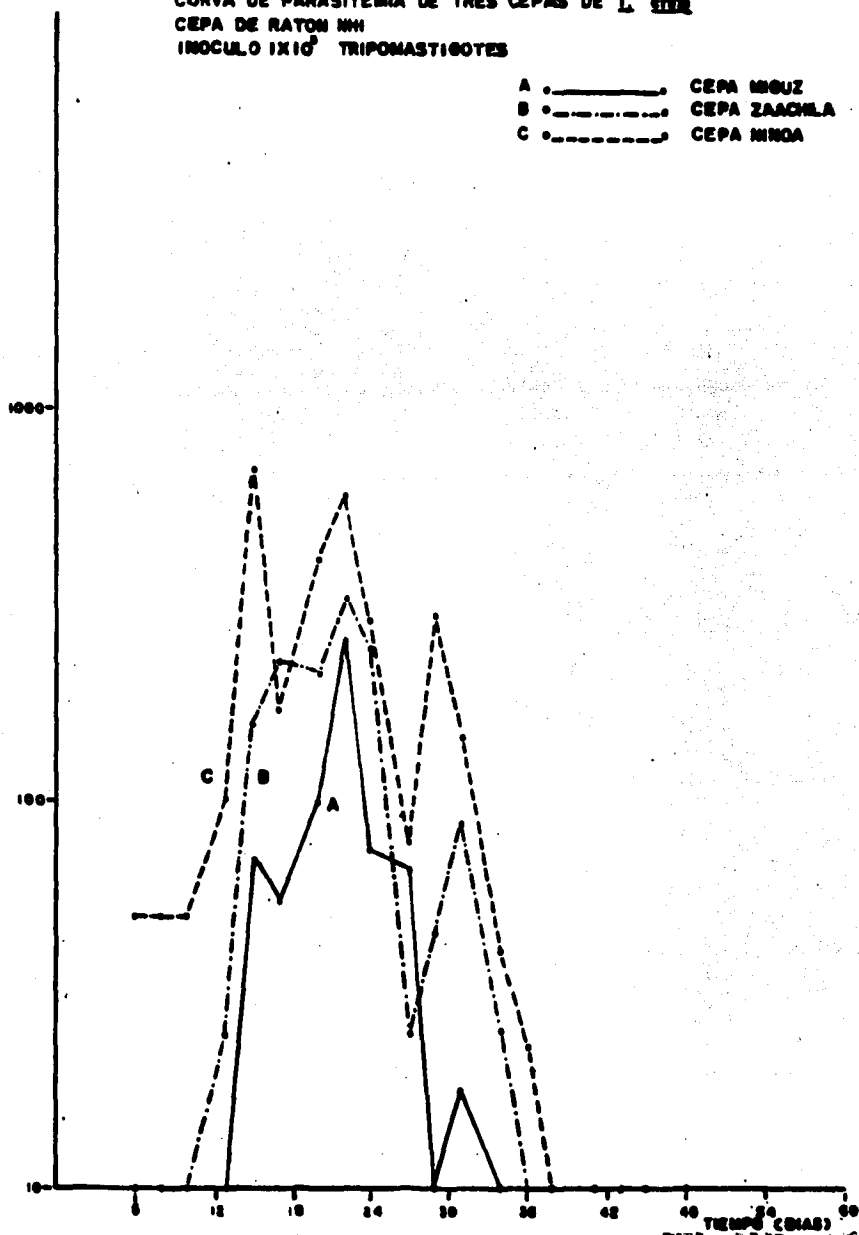
Con esta cepa de ratón y con el inoculo empleado, la cepa NINOA presenta su más alta parasitemia a los pocos días de la infección.

PARASITOS/mm³

FIGURA No. 2

CURVA DE PARASITEMIA DE TRES CEPAS DE *L. STEN*
CEPA DE RATON NH
INOCULO IXIO³ TRIPOMASTIGOTES

A CEPA MBUZ
B CEPA ZAACHLA
C CEPA MINOA



3o. Experimento (fig. No.3).- los tripanosomas desaparecieron en la sangre circulante, en la cepa MIGUZ al 8o. día después de la inoculación y en la cepa ZAACHILA y NINOA al sexto día.

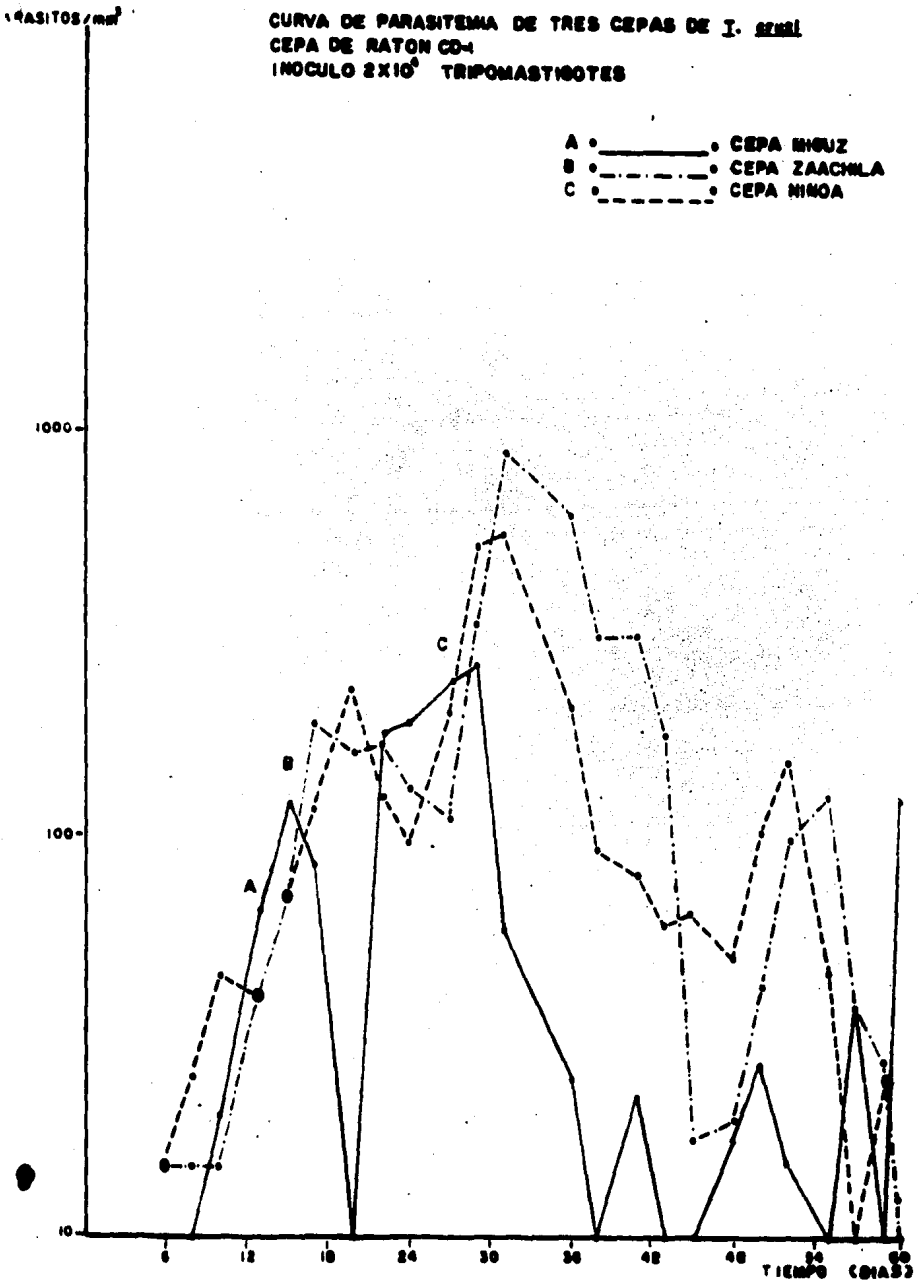
La cepa MIGUZ presentó el número más alto de tripanosomas a los 29 días con un valor de 266 trip./mm³; el de la cepa ZAACHILA fué de 892 trip./mm³ a los 31 días; y la cepa NINOA de 560 trip./mm³ a los 31 días. De acuerdo a estos resultados, la cepa ZAACHILA es la que tiene la más alta parasitemia.

En las curvas que presentan las tres cepas de T. cruzi se tiene que las que corresponden a la cepa ZAACHILA y NINOA, son muy similares, sin embargo la que representa la cepa MIGUZ es diferente ya que en ella se aprecia un aumento en el número de tripanosomas, el cual una vez alcanzado disminuye rápidamente. La cepa ZAACHILA y NINOA presentaron su más alta parasitemia en el mismo día, el número de parásitos disminuyó lentamente, siendo siempre positivos. La cepa MIGUZ fué la que tuvo la más baja parasitemia.

Comparando las más altas parasitemias de las tres cepas de T. cruzi, de acuerdo al tamaño del inóculo y la cepa de ratón utilizada tenemos lo siguiente: la cepa NINOA dió parasitemias más altas que las otras cepas, sin embargo en el 3o. Experimento, su parasitemia quedo en segundo lugar, en comparación con la cepa ZAACHILA, pero la diferencia es mínima, además de que las dos curvas son muy similares.

FIGURA No. 3

CURVA DE PARASITEMA DE TRES CEPAS DE *J. gubli*
 CEPA DE RATON CD-1
 INOCULO 2×10^8 TRIPOMASTIGOTES



La cepa ZAACHILA presentó diferentes grados de parasitemia en los tres experimentos: en el primero fué la más baja, en el segundo quedó en segundo lugar y en el tercero fué la más alta.

La cepa MIGUZ en el segundo y tercer experimento presentó la más baja parasitemia, pero en el primer experimento se puede decir que su parasitemia es alta ya que hay poca diferencia con la cepa NINOA (ver tabla No. I).

TABLA No. I.- Resultado de las parasitemias más altas durante la infección de las tres cepas de T. cruzi, de acuerdo al inóculo y a la cepa de ratón empleada.

	MIGUZ	ZAACHILA	NINOA
inóculo: 1×10^5 trip./mm ³ cepa de ratón CD-I	1394	546.4	1811
inóculo: 1×10^5 trip./mm ³ cepa de ratón NHI	255	325	703
inóculo: 2×10^4 trip./mm ³ cepa de ratón CD-I	266	892	560

PRESENCIA DE TRIPOMASTIGOTES EN EXUDADO PERITONEAL

Al inicio del curso de la infección el exudado peritoneal siempre fué negativo. A partir del 14o. día de la inoculación se observaron macrófagos granulosos y la presencia de otros leucocitos: así como también tripanosomas solo en algunos ratones. En la revesión del peritoneo se observaron escasos tripanosomas (ver tabla No.2).

TABLA No.2.- Ratones positivos a T. cruzi en exudado peritoneal y el número de tripomastigotes encontrados en ellos.

Tiempo en días	Cepa MIGUZ	Cepa ZAACHILA	Cepa NINOA
17	2 ratones + (9 trip.)	---	---
21	2 ratones + (4 trip.)	---	3 ratones + (4 trip.)
24	1 ratón + (1 trip.)	1 ratón + (2 trip.)	2 ratones + (2 trip.)
28	---	1 ratón + (3 trip.)	2 ratones + (3 trip.)
32	2 ratones + (7 trip.)	---	---
36	1 ratón + (4 trip.)	1 ratón + (1 trip.)	---
38	2 ratones + (6 trip.)	1 ratón + (1 trip.)	1 ratón + (8 trip.)

NOTA: Las observaciones se hicieron en toda la preparación con el objetivo 10X. El número entre parentesis indica: número de tripanosomas por preparación.

MORFOLOGIA

En las tres cepas de T. cruzi, siempre se observaron formas delgadas y largas durante las diferentes etapas de las infecciones. En las preparaciones teñidas los tripansomas presentaron la forma característica de "S" o "U". Se observó su núcleo situado en el centro del cuerpo y su cinetoplasto voluminoso en el extremo posterior, los cuales se tiñieron de color violeta oscuro.

VIII. DISCUSION Y CONCLUSIONES

Analizando los resultados de este trabajo, se observó que el período prepatente de las tres cepas de T. cruzi, - fué muy semejante, variando de seis a diez días. Al compararlo con otros trabajos (1, 5, 11), podemos ver que este tiempo es muy similar a los obtenidos por estos autores, - aunque algunos emplearon inoculos iguales o mayores al de nosotros.

Las curvas de parasitemia de las tres cepas de T. cruzi, al inicio de la infección sus valores fueron bajos y después aumentaron conforme avanzaron los días hasta alcanzar los puntos máximos y enseguida empezaron a disminuir.

Hay una diferencia muy marcada entre las tres cepas de T. cruzi, los niveles de parasitemia más altos fueron siempre alcanzados por la cepa NINOA, sin embargo los niveles de las otras dos cepas fueron diferentes (fig. No. I - No.3).

La variación en los niveles de parasitemia está influenciada por factores muy diversos, cuya naturaleza y efectos no son conocidos aún de modo exacto .

Entre estos factores tenemos la capacidad infectiva de la cepa, su virulencia y el número de parásitos inoculados, considerando de gran importancia para la intensidad de la infección que se logra, el tamaño del inóculo (Díaz 1934), así como el que se inyecte un cierto número de pará

sitos mínimo para producir alta mortalidad (Globe 1951). - Otras opiniones nos indican que pequeñas variaciones en la dosis del inóculo no son de importancia para la infección producida, dependiendo más bien de la cepa inoculada y de variaciones individuales del hospedero. Nosotros estamos de acuerdo con éste autor, ya que en los dos lotes de ratones se emplearon dos dosis diferentes de parásitos: en la cepa ZAACHILA su nivel más alto de parasitemia se presentó donde se inoculó una dosis menor que donde se tenía un inóculo mayor; en la cepa RIGUZ se observaron niveles iguales de parasitemia (fig. No.2 y 3) en dos de las curvas y en ellas las dosis utilizadas fueron diferentes.

Los estudios realizados por algunos investigadores - (Chagas, 1909; Díaz, 1934; Galliard y Boutet, 1952) nos indican que los paseos a través de animales sensibles, atenuan la virulencia de una cepa y ésta se readquiere cuando se inocula a otra especie animal.

Aunque Packchmanian (1947), demostró que manteniendo una cepa de T. cruzi, en cultivo durante trece años y sin hacer paseos por animales, es capaz de producir infección en animales experimentales, sin embargo no determinó cuantitativamente la virulencia. Pero este no es el caso de nosotros ya que las cepas utilizadas fueron de aislamiento reciente y con un menor número de paseos del tripanosoma de ratón a ratón.

La alta parasitemia que mostró la cepa NINOA con respecto a las otras dos cepas, indica la variabilidad en cuanto a su capacidad infectiva y a su virulencia y el que

posiblemente haya sido aislada de un caso humano; sin embargo la cepa ZAACHILA en algunos casos (fig. No.3) presentó alta parasitemia y esta cepa se aisló a partir de un triatoma; un factor importante que puede influir en este comportamiento puede ser el hábito de los triatominos, ya que algunas especies viven en contacto con el hombre en tanto que otras se alimentan de la sangre de animales, con pocas posibilidades de infectar al hombre, puesto que habitan especialmente en establos, cuevas, etc.

El comportamiento de las tres cepas de T. cruzi con respecto a la inoculación en dos cepas diferentes de ratón fué muy variable, esto puede deberse probablemente a la resistencia del animal y a su constitución genética. Pizzi y Praeger (1952), señalan que la virulencia de la cepa T aislada de Triatoma infestans fué estabilizada, comportándose de una manera uniforme a lo largo de la infección por medio de pases seriados a través de ratones de la raza C3H.

Pizzi et. al. (1949) estudiaron la influencia de la constitución genética en la resistencia de los ratones a la infección experimental por T. cruzi y nos dice que: los experimentos hechos en los ratones con cepas puras (A155, S57, Dbw y C3H) demostraron que algunos son altamente susceptibles a las infecciones experimentales por T. cruzi y otras (Rockefeller, Ay, Ak y Daab) son relativamente resistentes a la infección. Ya que solamente fué variable la constitución del ratón, se concluye que esto tiene influencia clara en la resistencia a la infección experimental por T. cruzi; también la desnutrición de los animales, tal

como lo señalan Yaeger y Miller (1960) parecen influir en el curso de la infección por T. cruzi.

Con respecto al tropismo de las tres cepas de T. cruzi hacia líquidos corporales se tiene lo siguiente: en sangre las cepas invadieron notablemente al inicio de la infección, observándose pocas tripanosomas pero después aumentaron poco a poco hasta haber gran cantidad de ellos, los cuales enseguida fueron disminuyendo hasta hacerse negativos. Los ratones inoculados con la cepa NINOA fueron los que presentaron mayor número de tripanosomas (fig. No. I) en comparación con las otras dos cepas, esto, como ya se ha venido discutiendo está influenciado por diversos factores como son la variabilidad de las cepas, su virulencia, su capacidad infectiva o las variaciones individuales del huésped.

En exudado peritoneal nunca se presentaron abundantes tripanosomas, sólo en algunos ratones se llegaron a observar unos cuantos y otros fueron negativos. Lo que si se observó fueron abundantes macrófagos a partir del 14o. día del curso de la infección, esto nos indica que su sistema inmunológico empezó a actuar contra la infección a nivel del peritoneo.

Por lo tanto podemos afirmar que las tres cepas de T. cruzi prefieren vivir en sangre que en el exudado peritoneal.

En cuanto a la morfología, en las tres cepas se observó la forma clásica de tripomastigote sanguíneo (delgados

y largos), tanto en las diferentes etapas del curso de las infecciones como entre ellas mismas.

Por los resultados obtenidos, podemos considerar que las tres cepas estudiadas en este trabajo presentan diferentes grados de parasitemia y un comportamiento diferente en dos cepas de ratón; presentando, sin embargo, un comportamiento muy similar en su tropismo hacia líquidos corporales y las mismas características morfológicas.

Se ha demostrado la gran variabilidad en el comportamiento de cada una de las distintas cepas de T. cruzi en animales de laboratorio, en base a esto se recomienda que para estudiar las características biológicas de las cepas de T. cruzi, se deben estandarizar ciertos criterios en los distintos laboratorios donde se trabaje con este parásito. Uno de los puntos que hay que tomar en cuenta es la fuente de aislamiento del parásito, tratando de que al inicio de la estandarización las diferentes cepas de T. cruzi se encuentren en el mismo punto de partida.

Antes de realizar la caracterización se deben establecer cuantos pases en animales se deben de hacer o si antes se van a cultivar en medios determinados. Por otra parte, debido a que no se conoce exactamente si se está trabajando con una sola cepa de T. cruzi, al aislarla de algún huésped o se trate de varias cepas, se propone que se realice clonación antes de efectuar estudios enfocados a la caracterización biológica o de cualquier otro tipo.

Una vez que se tengan seleccionadas las cepas que se

comporten homogéneamente, se podrían realizar estudios bien definidos sobre diferentes aspectos de la relación huésped-parásito, en diferentes laboratorios de investigación en el mundo.

Para el conocimiento de las cepas de T. cruzi en nuestro País se sugieren además de la caracterización biológica, otro tipo de estudios como son por una parte, la caracterización inmunológica, la cual nos podría agrupar las diferentes cepas de T. cruzi en tipos serológicos (serodemos) separando y conociendo los antígenos principales de cada cepa (6); y los métodos bioquímicos, en los que se han logrado clasificar las cepas de T. cruzi en base a sus Zimodemos (siguiendo un patrón enzimático) como en Brasil y Venezuela. Lo cual ha redituado avances importantes en el conocimiento de la diversidad de cepas que existen actualmente, en diversas regiones de América (14).

Los métodos inmunológicos y bioquímicos ofrecen buenas perspectivas para el estudio de las diferentes cepas de T. cruzi; sin embargo presentan ciertas desventajas ya que se emplean técnicas que no cualquier laboratorio las podría llevar a cabo, en forma rutinaria.

Finalmente, podemos decir que la caracterización biológica de las cepas de T. cruzi, ofrece también ventajas importantes, ya que es muy sencilla y se puede realizar en cualquier laboratorio, además de que nos ofrece conocimientos importantes a cerca del comportamiento del parásito en animales susceptibles de laboratorio.

IX. BIBLIOGRAFIA

1. Benavides, R. M., "Estudio comparativo de tres cepas de Schizotrypanum cruzi Chagas 1909". Tesis, Instituto Politécnico Nacional, México, (1953).
2. Bergolio, R. M. (On centenary of the birth of Carlos - Chagas). *Fac. Cien. Med. Univ. Cordoba.* 39(1-4):87-9 - (1981).
3. Biagi, P. F., Guzman, C., Navarrete, F. y cols. Enferme dad de Chagas en Tutuapan, Estado de México. *Prensa - Méd. Méx.* 22(11-12):463-465 (1958).
4. Biagi, P. F. et. al., Tetitlán, Gro. Poco endémico de - la enfermedad de Chagas. *Rev. Fac. Med.* 6:625-631(1964)
5. Bice, D. E. & Zeledon, R. Comparison of infectivity of strains of Trypanosoma cruzi (Chagas 1909). *J. Parasit.* 56:663-7 (1970).
6. *Bulletin of the world H., Organization,* 20(8):480-492 (1974).
7. Brown, H. W., "Parasitología clínica", Ed. Interamericana, ed. 4a., México (1977), pp. 52-55.
8. Cuartero, C. M., et. al., Cinco nuevos casos de la en - fermedad de Chagas en Zacatecas y Jalisco de la Repúbli ca Mexicana. *Rev. Invest. Salud Pública (Méx).* 27(1): - 29-36 (1967).
9. Deane, N. P., Brito, T., Deane, L. N. Pathogenicity to

- mice of some strains of Trypanosoma cruzi isolated from wild animals of Brazil. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo. 5:225-235 (1963).
10. Faust, E. C., Russell, F. P. & June, C. R. "Parasitología clínica", Ed. Salvat editores, ed. Ia., Barcelona (1974). pp. 69-116.
 11. Hernández, G. M. G. "Estudio comparativo de virulencia de tres cepas de T. cruzi". Tesis, Instituto Politécnico Nacional. México, (1977).
 12. Marsden, P. D. T. cruzi infections in GPI mice. I: Mortality with different doses of trypanosomas. Ann. Trop. Med. Parasit. 61:57-61 (1967a).
 13. Mazzotti, L. Resultados obtenidos por la inoculación de ratones con pequeñas y grandes cantidades de T. cruzi. Rev. Inst. Sal. Inf. Trop. 1:181-188 (1940).
 14. Miles, M. A. The epidemiology of South American Trypanosomiasis-biochemical and immunological approaches and their relevance to control. Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 17(1):5-23 (1983).
 15. Hanelbwa, A. S., et. al. Measurement of the infectivity T. cruzi in faeces of Rhodnius by Comparison of Dose-response curves. J. Gen. Microbiology. 75:339-350 (1973).
 16. Oficina Sanitaria Panamericana. Informe de un grupo de estudios sobre la enfermedad de Chagas. Publicación científica No. 195, (1970).

17. Pérez-Reyes, R. La evolución de Schizotrypanum cruzi - en ratones blancos. Ciencia (Méx.) 13:218-225 (1954).
18. Piggi, T. Inmunología de la enfermedad de Chagas: esta do actual del problema. Bol. Ofic. Sanit. Panamer. 51: 450-464 (1961).
19. Quintal, R., et. al. La enfermedad de Chagas en el es- tado de Yucatán, México. Rev. Invest. Clin. 27:255-258 (1975).
20. Romaña, G. Epidemiología y distribución geográfica de la enfermedad de Chagas. Bol. Ofna. Sanit. Panamer. - 51:390-403 (1961).
21. Salazar, S. P. M., et. al. Estudio comparativo de la - patogenicidad de cuatro cepas de T. cruzi en el ratón blanco. Rev. lat-amer Microbiol. 20:51-57 (1978).
22. Salazar. S. P. M., Tay, J., Navarreta, F. y col. Com - portamiento en el ratón de una cepa mexicana de - T. cruzi de peculiar virulencia. Rev. Inv. Salud Públi ca (Méx.) 35:37-45 (1975).
23. Silva, L. H. P. & Nussenweig, V. A T. cruzi strain hi- ghly virulent for white mice. Folio clinica et. Biolo- gica 20:191-208 (1953).
24. Tay, J., Gutierrez, C. E., Coroninas, E. R. y col. La enfermedad de Chagas en el municipio de Tuxpan, estado de Michoacán, México. Rev. Fac. Med. (Méx.) 8:263-270 (1966).
25. Tay, J., Gutierrez, M., Salazar, S. P. M. & Castillo,

- E. M. Estudio sobre seis cepas mexicanas de T. cruzi.
Rev. Inv. Salud Pública (Méx.) 33:67-76 (1973).
26. Tay, J., Salazar, S. P. M. & Ontiveros, D. El comportamiento en el ratón blanco de una cepa de T. cruzi mediante pases sucesivos en diferentes especies de triatominos. Rev. lat-amer Microbiol. 11:79-89 (1969).
27. Tay, J. & col. Evolución de T. cruzi, cepa mexicana en el huésped vertebrado, invertebrado e in vitro. Sal. - Páb. Mex. XXII:513-520 (1980).
28. Tay, J. & col. Estudio epidemiológico de la enfermedad de Chagas en el estado de Jalisco, República Mexicana. Sal. Páb. Mex. XI:145-149 (1979).
29. Trucios, O. G., Estudio de la virulencia de una cepa de T. cruzi. Tesis, I. P. N., Méx. (1965).
30. Velasco, O., Tay, J. & Luna, A. La enfermedad de Chagas en el estado de Jalisco, República Mexicana. Presentación de tres nuevos casos humanos. Rev. Invest. - Salud Pública (Méx.). 34:107-113 (1974).
31. Walkins, R. Comparison of infections produced by two strains of T. cruzi in mice. J. Parasit. 52:958-961 (1966).
32. Zavala, J., Arjona, D., Quintal, R. Enfermedad de Chagas reporte de un caso clínico. Rev. Invest. Clínica - (Méx.) 25:367-371 (1973).