



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Escuela Nacional de Estudios Profesionales  
"ZARAGOZA"

INOCULACION EXPERIMENTAL CON  
TRYPANOSOMA CRUZI EN RATAS  
Y RATONES POR VIA ORAL.

*T E S I S*

QUE COMO UNO DE LOS REQUISITOS  
PARA OBTENER EL TITULO DE:  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A :

Crescenciano Juan Aparicio Miguel

MEXICO, D. F.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

1989.



## **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.

# INDICE

	Pag.
Introducción . . . . .	1
Fundamentos del Tema . . . . .	9
Planteamiento del problema . . . . .	11
Objetivos. . . . .	12
Hipótesis. . . . .	13
Material y Métodos . . . . .	14
Métodos de Diagnóstico utilizados. . . . .	21
Diagramas de Trabajo . . . . .	22
Resultados . . . . .	25
Tablas de resultados . . . . .	26
Análisis de resultados . . . . .	31
Conclusiones . . . . .	36
Propuestas y/o Recomendaciones . . . . .	37
Resumen. . . . .	38
Bibliografía . . . . .	40
Apéndice . . . . .	42

## INTRODUCCION

La tripanosomiasis Americana o enfermedad de Chagas es una histoparasitosis de carácter endémico que afecta tanto al hombre como a mamíferos domésticos y silvestres estando ubicada en la categoría de las zoonosis.

Su agente etiológico es Trypanosoma cruzi, que se transmite a través de hemípteros hematófagos de la familia Reduviidae, en donde Triatoma rhodnius y panstrongylus, son algunos de los géneros de importancia médica. (11,12).

La enfermedad de Chagas se considera exclusivamente del continente americano, la cual afecta a muchos países a excepción de Canadá, Surinam y Guyana. (11)

En sí, su distribución geográfica comprende desde el sur de los Estados Unidos de Norteamérica hasta el norte de Argentina y recae principalmente sobre poblaciones rurales que habitan en viviendas de construcción deficientes.

Las zonas de endemia más importantes son: Brasil, Chile, Argentina, Uruguay, Paraguay, Bolivia, Ecuador, Colombia, Venezuela, Costa Rica, Panamá, Guatemala y los Estados de Zaca-tecas, Jalisco, Michoacán, Guerrero, Chiapas, Oaxaca, Tabasco, Nayarit y Yucatán en la República Mexicana (12).

En México, esta enfermedad se conoce desde 1940, cuando Mazzotti reportó por vez primera dos casos humanos procedentes de Tenjomalco, Oaxaca. A partir de entonces, se han notificado más de 200 casos humanos agudos y crónicos por hallazgo de Trypanosoma cruzi y varios miles más mediante diagnóstico serológico, gracias a trabajos realizados por varios investigadores (Tay, Salazar, Zavala, Goldsmith y otros) quienes desde entonces han venido trabajando sobre este padecimiento realizando diversos estudios encaminados a conocer la distribución

e importancia de la enfermedad de Chagas en la República Mexicana.

Se conocen zonas endémicas del país en las que se han encontrado casos humanos de enfermedad de Chagas grave, algunos de los cuales han concluido con la muerte. Se han aislado cepas muy virulentas cardiotrópicas para animales de laboratorio sobre todo de la Mixteca alta y baja de Oaxaca, la costa chica y grande de Guerrero, Jalisco, Michoacán, Zacatecas, Veracruz y otras (10).

La distribución geográfica de los triatomínicos transmisores de I. cruzi en el país es muy amplia, ya que prácticamente en todos los estados de la República Mexicana se han encontrado triatomínicos infectados por I. cruzi y conviviendo en la habitación humana.

I. cruzi es un protozoario de la familia Trypanosomatidae, durante su ciclo de vida presenta dos huéspedes: un huésped vertebrado y un huésped invertebrado. Además es un organismo pleomórfico ya que presenta diversas fases observadas al microscopio electrónico y en preparaciones teñidas con Giemsa. La definición de estas fases se basa en:

- 1) La forma general de la célula
- 2) La posición del cinetoplasto con respecto al núcleo
- 3) La región de donde emerge el flagelo a partir de la bolsa flagelar.

Las fases de I. cruzi son:

Amastigote.- Mide entre 2 y 5  $\mu$ m de diámetro, tiene forma redonda u oval con un gran núcleo, cinetoplasto y un flagelo muy reducido e incluido totalmente en el citoplasma; constituye la fase replicativa intracelular. Para su estudio bioquímico son obtenidos de cultivos celulares o bien de órganos de ratón infectados. (4,9).

Epimastigote.- Es de forma alargada, mide entre 20 y 40  $\mu$ m. de largo, el cinetoplasto se localiza en posición anterior y cercano al núcleo, presenta un flagelo libre que se origina del cinetoplasto y una membrana ondulante corta. Esta fase se localiza en el intestino medio de los transmisores que al multiplicarse por fisión binaria a lo largo de su eje da lugar a los tripomastigotes metacíclicos. También se observa en la fase logarítmica de crecimiento en medios de cultivo.

Tripomastigote.- Es alargado y el cinetoplasto ha migrado a la parte posterior al núcleo, presenta flagelo libre y membrana ondulante a lo largo del cuerpo. Esta fase se puede encontrar en la sangre de los huéspedes mamíferos, donde no se reproducen, y en el intestino posterior, de los triatomíneos como tripomastigote metacíclico.

El cuadro clínico presentado por I. cruzi varía en función de la virulencia de la cepa, cantidad del inóculo, la inmunidad, estado nutricional y edad del individuo afectado.

Se distinguen tres fases principales de la enfermedad de Chagas:

Fase aguda.- A menudo caracterizada por chagoma, fiebre y hepato esplenomegalia, dura dos o tres semanas y va acompañada de un aumento pronunciado de organismos "in situ", la mayoría de las veces va acompañada de alta parasitemia.

Fase latente.- No se observa enfermedad clínica, pero si una parasitemia baja, al parecer debido a la constante multiplicación de parásitos en varios órganos.

Fase crónica.- Se caracteriza por miocarditis progresiva o dilatación irreversible de vísceras huecas y es muy difícil demostrar la presencia de parásitos. (10, 12).

La forma habitual de transmisión de T. cruzi en áreas endémicas es por medio del insecto hematófago infectado (triatoma) que después de alimentarse en un huésped vertebrado, deja sobre la piel o mucosas sus deyecciones conteniendo tripomastigotes metacíclicos o infectivos. Estos parásitos penetran a través de la piel y las membranas mucosas invadiendo las células adyacentes.

En el interior de las células los parásitos se redondean y se diferencian a amastigotes que se reproducen repetidamente por fisión binaria; luego de varias generaciones los amastigotes se transforman a tripomastigotes, abandonando la célula hospedadora por ruptura de la misma y pasando a la circulación desde donde invadirían nuevas células reiniciando el ciclo.

El insecto (huésped transmisor) cuando se alimenta sobre un mamífero infectado (huésped vertebrado) ingiere con la sangre los tripomastigotes circulantes. Estos sufren un proceso de diferenciación a medida que progresan por el tubo digestivo del transmisor.

Como epimastigote se divide activamente en el intestino medio del insecto, hasta que a nivel de la ampolla rectal del insecto se diferencia a tripomastigote metacíclico que es la fase infectante para los huéspedes vertebrados. (4,11) Fig. 1.

La infección chagásica puede transmitirse también por transfusión sanguínea, por vía transplacentaria y por vía digestiva; recientemente se ha postulado la posibilidad de transmisión por trasplante de órganos.

La transfusión sanguínea se considera como el mecanismo de transmisión más importante después de la transmisión por medio de los transmisores, cada la endemia en América y el frecuente uso de la sangre en la hemoterapia. (2,11).

## CICLO BIOLÓGICO DE *Trypanosoma cruzi*

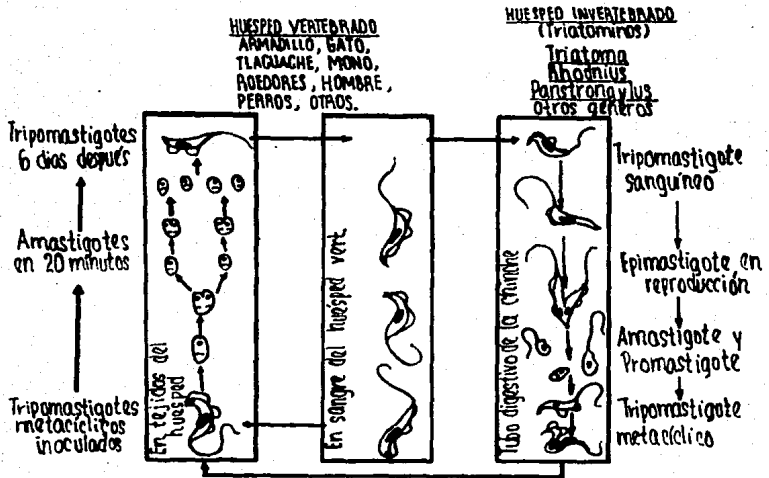


Fig. 1

Fuente: Tomado del Biagi, 1976 (modificado M. Cortés, comunicación personal).



Cerisola y Col. (1972) verificaron que el riesgo de transmisión aumenta proporcionalmente con el número de transfusiones. Estos mismos autores comprobaron que el parásito puede permanecer viable hasta por lo menos 18 días en las condiciones en que habitualmente se conserva la sangre en los bancos de sangre.

Esta vía de transmisión se puede evitar descartando a los donadores serológicamente reactivos para esta enfermedad o tratando químicamente la sangre con violeta de genciana. (4,9).

La transmisión por vía trasplacentaria alcanza de 2-3% de los hijos de madres chagásicas. Esta forma de transmisión ocurre cuando los tripomastigotes sanguíneos atraviesan el epitelio trofoblástico y van a parasitar macrófagos de placenta. Aunque también se han visto parásitos en epitelio amniótico del cordón umbilical y en membranas extreplacentarias. (1,14).

Experimentalmente se ha demostrado que esta transmisión depende de la patogenicidad de la cepa del parásito y de la capacidad macrofágica de la placenta. (14).

Ha comenzado a preocupar una forma de transmisión potencial ligada al trasplante de órganos. En este caso, si el donador está infectado los parásitos existentes en el órgano podrían originar una infección en el receptor inmunosuprimido (4).

El hecho de haber encontrado pacientes con enfermedad de Chagas sin que halla sido posible determinar la vía de transmisión y no presentar signos locales de entrada del parásito, ni haber recibido transfusiones sanguíneas hace surgir como probable la transmisión de Trypanosoma cruzi por vía oral. (8,11)

La infección por vía oral se conoce a partir del reporte de Brumpt en 1913 (citado por Ortega y Jay, 1972) quién administró por vía bucal heces de triatomas infectados por T. cruzi a

un ratón joven, logrando así la infección. De igual modo, Kofoed y Wood (1933) y Cardoso (1938) (citados por Ortega y Tay, 1972) infectaron diferentes mamíferos, principalmente ratones por la misma vía.

Díaz, en 1940 (citado por Schenone hijo y Cols. 1982), informa que infectó a un gato adulto alimentándolo con ratones infectados con I. cruzi demostrando al parásito por examen en sangre fresca.

Además comenta este autor la importancia de la vía bucal como mecanismo de transmisión de I. cruzi en la Naturaleza, debido a los hábitos de algunos mamíferos, especialmente predadores e insectívoros, que tienen como fuente principal de alimento a roedores e insectos, como los triatomas, que pueden estar infectados con I. cruzi.

Mayer (1961), infectó ratas, ratones, perros y gatos utilizando leche contaminada con heces de Triatoma infestans capturadas en viviendas. Estimo que el hombre puede infectarse mediante alimentos y/o utensilios contaminados con heces de triatomas, y los animales, por la costumbre que tienen de lamerse, pueden comer las heces depositadas sobre sus cuerpos.

Ortega y Tay (1972), infectaron experimentalmente a ratones blancos por diferentes vías, logrando la infección por vía bucal tanto con tripomastigotes sanguíneos como con tripomastigotes metacíclicos. Estos autores concluyen que la dosis del inóculo es determinante para lograr la infección.

Miles (1972) realizó experimentos acerca de la transmisión de I. cruzi a través de leche materna de ratones, observando tripomastigotes en la leche de hembras lactantes durante la fase aguda de la infección, aunque informa que es raro que la adquieran los ratones amamantados por estas hembras.

Leinson y Cols. (1980), informan que en la zona amazónica es poco frecuente la tripanosomiasis americana debido a la ausencia de triatomas con hábitos domiciliarios; sin embargo existen casos humanos, los cuales implican en ocasiones, a miembros de una misma familia siendo muy probable que pudieran haber adquirido la infección por vía bucal. Para comprobar la posibilidad, los autores realizaron un estudio de sobrevivencia de T. cruzi en diversos alimentos, como la leche pasteurizada y comestibles cocidos, tales como arroz, carne molida, pescado y frijoles, comprobando así, que resisten temperaturas entre 26° y 28°C durante tres horas. Estos materiales se utilizaron posteriormente para alimentar a 30 ratones, los cuales adquirieron la infección en su totalidad.

## FUNDAMENTOS DEL TEMA

La enfermedad de Chagas tiene un gran impacto sobre la salud pública Latinoamericana debido a la amplia distribución geográfica, elevada prevalencia, disminución de la esperanza de vida y particularmente sobre la calidad de ésta ya que con frecuencia tal enfermedad es invalidante lo que a su vez repercute desfavorablemente sobre la economía de los pueblos que la sufren. (13)

Según cálculos de las Organizaciones Panamericana y Mundial de la Salud para 1981, Latinoamérica tenía 24 000 000 de enfermos y 65 000 000 en riesgo de contraer la enfermedad. Para algunos países como Argentina, Brasil y Venezuela existen datos concretos sobre la magnitud del daño, factores de riesgo, trascendencia socioeconómica e incluso existen Programas Nacionales contra la enfermedad de Chagas, sin embargo para Centroamérica y para México en particular, los datos conocidos y sobre todo los manejados por los expertos son muy imprecisos. (9,13)

Las infecciones por Trypanosoma cruzi en el hombre son difíciles de evaluar porque la mayoría de las infecciones ocurren en zonas rurales en donde los servicios médicos son deficientes o no existen, se estima que la mortalidad durante la fase aguda es de 2 a 10% con gran impacto en los niños.

Aparentemente esta parasitosis es mantenida de por vida, una vez adquirida la infección. (1,6)

En algunas zonas de Sudamérica la enfermedad de Chagas se considera como la causa más importante de afecciones cardíacas; en Brasil ésta forma de la enfermedad causa, según algunos autores, la muerte repentina en adultos jóvenes aparentemente sanos (1,9)

El papel que juegan como reservorios de Trypanosoma cruzi los animales ya sean domésticos o silvestres, es un hecho muy conocido; que contribuye a que la enfermedad se siga propagando.

Los perros y gatos ocupan el primer lugar en el ambiente doméstico, con tasas de infección que oscilan entre 8 y 50% para los perros y entre 12 y 24% para los gatos.

Entre los animales silvestres que se han encontrado infectados naturalmente en los distintos países se citan: Primates, marsupiales, carnívoros, zorras, zorrigüeyes, ardillas, murciélegos, armadillos, mapaches, ratas de campo, etc. (11) Todo esto aunado al bajo nivel socioeconómico y cultural de las zonas rurales afectadas, contribuye a que la enfermedad de Chagas permanezca endémicamente en una región cuando las condiciones ambientales son favorables.

Es frecuente también que en áreas endémicas exista un gran número de triatomas domiciliarios, donde viven y se multiplican abundantemente, los cuales tienen el hábito de alimentarse durante la noche, para lo cual bajan por las paredes o se dejan caer sobre sus víctimas. Por lo general tienen preferencia por picar la cara, aunque pueden picar cualquier parte del cuerpo descubierta. La succión dura alrededor de 20 minutos pudiendo tomar de 1 a 3 ml. de sangre según la especie, por lo general la picadura es indolora. Algunas especies cuando terminan de alimentarse defecan simultáneamente.

La relación de convivencia entre triatoma domiciliario con animales domésticos y el hombre, hacen posible que en dichas viviendas la transmisión se efectúe de animal doméstico a hombre y de hombre a hombre mediante el triatoma, logrando cerrar y mantener un ciclo biológico de T. cruzi.

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La forma de transmisión de la enfermedad de Chagas ha sido motivo de gran interés para muchos investigadores desde el descubrimiento de la enfermedad.

Analizando tales estudios se puede decir que el hombre puede infectarse con Trypanosoma cruzi a través de piel escarificada, mucosa bucal, mucosa nasal, conjuntiva, por transfusiones sanguíneas y por vía transplacentaria, independientemente de que el parásito provenga de la materia fecal de los transmisores naturales o bien de sangre y orina de animales reservados.

La transmisión natural en áreas endémicas es la de mayor importancia para el hombre y ésta es iniciada, durante la picadura de los triatomas, que dejan simultáneamente sus deyecciones infectadas con tripomastigotes metacíclicos, los cuales se introducen por la herida y las mucosas provocando una tumoreación en pocos días (Chagoma). Después de tres semanas, los parásitos se encuentran en la sangre (tripomastigotes), pero desaparecen de la sangre periférica al introducirse en los tejidos adquiriendo la forma de amastigote.

A raíz de las experiencias de algunos investigadores sobre la transmisión por vía oral, demostrada principalmente, en ratones de experimentación, hace suponer que es muy probable que en la naturaleza se lleve a cabo este tipo de transmisión debido a los hábitos alimenticios de algunos mamíferos, especialmente predadores e insectívoros; además esta demostrado que entre los mismos transmisores existe canibalismo.

Sobre las bases de la anteriormente expuestas creemos que es importante contribuir a esclarecer la forma de transmisión por vía digestiva de este parásito empleando una cepa de Trypanosoma cruzi aislada de un caso humano de enfermedad de Chagas en territorio nacional.

OBJETIVOS

- 1.- Comprobar experimentalmente si la vía oral es una posible forma de transmisión de la enfermedad de Chagas.
- 2.- Observar la infectividad en ratas y ratones de una cepa mexicana de Trypanosoma cruzi aislada de un caso humano.
- 3.- Ensayar la inoculación oral con las formas de Trypanosoma cruzi provenientes de cultivos en Gelosa Sangre, deyecciones de triatominos infectados, triatominos completos infectados, sangre y tejidos de ratones infectados.
- 4.- Mantener en el laboratorio una colonia de Triatoma pallidipennis.

HIPOTESIS

Si la transmisión de la enfermedad de Chagas por vía oral es posible en la naturaleza, entonces inoculando por vía oral formas infectivas de Trypanosoma cruzi a ratas y ratones, estos presentarán los parásitos en sangre.



## MATERIAL Y METODOS

### I.- MATERIAL

#### 1.- Material Básico

Jeringas desechables de 1, 3 y 5 ml.  
Cámara de Neubauer  
Guantes para cirujano  
Pipetas Pasteur  
Mecheros Bunsen y Fisher  
Cristalizadores de vidrio  
Pipetas graduadas de 5 ml.  
Matraces Erlenmeyer de 250, 500 y 1000 ml.  
Vasitos de vidrio  
Tubos para centrifuga de plástico de 13x100  
Instrumental para disección  
Porta y cubreobjetos

#### 2.- Equipo

Centrifuga, sorvall, refrigerador  
Estufa de incubación a 28°  
Microscopio, Zeiss, I, 25X  
Balanza analítica Sartorius

#### 3.- Reactivos

Agar base sangre (Bioxon)  
BHI (Bioxon)  
Fenol (J.T. Baker) GR  
Citrate de sodio (Sigma) GR  
NH<sub>4</sub>Cl (J.T. Baker) GR  
NaCl (J.T. Baker) GR

#### 4.- Soluciones

Acido pícrico diluido  
Fenol al 5%  
Citrate de sodio al 3.8%  
NH<sub>4</sub>Cl al 0.9%  
NaCl al 0.85%  
Alcohol - yodo p/v

5.- MATERIAL BIOLÓGICO:

5.1. Ceba CID de Trypanosoma cruzi proveniente de Putla Oaxaca, obtenida por xenodiagnóstico, el 6 de agosto de 1982, a partir de un hombre de 17 años de edad.

5.2. Cien ratas Wistar, hembras, distribuidas en lotes de 10, con un peso de 70-80g.

5.3. Cien ratones hembras de la cepa MHI, distribuidos en lotes de 10, con un peso entre 18-20g, aproximadamente.

5.4. Las ratas y ratones utilizados fueron del mismo peso, sexo, edad y libres de infección.

5.5. Colonia de Triatoma pallidipennis.

II.- METODOS:

1.- Mantenimiento de la cepa.

Para mantener la viabilidad y pureza de la cepa, ésta se conservó en:

1.1.- Pases sucesivos ratón-ratón.

Se realizaron pases cada 15-20 días, por vía intraperitoneal con 0.1 ml de NaCl al 0.85% estéril y 0.1 ml de sangre con tripomastigotes sanguíneos provenientes de ratones con el te parasitemia.

1.2.- Medios de cultivo.

La cepa también se mantuvo en los medios de cultivo Agar sangre y caldo BHI, utilizando como fase líquida NaCl al 0.85% y 0.95% respectivamente, realizando pases cada 10 a 15 días con

el fin de utilizar medios juvenes y favorecer el crecimiento de la cepa. Estos medios fueron incubados a 28°C.

1.3.-En el transmisor.

Se utilizaron ninfas de I, II, III, IV, V, estadios y adultos de Triatoma pallidipennis, las cuales fueron infectadas haciéndoles picar a ratones con altas parasitemias, una vez alimentadas fueron guardadas en frascos limpios etiquetados y mantenidos a temperatura del laboratorio.

2.- Mantenimiento de una colonia de Triatoma pallidipennis.

Los transmisores se mantuvieron en frascos de vidrio tapa recubierta con malla para facilitar la alimentación y la aereación de los triatominos. En cada frasco se colocan discos de papel absorbente en el fondo y un pedazo de cartulina negra en pliegues, el cual sirve de soporte para la distribución de los insectos.

Los triatominos son mantenidos a temperatura y humedad del laboratorio. Los huevecillos de los insectos se colocan en frascos pequeños y se mantienen a 26°C hasta la eclosión, una semana después las ninfas de 1er estadio se alimentan directamente sobre un ratón inmovilizado mediante una pequeña jaula de alambre y colocado dentro de un cristelizador para que los triatominos piquen durante 20-25 minutos.

Las ninfas del primero, segundo, tercero, cuarto y quinto estadios y adultos, se alimentan también cada 15-20 días sobre un conejo de la siguiente forma:

Se coloca un conejo en un soporte, el cual tiene un agujero en una de sus caras por el que sale el abdomen del conejo al atarlo sobre este. Una vez inmovilizado se corta el pelo del abdomen y las ninfas son colocadas en un cristelizador pequeño al cual se le coloca un pedazo de cartulina en pliegues y tapado

con tela de tul detenida con una liga para evitar que los insectos se escapen, posteriormente es colocado debajo del abdomen del conejo, las ninfas suben por la cartulina plegada atraídas por el calor del animal picando a través de la tela de tul.

Una vez alimentadas se colocan en frascos limpios de boca ancha y previamente etiquetados; el tamaño de estos depende de la edad y cantidad de insectos que se desee almacenar, los frascos son mantenidos a temperatura y humedad del laboratorio.

### 3.- Inoculación por vía oral a ratas y ratones con tripomastigotes sanguíneos.

Se utilizaron lotes de 10 individuos (ratas y ratones) previo ayuno de 24 horas, los tripomastigotes sanguíneos se obtuvieron de sangre periférica de ratones infectados con Trypanosoma cruzi.

La sangre es obtenida por punción cardíaca, utilizando Citrato de Sodio al 3.8% como anticoagulante, posteriormente se realiza un conteo en cámara de Neubauer (dilución 1:20), utilizando como diluyente  $NH_4Cl$  0.9%.

Con las cantidades ya conocidas de tripomastigotes presentes en la sangre, se somete a los animales de experimentación a tomar la sangre infectada, previo ayuno de 24 horas. (diagrama 1)

### 4.- Inoculación por vía oral a ratas y ratones con tripomastigotes metacíclicos.

Las formas metacíclicas de T. cruzi se obtuvieron a partir de triatomíneos, para lo cual se procedió de la siguiente manera: Se escogen ninfas de IV, V estadio y adultos de Triatoma pallidipennis, las cuales fueron infectadas haciéndoles picar a ratones con altas parasitemias, una vez alimentadas son guardadas en frascos limpios, etiquetados y mantenidas a temperatura del laboratorio.

Después de 20-25 días, se efectúa un examen microscópico del contenido intestinal, obtenido por comprensión suave del extremo posterior del abdomen del insecto, los triatomas que presentaron tripomastigotes en las deyecciones fueron utilizados para la inoculación oral de ratas y ratones.

Para obtener una mayor cantidad de deyecciones, los triatomos son alimentados sobre un conejo. Una vez alimentados se colocan en frascos pequeños colocados en una cámara húmeda para que defequen, posteriormente se procede a la obtención de las deyecciones, utilizando como diluyente, solución salina estéril. Con una jeringa se deposita un volumen dado (previo recuento en cámara de Neubauer dilución 1:20) en la cavidad oral de los animales de experimentación. (diagrama 2).

5.- Inoculación por vía oral a ratas y ratones con epimastigotes provenientes de medios de cultivos.

Los epimastigotes se obtuvieron de los medios de cultivo, gelosa sangre y BHI. Los medios de cultivo son inoculados en condiciones de esterilidad con 2-3 gotas de sangre de ratón infectado, los medios son mantenidos en estufa de incubación a 28°, después de 10-15 días se examinan al microscopio realizando una observación en fresco; la fase líquida de los cultivos positivos se coloca en un tubo y se centrifuga durante 10 minutos, se tira el sobrenadante y se resuspende el precipitado con solución salina estéril, posteriormente se realizan dos lavados a 3000 rpm por 10 min.

Una vez lavado el concentrado celular, la pastilla que se forma es diluida con sol. salina estéril y con previo recuento en cámara de Neubauer (dilución 1:20); posteriormente con una jeringa se deposita cantidades ya conocidas en la cavidad oral de los animales de experimentación. (diagrama 1).

**6.- Inoculación por vía oral a ratas y ratones con triatomínoos vivos infectados.**

Se escogieron ninfas con dos semanas de ayuno de II y III estadios, dejando que picaran a un ratón infectado con Trypanosoma cruzi. Después de 10 a 15 días de la alimentación se revisan las heces de los insectos al microscopio y los que presentan tripomastigotes son considerados como positivos y utilizados para la inoculación oral de los animales de experimentación.

Los animales de experimentación fueron sometidos a un ayuno de 48 horas permitiéndoles ingerir únicamente agua. Los animales se colocaron individualmente y por separado, en frascos limpios de boca ancha a cada uno se le dió de 2-3 triatomas vivos y completos. (diagrama 2).

**7.- Inoculación por vía oral a ratas y ratones con vísceras de ratones en estado crónico.**

Se infectaron ratones por vía intraperitoneal, los cuales se guardaron hasta alcanzar la fase crónica de la enfermedad, aproximadamente en dos meses comprobada la ausencia de tripomastigotes en sangre, por medio de un examen directo, se procedió a sacrificar a los animales y por disección se obtuvieron los siguientes órganos: hígado, pulmón, corazón y bazo.

Los animales se separaron e individualmente se colocaron en frascos limpios de boca ancha. A cada ratón previo ayuno de 48 horas, se le alimentó con los fragmentos de las vísceras a utilizar, las cuales fueron previamente lavadas con NaCl al 0.85% para eliminar los restos de sangre. (diagrama 3).

Los órganos que se utilizaron, debieron ser procesados histológicamente con el objeto de buscar posteriormente nidos de amastigotes, tomando como muestra pequeños trozos de bazo, hígado, pulmón y corazón de los animales parasitados.

No se pudo comprobar la presencia de nidos de amastigotes, ya que por falta de tiempo no se llevó a cabo la realización de la técnica, por lo tanto los resultados obtenidos no se pueden considerar como válidos, además de que únicamente se efectuaron en ratones.

## METODOS DE DIAGNOSTICO UTILIZADOS

Para demostrar la parasitemia presente en los animales de experimentación sometidos a la infección con I. cruzi, se emplearon dos métodos de diagnóstico parasitológico:

### A. METODO DIRECTO.

El examen directo fué practicado a los animales de experimentación entre 8 y 10 días después de la inoculación oral. Para esto, a cada animal se le sacó una gota de sangre de la punta de la cola, la cual se examinó al microscopio en busca de tripomastigotes, aquellos que presentaron parásitos en sangre fueron considerados como positivos y fueron marcados para su identificación. Los animales que mostraron ser negativos se siguieron revisando de la misma manera cada 8 días hasta completar un mes.

### B. XENODIAGNOSTICO.

Se practicó a los animales de experimentación que resultaron negativos después de un mes de la inoculación oral, para el cual el animal es sometido a la picadura de 5-10 triatomas limpios de II y III estadios. Los insectos se colocaron en frascos individuales que fueron etiquetados de acuerdo a la identificación de cada animal de experimentación.

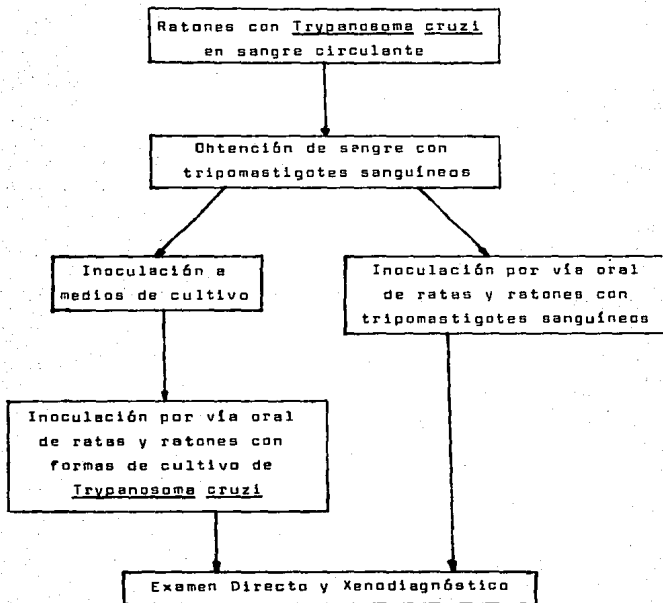
Después de 20-25 días, se revisaron las heces de los insectos, anotando como positivo aquellos que mostraron tripomastigotes metacíclicos.

Como medida de comprobación de la infectividad de los inóculos utilizados siempre se infectaron de 2-3 ratones control, por vía intraperitoneal a los que se les comprobó la parasitemia entre 15 y 25 días posteriores a la inoculación.

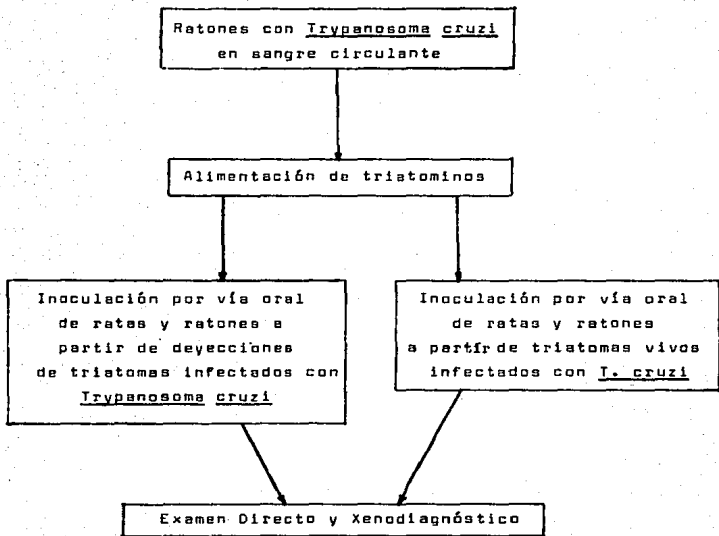


DIAGRAMAS DE TRABAJO

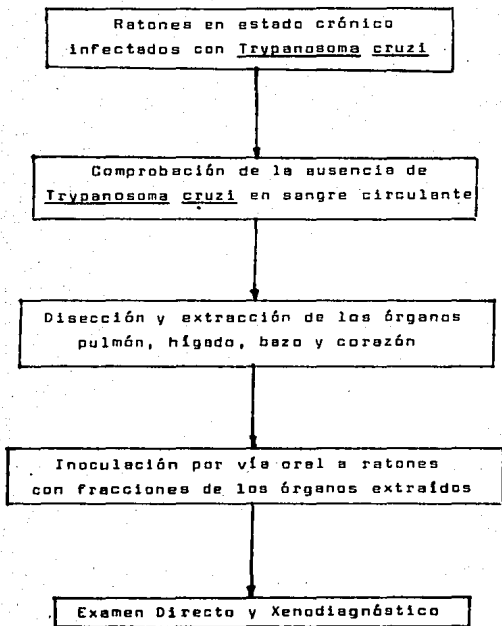
(1)



(2)



(3)



## RESULTADOS

A continuación se presentan los resultados del presente trabajo, en una serie de tablas que nos muestran los porcentajes de infectividad obtenidos en los animales de experimentación, el tipo de inóculo que viene expresado tanto en cantidad como en fase parasitaria, el número de animales que se expusieron a la infección, que en total fueron 200; los cuales fueron distribuidos en lotes de 10 para cada experimento y por duplicado.

En la tabla 1, se muestran los resultados de los animales que fueron inoculados oralmente con fase de tripomastigotes sanguíneos, la infectividad obtenida fué de 10% en ratones y 10% en ratas.

Los resultados de los animales inoculados oralmente con formas de cultivo de I. cruzi se muestran en la tabla 2, donde la infectividad encontrada fué de 70 y 10% respectivamente en ratones y de 0% en ambos lote de ratas.

La tabla 3, indica los resultados de los animales inoculados con triatomos vivos infectados con I. cruzi, en donde la infectividad en ambos lotes fué de 40 y 60% en ratones y 50% en ratas.

En la tabla 4, se observa la infectividad obtenida, cuando se inocula oralmente con deyecciones de triatomas infectados con I. cruzi, la infectividad obtenida fué de 50 y 40% en ratones y de 100 y 40% en ratas.

La tabla 5, muestra los resultados de los animales inoculados con una mezcla de fragmentos de vísceras, en donde la infectividad fué nula en ambos lotes de ratones.

TABLAS DE RESULTADOS

TABLA Nº 1

Animales inoculados oralmente con  
formas sanguíneas de Trypanosoma cruzi

Especies	Inóculo Tripomastigotes sanguíneos	% Positivos		
		Nº Animales	Sangre <sup>1</sup>	Xenodiag <sup>2</sup>
Ratones	$2.5 \times 10^4$	10	10	0
Ratones	$4.0 \times 10^4$	10	10	0
Ratas	$17 \times 10^4$	10	10	0
Ratas	$14 \times 10^4$	10	10	0

(1) A los 30 días de la inoculación

(2) A los 20 a 25 días de iniciado el Xenodiagnóstico

TABLA Nº 2

Animales inoculados oralmente  
con formas de cultivo

Especies	Inóculo Epimastigotes	Nº Animales	% Positivos	
			Sangre <sup>1</sup>	Xenodiag <sup>2</sup>
Ratones	87X10 <sup>4</sup>	10	70+	0
Ratones	15X10 <sup>4</sup>	10	10++	0
Ratas	114X10 <sup>4</sup>	10	0++	0
Ratas	114X10 <sup>4</sup>	10	0++	0

(1) A los 30 días de la inoculación

(2) A los 20 a 25 días de iniciado el Xenodiagnóstico

+ Cultivo de 25-30 días

++ Cultivo de 5-8 días

TABLA Nº 3

Animales alimentados con triatomos  
completos vivos infectados

Especies	Nº de Triatomos	Nº Animales	% Positivos	
			Sangre <sup>1</sup>	Xenodiag <sup>2</sup>
Ratones	2 a 3 triatomos c/u	10	40	0
Ratones	2 triatomos c/u	10	60	0
Ratas	2 triatomos c/u	10	50	0
Ratas	3 triatomos c/u	10	50	0

(1) A los 30 días de la inoculación

(2) A los 20 a 25 días de iniciado el Xenodiagnóstico

TABLA Nº 4

Animales inoculados oralmente con  
deyecciones de triatomino infectados

Especies	Inóculo Tripomastigotes metacíclicos	Nº Animales	% Positivos	
			Sangre <sup>1</sup>	Xenodiag <sup>2</sup>
Ratones :	$2 \times 10^4$	10	50	0
Ratones	$1 \times 10^4$	10	40	0
Ratas	$6 \times 10^4$	10	100	0
Ratas	$1 \times 10^4$	10	40	0

(1) A los 30 días de la inoculación

(2) A los 20 a 25 días de iniciado el Xenodiagnóstico



TABLA Nº 5

Animales inoculados oralmente con vísceras de  
animales infectados con Trypanosoma cruzi

Especies	Inóculo	Nº Animales	% Positivos	
			Sangre <sup>1</sup>	Xenodiag <sup>2</sup>
Ratones	Visceras <sup>+</sup>	10	0	0
Ratones	Visceras <sup>+</sup>	10	0	0

(1) A los 30 días de la inoculación

(2) A los 20 a 25 días de iniciado el Xenodiagnóstico

(+) Mezcla de fragmentos de bazo, pulmón, hígado y corazón

## ANALISIS DE RESULTADOS

En las series de experimentos efectuados se pudo demostrar que la vía oral es una forma de transmisión de T. cruzi, u excepción del experimento en el que se les alimentó con vísceras provenientes de animales infectados y de epimastigotes provenientes de medios de cultivo jóvenes de 5-6 días. Los experimentos efectuados consistieron en utilizar como inóculos, diferentes fases del ciclo biológico de T. cruzi; tales como tripomastigotes sanguíneos, tripomastigotes metacíclicos, formas flageladas de cultivo y órganos infectados con T. cruzi. Aunque el inóculo en cada experimento fue muy variable el grado de parasitemia observado en cada lote de animales infectados resultó elevada, siendo mayor cuando se utilizan formas metacíclicas.

Cuando se inoculó con tripomastigotes sanguíneos, se obtuvo un 10% de infección (tabla 1) en ambos lotes de ratones, siendo mayor a la obtenida por Zeledon (1977), quien logró 3% de infectividad utilizando tripomastigotes sanguíneos.

Nattan Larrier (1921) obtuvo infección en el 66.7% de ratones a los que hacía ingerir sangre con tripomastigotes sanguíneos

Por otro lado, Marsden (1967), Ortega y Toy (1972), sugieren que se necesitan dosis altas, por lo general  $4 \times 10^4$  tripomastigotes para lograr la infección experimental por esta vía, lo cual no ocurrió en nuestro caso ya que se obtuvo infección con dosis menores a las reportadas por estos autores.

La infectividad en ratas fue de 10% (tabla 1), siendo menor a la obtenida por Zeledon (1977), quien logró 18.3% y 36.8% de infectividad al inocular a ratas al utilizar tripomastigotes sanguíneos por esta vía.

Al utilizar como inóculo las formas flageladas provenientes

de medios de cultivo, la infección obtenida fue de 70% y 10% en ratones (tabla 2), como se observa el porcentaje de infección obtenido en el primer lote de ratones es muy elevado, esto se debe a que se inoculó una mezcla de epimastigotes y tripomastigotes metacíclicos, debido a que el cultivo utilizado se dejó mucho tiempo en incubación. Esta observación se demostró por un frotis del inóculo, teñido con Giemsa.

Este porcentaje fue mayor al obtenido por Zeledón y Cols. (1977) quienes obtuvieron un 68% al utilizar formas de cultivo, es posible que Zeledón haya utilizado también cultivos en los cuales, se encontraba una mezcla de tripomastigotes metacíclicos y epimastigotes, lo cual se observa en cultivos de más de 10 a 15 días y de esta manera lograr la infección, pero en nuestro caso se pretendía comprobar si los epimastigotes son formas infectivas.

Por eso en el siguiente lote de ratones se inoculó con un cultivo de ocho días, obteniendo un 10% de infección (tabla 2) debido a que posiblemente ya se encontraban tripomastigotes metacíclicos en el cultivo que se utilizó para inocular.

La infección en ambos lotes de ratas fue de 0% (tabla 2) esto se debe a que se inoculó con medios de cultivo de 5-6 días en la cual se observó únicamente epimastigotes al realizar un frotis teñido con Giemsa del inóculo empleado.

Esto demuestra que los epimastigotes no son la fase infectiva, ya que con el mismo inóculo se inocularon dos ratas por vía intraperitoneal que fueron usadas como testigos, las cuales no presentaron infección al utilizar el mismo inóculo empleado en la inoculación oral.

La infección obtenida, cuando se utilizaron los triatomas

vivos infectados, fue de 40% y 60% en ratón, y de 50% en ambos lotes de ratas (tabla 3). Siendo mayor a la obtenida por Vaeger (1971), quien obtuvo infección de 2 de 7 zariñeyas a través del consumo de dos triatomas infectados, y mayor a la obtenida por Schenone y Col. (1982) quienes solo lograron 20% de infectividad en ratas.

El porcentaje de animales infectados obtenido, con las formas de tripomastigotes metacíclicos proveniente de deyecciones fue de 50 y 40% respectivamente en ratones y de 100% y 40% en ratas (tabla 4).

El porcentaje de infectividad en ratón fue menor a la obtenida por Zeledon (1977) quien logró 84% de infección en ratones al usar formas provenientes de deyecciones.

El porcentaje de infección en ratas, fue igual al obtenido por Mayer (1961), quien obtuvo 100% de infección en ratas jóvenes y mayor al obtenido por Zeledon y Col. (1977) quienes lograron 11.1% al utilizar formas provenientes de deyecciones.

Se puede observar que al utilizar tripomastigotes metacíclicos provenientes de deyecciones de triatomas infectados y de triatomas infectados, el porcentaje de infectividad es mayor en comparación con las otras formas ensayadas, esto es debido a que los tripomastigotes metacíclicos son las formas infectivas, cuando la transmisión de la tripanosomiasis se lleva a cabo a través del transmisor.

También se observa que el porcentaje de infección es variable, es posible que la diferencia se encuentre en que al utilizar deyecciones, los inóculos contienen una alta concentración de tripomastigotes metacíclicos, en cambio cuando el ratón ingiere al triatoma vivo, ingiere una mezcla de tripomastigotes y epimastigotes que se encuentran en el intestino del transmisor.

Otra parte de los experimentos consistió en inocular pedazos de vísceras de ratones infectados con I. cruzi, los cuales deben contener nidos de amastigotes ya que a estos ratones se les había comprobado que la parasitemia había desaparecido y que los tripomastigotes sanguíneos ya posiblemente estarían formando nidos de amastigotes en órganos como bazo, hígado y corazón, para ello, se someten pequeñas muestras de estos órganos, inoculados a un examen histológico.

El experimento se realizó sin comprobar la presencia de amastigotes, ya que no fue posible esperar el resultado de dicho examen, por lo tanto al no haberse obtenido infectividad en los animales de experimentación y al no haberse comprobado la presencia de amastigotes en los órganos inoculados, los resultados carecen de confiabilidad.

Marsden (1967), realizó un estudio en el que hizo ingerir a un grupo de ratones, partes de órganos infectados con I. cruzi. Reportó que solo en dos animales de 33 se demostró el parásito en la sangre periférica. Realizó un estudio histológico de los animales que sirvieron de inóculo y no encontró nidos de amastigotes en sus tejidos.

Díaz en (1940) mostró la posibilidad de transmisión de I. cruzi entre los animales carnívoros a través de comer la carne infectada de la presa. En relación a estos autores, surge la posibilidad de infección por vía oral usando tejidos infectados.

En cuanto a la colonia de Triatoma pallidipennis mantenida en el laboratorio de acuerdo al método descrito, resultó ser un método útil y eficaz para el crecimiento y obtención de los diferentes estadios de triatomas así también se obtuvo una cantidad suficiente para satisfacer las necesidades de cada experimento.

En nuestros experimentos realizados ambos métodos de diagnóstico utilizados resultaron ser buenos, dado que el método directo detecto la mayoría de los animales parasitados con parásitos en sangre periférica y el xenodiagnóstico nos confirmó que al no existir parásitos en sangre periférica estos resultan ser negativos, es por ello que todos los xenodiagnósticos aplicados a los animales de experimentación negativos por el método directo, resultaron ser negativos.

Se encontraron diferencias en los resultados obtenidos con los reportados en la bibliografía, y consideramos que esto puede ser posible, debido a la susceptibilidad de los animales de experimentación, a las cepas utilizadas (tanto de animales como de I. cruzi), los inóculos utilizados, la técnica de inoculación y algunos otros factores.

#### CONCLUSIONES

- 1) De acuerdo a los resultados obtenidos, se confirma experimentalmente que la vía oral es posible como forma de transmisión de Trypanosoma cruzi.
- 2) La cepa CID de Trypanosoma cruzi resultó infectiva utilizando diferentes fases del parásito.
- 3) La inoculación experimental por vía oral en los animales de experimentación, resulto en general fácil de realizar siendo de gran utilidad el ayuno a que fueron sometidos antes de la inoculación.
- 4) Triatoma pallidipennis, resultó ser buen transmisor de T. cruzi.
- 5) La colonia de Triatoma pallidipennis se pudo mantener en el laboratorio por el método descrito, obteniendo un buen rendimiento de los diferentes estadios del insecto.

#### PROPUESTAS Y/O RECOMENDACIONES

Para continuar los estudios sobre la transmisión de I. cruzi por vía digestiva, se requiere probar un número mayor de cepas, principalmente las cepas de I. cruzi aisladas de transmisores que conviven en la habitación humana y cepas provenientes de casos humanos de enfermedad de Chagas.

La infección por vía digestiva debe ser experimentada en mamíferos domésticos que actúan como reservorios de I. cruzi.

Para lograr la inoculación por vía oral es conveniente dejar al lote de animales de experimentación en ayuno de 48 horas para que ingieran con facilidad el inóculo completo.

La inoculación por vía oral debe ser siempre experimentada en lotes de animales del mismo peso, edad y sexo, contando con un buen abasto.

Vehicular I. cruzi en alimentos comunes para estos animales, y dárselos como comida, con el fin de observar si dichos animales se infectan y al mismo tiempo probar la sobrevivencia de I. cruzi en estos alimentos.



R E S U M E N

Este estudio fue encaminado a demostrar experimentalmente que la vía oral es una posible forma de transmisión de Trypanosoma cruzi, utilizando una cepa de T. cruzi, aislada de un caso humano de enfermedad de Chagas en territorio mexicano y un transmisor que frecuentemente convive en la habitación humana de poblaciones rurales en el país.

Para el propósito antes mencionado se utilizó la cepa CID de T. cruzi y diferentes lotes de ratas y ratones que fueron distribuidos en lotes de 10 para cada experimento y por duplicado, los cuales fueron inoculados por vía oral con:

- a) Sangre de ratones infectados
- b) Formas de tripanosomátido provenientes de medios de cultivo.
- c) Triatomas completos infectados
- d) Deyecciones de triatomas infectados
- e) Mezcla de vísceras de ratones infectados

Para comprobar si los animales de experimentación se infectaron con la cepa y con las diferentes fases del parásito se recurrió a dos métodos de diagnóstico parasitológico:

- a) Búsqueda directa de parásitos en sangre periférica a partir del sexto día de la inoculación.
- b) Xenodiagnóstico, que se practicó a los animales que después de un mes de inoculados se mantenían negativos cuando se observó su sangre por el método directo.

La infección por vía oral obtenida con las fases de T. cruzi fue de:

- 1) Tripomastigotes sanguíneos: 10% en ratones y 10% en ratas
- 2) Formas de cultivo: 70 y 10% en ratones y 0% en ratas
- 3) Triatomas vivos infectados: 40 y 60% en ratones y 50% en ratas.

- 4) Tripomastigotes metacíclicos: 50 y 40% en ratones y 100 y 40% en ratas.
- 5) Visceras de ratones infectados: 0% en ratones

De los resultados obtenidos se concluye que la vía oral, cuando menos en condiciones experimentales, es una posible forma de transmisión de T. cruzi, en virtud de que las fases del parásito infectaron a los animales de experimentación, a excepción del lote de ratas inoculados con formas de cultivos de 5-6 días y del lote inoculado con una mezcla de vísceras de ratones infectados.

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

B I B L I O G R A F I A

- 1) BECK, J.W. Parasitología Médica. 3a. Ed., México. Edit. Interamericana, pp 63-68. 1984.
- 2) CERISOLA, A.J., RABINOVICH, A., ALVARES, M. y DI CORLETO, A. C. Enfermedad de Chagas y la Transfusión de Sangre. Bol of Sanit. Panam. Sept; 73(2): 203-218. 1972.
- 3) LAINSON, R., SHAW, J.J. and NAIFF, R.D. Chagasdisease on the Amasoh: Speculations on transmisión per os. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo. Nov-Dic; 22(6): 294-297. 1980.
- 4) Manual del Instituto Nacional de Diagnóstico e Investigación de la Enfermedad de Chagas "Dr. Mario Fatala Chaben", s/e. Argentina, pp 71. 1985.
- 5) MAYER, H.F. Infección experimental con Trypanosoma cruzi por vía digestiva. Anal. Inst. Med. Reg. 5: 43-48. 1961.
- 6) MARSDEN, PD. Trypanosoma cruzi infections in DFI mice. 1. Mortalit with. different doses of trypanosomes. Ann of Trop. Med. and Parasit; 61:59-61. 1967.
- 7) NEGhme, A., ALFARO, E., REYES, H y SCHENONE, H. Método para la crianza de laboratorio de Triatoma infestans Bol. Chile. Parasiti., 22:107-122. 1967.
- 8) ORTEGA, M. y TAY, J. Ensayo experimental de diferentes vías de infección por Trypanosoma cruzi en el ratón blanco. Bol. Chile. Parasit. 27:6-11 1972.
- 9) REYES, P. Enfermedad de Chagas en México. Arch. Insti. Cardiol. Méx. 54:1-2. 1984.
- 10) SALAZAR, S.P. Aspectos Clínicos de la Enfermedad de Chagas en México. VIII Congreso Nacional de Parasitología (CONAPAR 88). Pachuca, Hgo. 146-148. 1988.

- 11) SCHENONE H. y COLS. Infección experimental de ratas con Trypanosoma cruzi por vía oral. Bol. Chile. Parasit. 37:2-9. 1982.
- 12) TAY, Z.J. Aspectos Epidemiológicos de la Enfermedad de Chagas en México VIII Congreso Nacional de Parasitología (CONAPAR 88). Pachuca, Hgo. 145-146. 1988.
- 13) VELAZCO, C.O. Importancia de la Enfermedad de Chagas en México. Rev. Lat. Amer. Microb. 28:275-283. 1986.
- 14) ZELEDON, R. y COLS. Experimental infection of mice with blood, culture and insect forms of Trypanosoma cruzi by different routes. Protozoology. March; 3: 95-101. 1977.
- 15) ZUNA, H.F. y COLS. Estudio prospectivo de la transmisión de Trypanosoma cruzi por vía sanguínea en Bolivia. Ann Soc. Belge Med. Trop. 65 (Suppl): 1:107-113. 1985.

A P E N D I C E

Agar Base Sangre:

40 grs. de Agar base sangre

1000 ml. de agua destilada

Esterilizar a 15 Lb. durante 15 minutos

Enfriar a temperatura de 50-56°C, y adicionar sangre de borrego desfibrinada al 15% y antibióticos.

BHI: Base sólida (100 ml. de agua como diluyente).

Dextrosa al 1%

Agar Bacteriológico al 2%

BHI al 3.7%

Fase líquida

NaCl 0.85%, para agar base sangre

Biotriptosa 2.6% para BHI

Fenol: 5%

5 grs. Fenol

95 ml de agua destilada.

NaCl 0.85%

0.85 grs. de NaCl

99.15 ml de agua destilada

Citrato de Sodio al 3.8%

3.8 grs. de citrato de sodio

96.2 ml de agua destilada

Cloruro de amonio al 0.9%

0.9 grs. de cloruro de amonio

99.1 ml de agua destilada