

302877

18
Dej



UNIVERSIDAD MOTOLINIA A. C.

ESCUELA DE QUIMICA

Con Estudios Incorporados a la U. N. A. M.

**CARACTERIZACION BIOLOGICA DE DOS
CEPAS DE Trypanosoma cruzi UTILIZANDO
COMO MODELO EXPERIMENTAL AL
COBAYO (Cavia cobayo).**

T E S I S
Para obtener el Titulo de
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
p r e s e n t a

TERESA ELOISA (VAZQUEZ LEGARIA

FALLA DE ORIGEN

MEXICO, D. F.

1995

FALLA DE ORIGEN



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.

EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZO EN EL LABORATORIO DE ENTOMOLOGIA DEL DEPRATAMENTO DE PARASITOLOGIA DE LA ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLOGICAS DEL I.P.N. BAJO LA ASESORIA DEL Dr. BENJAMIN NOGUEDA TORRES. EL PROYECTO RECIBIO APOYO PARCIAL DE LA DIRECCION DE ESTUDIOS DE POSGRADO (D.E.P.I) DEL I.P.N. A TRAVES DEL PROGRAMA DE INVESTIGACION ESTUDIO DE LOS TRANSMISORES Y DEL AGENTE ETIOLOGICO DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS"

A MIS PADRES Y HERMANOS: SRA. EMMA L DE
VAZQUEZ, SR. ING. MANUEL VAZQUEZ B, JOSE
MANUEL, ANGELICA, EMMA, ARA Y OSCAR. POR
SU CARÍÑO, APOYO Y DISPOSICION QUE FUERON
INDISPENSABLES PARA TERMINAR ESTE TRABAJO.

A MIS PROFESORES, EN PARTICULAR:
C.F.B. GRACIELA SOSA GARCIA.
M en C. RICARDO ALEJANDRE AGUILAR.

CON ADMIRACION Y GRAN APRECIÓ AL DR.en C.
BENJAMIN NOGUEDA TORRES POR SU CONFIANZA
Y AYUDA DESINTERESADA QUE HICIERON POSIBLE
UNA META MAS EN MI VIDA.

A MI ESPOSO DR. JOSE A. PALMA ARZOLA
CON AMOR Y RESPETO, POR SU PACIENCIA
AL TIEMPO INVERTIDO.

A MIS HIJOS: ERICKA JOCELYN, JOSE AN-
TONIO Y MARCO ANTONIO, COMO UN EJEMPLO
DONDE EL TIEMPO NO EXISTE.
LA SUPERACION, PERSEVERANCIA Y CONFIAN
ZA EN TI MISMO TE HARA ALCANZAR TUS
METAS.

UN AGRADECIMIENTO ESPECIAL A Q.F.B. EVANGELINA BARBOSA ROMERO POR ESTAR PRESENTE EN ESTE TRABAJO PROFESIONAL. TU IMPULSO EN EL MOMENTO PRECISO, LAS PALABRAS DE ALIENTO QUE TODOS NECESITAMOS SIEMPRE ESCUCHE DE TI. UN AMIGO ES LA MANO QUE SIEMPRE TOMA LA TUYA, NO IMPORTA DONDE ESTES.

GRACIAS POR CREER EN MI.

CON CARINO PARA EL SR. BIOLOGO ELISEO RUIZ B. POR SU ENTUSIASMO Y CONOCIMIENTOS ME ORIENTARON A LLEGAR AL FINAL. " TODO EMPIEZO TIENE FINAL " .

GRACIAS ELISEO.

GRACIAS DIOS MIO POR HABER PUESTO EN MI CAMINO MOMENTOS DIFICILES Y A LA VEZ PERSONAS QUE ME ORIENTARON. PERO LO MAS IMPORTANTE PARA MI SON LAS FUERZAS QUE DURANTE TODA MI VIDA ME HAS DADO PARA SEGUIR ADELANTE.
GRACIAS A TI DIOS MIO, LOGRE ALCANZAR ESTA META.

FRACASO NO SIGNIFICA QUE JAMAS LOGRAREMOS NUESTRAS METAS... SIGNIFICA, QUE TARDAREMOS EN ALCANZARLAS Y QUE NECESITAMOS MAS ESFUERZO. ¡EL VERDADERO FRACASO NO ES MAS QUE UNA NEGATIVA ACTITUD MENTAL !

ROBERT. H. SHULLER.

I N D I C E

CAPITULO I		INTRODUCCION	
1.1	Planteamiento del problema		1
1.2	Objetivo		2
CAPITULO II		ANTECEDENTES	
2.1	Biología de <i>Trypanosoma cruzi</i>		5
2.2	La enfermedad de Chagas		6
2.3	Caracterización de cepas de <i>Trypanosoma cruzi</i>		6
2.4	El agente etiológico		7
2.5	La transmisión de la enfermedad		8
2.6	Biología del parásito en el huésped vertebrado		8
2.7	Características clínicas		9
2.8	Mecanismos patógenos		10
2.9	Características biométricas del cobayo		12
CAPITULO III		PARTE EXPERIMENTAL	
3.1	Diagrama		15
3.2	Material y Métodos		16
3.2.1	Material biológico		16
	3.2.2 Material de laboratorio		16
	3.2.2.1 Material diverso		16
	3.2.2.2 Equipo		16
	3.2.2.3 Reactivos		16
3.3	Metodología		17
3.4	Desarrollo experimental		19
CAPITULO IV		RESULTADOS Y DISCUSION	
4.1	Resultados		22
4.2	Discusión		28
CAPITULO V		CONCLUSIONES	34
BIBLIOGRAFIA			36

CAPITULO I

INTRODUCCION

1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Trypanosoma cruzi es el agente etiológico de la tripanosomiasis americana o enfermedad de Chagas. Existen evidencias experimentales en relación a la heterogeneidad de las poblaciones de *T. cruzi*, que van desde variaciones morfológicas, fisiológicas y patogénicas que han permitido identificar cepas diferentes y por eso se ha propuesto considerarlo como el "complejo cruzi" en lugar de una simple especie (Velasco, 1991). Por lo anterior es importante la caracterización de cepas dentro de las investigaciones básicas en la clínica y epidemiología de la enfermedad de Chagas (W.H.O. 1985).

Entre las características morfológicas propuestas por la World Health Organization (1985), y que frecuentemente se citan en los trabajos de investigación sobre *T. cruzi* están:

- 1) Morfología típica de los tripomastigotes sanguíneos.
- 2) Curva de parasitemia.
- 3) Organotropismo
- 4) Virulencia
- 5) Susceptibilidad a fármacos

En el presente trabajo se pretende determinar las primeras tres características biológicas de la lista anterior.

Comunmente los estudios sobre *T. cruzi* utilizan al ratón como modelo experimental, pero el empleo de este modelo tiene algunas limitaciones, sobre todo que sólo se pueden obtener hasta 3 ml de sangre infectada con el parásito. El uso del cobayo como modelo experimental ofrece ventajas como serían el obtener grandes cantidades de sangre infectada y períodos de parasitemia más prolongados, por lo anterior se decidió evaluar el empleo de el cobayo en el estudio de cepas de *T. cruzi*.

1.2 OBJETIVOS:

OBJETIVO GENERALES:

Evaluar el comportamiento de dos cepas de *Trypanosoma cruzi* (cepa NINOA y cepa MIGUZ) aisladas de humanos en cobayos, así como el empleo del cobayo como modelo experimental de la infección.

OBJETIVOS ESPECIFICOS:

- a) Determinar la dosis mínima de tripomastigotes sanguíneos que producen una parasitemia patente en cobayos.
- b) Conocer el curso de la parasitemia.
- c) Demostrar histológicamente el organotropismo de las cepas en cobayos que cursan la etapa crónica de la infección.

CAPITULO II

ANTECEDENTES

2.1 BIOLOGIA DE *T. CRUZI*

Trypanosoma cruzi, es el agente causal de la enfermedad de Chagas, (Carcavallo, 1988) zoonosis de la que se calcula existen de 16 a 18 millones de personas infectadas y una población de 240 000 en riesgo de sufrir la infección (W.H.O., 1990). No existe vacunas para prevenir la infección, ya que se ha demostrado que existen fenómenos de autoinmunidad; la quimioterapia actual no origina cura parasitológica en la mayoría de los casos evaluados y en cambio provoca problemas iatrogénicos; el control de los transmisores es sumamente costoso para países con crisis financieras permanentes (W.H.O., 1986; W.H.O., 1990). En el sureste de México existen localidades que se pueden considerar endémicas para este padecimiento (Velasco, 1986).

Por lo anterior, el estudio de estrategias que permitan el control de la enfermedad de Chagas es prioritario en los países en donde el padecimiento es endémico.

Una de las áreas de mayor interés es el desarrollar modelos animales para el estudio de la enfermedad de Chagas, con el fin de caracterizar los aislados que se realicen de *T. cruzi* en cada país, ya que existen evidencias de la gran heterogeneidad en la población del parásito, por lo que métodos de caracterización de cepas es importante dentro de las investigaciones básicas en la clínica y epidemiología de la enfermedad (W.H.O. 1985).

2.2 LA ENFERMEDAD DE CHAGAS

La infección en seres humanos por *Trypanosoma cruzi* provoca la enfermedad conocida como enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana. Desde su descubrimiento (hecho por el Dr. Carlos Chagas) esta zoonosis ha marcado un hito dentro de la Parasitología, ya que fue el primer caso en que primero se describe al agente etiológico y al transmisor y finalmente a la enfermedad que ocasiona el parásito (Soberón y Peláez, 1977).

2.3 CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DE *T. CRUZI*

Brener (1985) propuso caracterizar a los distintos aislados del parásito en los siguientes niveles:

1. Caracterización biológica: Que comprende aspectos como el estudio del curso de la infección en diferentes huéspedes en los que se debe evaluar:

1.1 Morfología típica de los tripomastigotes sanguíneos y curvas de parasitemia.

1.1.2 Infectividad a células

1.1.3 Organotropismo

1.1.4 Susceptibilidad de las formas sanguíneas a suero inmune

1.1.5 Virulencia

1.1.6 Sensibilidad a fármacos

2. Caracterización inmunológica: En donde la caracterización de antígenos es uno de los principales estudios.

3. Caracterización bioquímica. En donde el estudio de zimodemos, esquizodemos, unión a lectinas y sondas con DNA son las pruebas más frecuentes (en nuestro trabajo se realizó la caracterización biológica parcial de dos aislados de *T. cruzi*).

2.4 EL AGENTE ETIOLOGICO

El agente etiológico de la tripanosomiasis americana, es *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*, protozoario que pertenece a la orden Cinetoplastida, cuyo ciclo de vida requiere de un insecto y un mamífero alternadamente. En ambas etapas su especificidad de huésped es muy baja, y así como parasita numerosas especies de los géneros *Triatoma*, *Panstrongylus* y *Rhodnius* (y otros miembros de la familia Reduviidae) y puede infectar a un gran número de especies de mamíferos (Gable, 1970).

2.5 LA TRANSMISION DE LA ENFERMEDAD:

T. cruzi es transmitido en condiciones naturales por insectos hematófagos pertenecientes a la subfamilia Triatominae (insecta: Reduviidae). Estos transmisores mantienen en la última porción el tracto digestivo a tripomastigotes metacíclicos, etapas infectantes, las cuales son eliminadas a través de las heces e infectan al hombre por contaminación en lesiones de piel o membranas intactas de mucosas (Velasco, 1991.). El segundo mecanismo en importancia epidemiológica, para la transmisión del parásito es a través de transfusiones sanguíneas (W.H.O. 1990).

2.6 BIOLOGÍA DEL PARASITO EN EL HUESPED VERTEBRADO:

Cualquiera que sea la ruta de infección, los tripomastigotes penetran dentro de una variedad de células, principalmente células musculares y macrófagos; ellos cambian a la fase de amastigote, los cuales rápidamente se multiplican dentro de la célula y posteriormente se diferencian en tripomastigotes. El flagelado entonces rompe la célula huésped y después de circular en la sangre por un período variable invade otra célula para realizar su ciclo intracelular. La multiplicación exponencial intracelular del parásito resulta en un incremento gradual de la parasitemia, la cual es frecuentemente demostrable por preparaciones en fresco de

sangre. La mayoría de los pacientes son capaces de desarrollar una respuesta inmune que controla la proliferación del parásito lo cual conduce a la parasitemia a un nivel subpatente, pero no logra la respuesta inmune eliminar del todo al parásito (Nogueira, 1980; Braun, 1985).

2.7 CARACTERISTICAS CLINICAS:

La enfermedad de Chagas presenta tres fases o formas clínicas:

1. Fase aguda, que se presenta en el 5% de los sujetos infectados.
2. Fase latente.
3. Fase crónica, que se hace aparente en el 30-40% de los casos (Brener, 1987). La enfermedad en la fase aguda comprende la primoinfección parasitaria, se caracteriza por un período de parasitemia patente, su duración varía de 1 a 2 meses y se caracteriza clínicamente por signos de puerta de entrada del parásito (Chagoma de inoculación, signo de Romana), por fiebre edema, aumento del tamaño de los nódulos linfáticos y una miocarditis severa, al menos en sus fases iniciales, emparentada con la presencia del parásito dentro de las fibras cardiacas. En la mayoría de los casos los síntomas clínicos desaparecen y es seguida por una aparente recuperación de la miocarditis. En pacientes que no han estado bajo quimioterapia la mortalidad infantil es del 2 al 8% (Brener, 1987).

2) Fase latente: También llamada fase indeterminada ya que su duración es por períodos largos e incluso toda la vida. Se presenta en la mayoría de los casos (50 - 60%), aparentemente no existen síntomas y la serología es positiva por lo que el diagnóstico en esta etapa es casual.

3) Fase crónica: Alrededor del 20 - 30% de los casos desarrollan dentro de los 10 a 20 años de la infección una miocardiopatía de severidad variable (cardiomegalia); finalmente, 8% a 10% presentan una forma digestiva de la enfermedad, caracterizada por dilataciones patológicas del intestino grueso como resultado de la deservación de células ganglionares en el plexo mesentérico parasimpático, conduciendo a la reducción en el peristaltismo y a la acumulación del contenido intestinal. Un cierto porcentaje de pacientes presenta una asociación de manifestaciones cardiacas y digestivas (Brener, 1987).

2.8 MECANISMOS PATOGENOS:

Quizás el problema más controvertido es la identificación de los mecanismos por los cuales se originan las lesiones que se presentan en los órganos durante la fase crónica, después de un período latente muy largo y cuando los parásitos son muy escasos. Los daños iniciales observados en la enfermedad aguda están

inducida por el protozooario. El edema intersticial podría reducir la capacidad de difusión del oxígeno, de tal manera que se crearían condiciones anóxicas que serían el origen de la muerte de las células vecinas. Sin embargo estudios en ratones infectados han mostrado que la velocidad e intensidad del daño miocárdico es mayor que el que podría ser relacionado con este mecanismo. El daño a los tejidos parece estar relacionado con una infiltración celular y como hay una ausencia de parásitos se han propuesto los siguientes mecanismos para explicar el desarrollo de las lesiones de la fase crónica:

a) La liberación de metabolitos por el parásito, que normalmente excretan o secretan al medio, los cuales podrían actuar como toxinas dañando a las terminales neuronales, principalmente a las del corazón y tubo digestivo y en etapas avanzadas puede ser causante de la cardiopatía y del daño en el tracto digestivo.

b) Hipersensibilidad a productos del parásito lo que desencadenaría un proceso inflamatorio con el daño subsecuente al tejido.

c) Evolución de respuesta autoinmune como resultado de la interacción huésped-parásito. Este mecanismo ha sido apoyado con gran número de hechos experimentales en los que destaca la detección de anticuerpos específicos contra células neuronales y nervios periféricos en la mayoría de los pacientes chagásicos.

Los anticuerpos anticélulas neuronales podrían ser particularmente importantes para explicar la denervación que ocurre en ganglios del corazón y el sistema autónomo del tracto digestivo. Sin embargo la correlación entre esos anticuerpos contra tejidos del huésped y la morbilidad ha sido considerada como circunstancial y no existe una demostración definitiva para esta interrelación. Cualquiera que sea el mecanismo de patogenicidad, en todos los casos se producen cardiopatías agudas o crónicas que acortan el tiempo de vida de los pacientes (Brener, 1987; Braun, 1985)

2.9 CARACTERÍSTICAS BIOMETRICAS DEL COBAYO

El cobayo, también conocido como conejillo de indias, es un animal frecuentemente empleado en los laboratorios de investigación debido a que ofrece ventajas como son:

- a) Su corto tamaño, con respecto al conejo;
- b) Su fácil manejo, son más dóciles que los ratones y
- c) Se puede extraer mayor cantidad de sangre que la que se extrae a un ratón, este último aspecto es muy importante para nuestro grupo de trabajo ya que se pretende obtener la mayor cantidad de sangre a partir de animales infectados con *T. cruzi* para estudios relacionados a la transmisión por transfusiones sanguíneas y estudios sobre xenodiagnóstico artificial.

En el Cuadro 1 se resumen sus principales datos biométricos:

Cuadro No. 1 DATOS BIOMETRICOS DEL COBAYO

CICLO ESTRAL	16 días
PERIODO DE PUBERTAD	3-4 semanas
EDAD EN QUE CONCIBEN	3 meses
PERIODO DE GESTACION	63-70 días
DESTETE	19 días
CONSUMO DE ALIMENTO	80 g/kg de peso/día
PESO AL NACER	100 g
TEMPERATURA CORPORAL	38.6° C
FRECUENCIA CARDIACA	280 Pulsaciones/min.
HEMATOCRITO	42
HEMOGLOBINA	12.3 mg/100
LEUCOCITOS	10,000 mmc
COMPOSICION QUIMICA DE LA SANGRE:	
Calcio	5.3 meq/l
Sodio	145.0 meq/l
Glucosa	96 mg/100 ml
Albumina	3.2 g/100 ml
Globulinas	2.2 g/100 ml

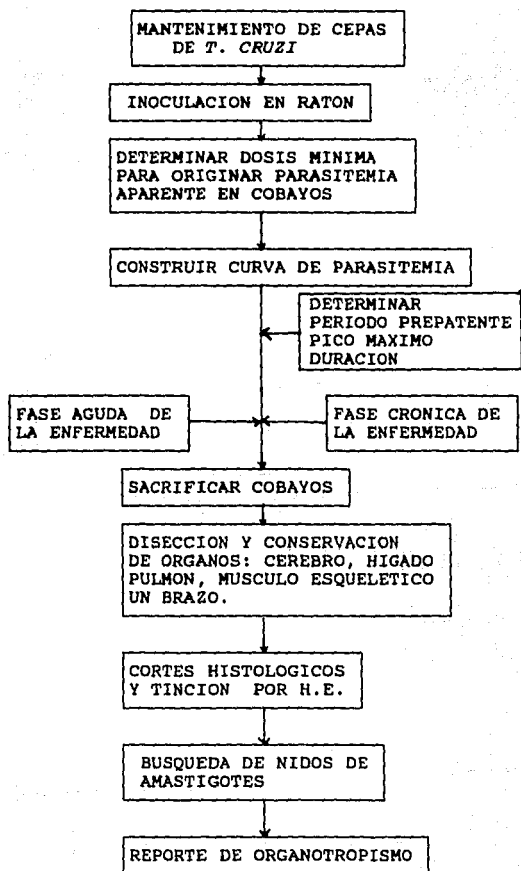
FUENTE: Tablas del desarrollo animal.

publicadas por PURINA, S.A.

CAPITULO III

PARTE EXPERIMENTAL

3.1 DIAGRAMA



3.2 MATERIAL Y METODOS

3.2.1 MATERIAL BIOLÓGICO:

a) Cepa NINOA de *T. cruzi*: aislada de un caso humano proveniente del estado de Oaxaca, México y se mantiene desde 1988 por criopreservación y pases triatoma-ratón-triatoma.

b) Cepa MIGUZ de *T. cruzi*: Aislada de un caso humano proveniente de Putla, Oaxaca, México. La cepa se recibió en ratón y se mantiene desde 1986 por criopreservación y pases triatoma-ratón-triatoma.

c) Cobayos: Cobayos hembras de 180 g de peso proporcionados por el bioterio de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas.

d) Ratones: Cepa NIH, hembras de 20 g aproximadamente, proporcionados por el bioterio de la ENCB.

3.2.2. MATERIAL DEL LABORATORIO

3.2.2.1 MATERIAL DIVERSO

Equipo de disección

Algodón

Lancetas

Aplicadores de madera

Cámara de Neubauer

Pipeta automática Gilson de 1 a 20 μ l

Puntas amarillas para pipetas automáticas

3.2.2.2 EQUIPO:

Microscopio óptico Carl-Zeiss

Olla express.

3.2.2.3 REACTIVOS

Solución madre de Giemsa,

Cloruro de sodio

Heparina

fenol al 5%

3.3 METODOLOGIA

1) Obtención de tripomastigotes metacíclicos a partir de heces de triatominos.- Para esto se alimentaran ninfas de triatominos previamente infectados con *T. cruzi*, sobre un ratón libre de infección, una vez repletas se les presiona suavemente el abdomen para obligarlos a defecar, inmediatamente se toma una gota de las heces y se observa al microscopio para confirmar la positividad del insecto. Si la materia fecal presenta 10 o más tripanosomas por campo con el objetivo de 40X, se procede a inocular a ratones.

2) Inoculación a ratones.- A partir de la materia fecal con tripomastigotes metacíclicos se diluye con solución salina al 0.85%, se carga con una jeringa para insulina, aproximadamente 0.2 ml de la dilución (0.1 ml de solución salina más 0.1 ml de heces) y se inocular al cobayo por vía intraperitoneal.

3) Cuenta de la parasitemia en ratón.- Entre 20 y 26 días después de la inoculación a ratones, se evalua en cámara de Neubauer la parasitemia, utilizando como diluyente Cloruro de amonio 0.85% y utilizando sangre obtenida a través de un pequeño corte en la punta de la cola.

4) Inoculación de tripomastigotes sanguíneos en cobayos.- Los cobayos fueron inoculados por vía intraperitoneal a las dosis establecidas utilizando solución de yodo para desinfectar el

área de la punción y empleando jeringas de 10 ml con aguja de 25 X 16 mm.

5) Determinación de la dosis mínima de tripomastigotes sanguíneos que originan parasitemia aparente en cobayos. Lotes de dos cobayos fueron inoculados a las siguientes dosis:

50 000, 100 000, 150 000, 200 000, 250 000, 300 000, 350 000, y 400 000 (tripomastigotes/cobayo).

En búsqueda de la parasitemia, los animales se revisarán cada tercer día después de la inoculación hasta por 40 días, después de este período, los animales serán sacrificados.

6) Curva de parasitemia en cobayos:

Dos lotes de cobayos, cinco animales por lote, serán inoculados por vía intraperitoneal con tripomastigotes sanguíneos provenientes de ratón infectado, a la dosis mínima que origine parasitemia. Los cobayos se revisaran cada tercer día, obteniéndose una gota de sangre por punción con lanceta en la oreja y evaluando la parasitemia por cuenta en cámara de Neubauer (Perlowagora, 1978).

7) Cuenta de tripomastigotes sanguíneos en cámara de Neubauer.

Una vez obtenida la sangre, se colecta con pipeta de Thoma y se diluye la sangre de acuerdo a la cantidad de parásitos observados en fresco. Se utiliza como diluyente Cloruro de Amonio 0.85% hasta llegar a la marca de 1.0. Colocar la muestra homogeneizada en la

cámara de Neubauer contando los flagelados presentes en los cuatro cuadros grandes.

8) Fijación de los órganos: Los órganos disecados se conservaron en solución de formalina al 10% preparada en regulador de fosfatos pH 7.2. Observándose que los materiales a preservar se mantengan en un volumen aproximado de 1:5 (tejido: formol).

9) Cortes histológicos.: Los cortes y la tinción los realizó la Unidad de Morfología microscópica del Departamento de Parasitología de la ENEP-Cuautitlán con ayuda del M. en C. Fernando Alba Hurtado.

3.4 DESARROLLO EXPERIMENTAL

1. A partir de triatomíneos infectados con las cepas de *T. cruzi* seleccionadas, se inocularán ratones albinos.

2. Una vez presente la parasitemia en los ratones (clonas y cepas) se cuantificará por medio de la cámara de Neubauer la presencia de tripomastigotes sanguíneos.

3. A partir de los ratones infectados se prepararán los inóculos necesarios para determinar la mínima concentración de

tripomastigotes requeridos para originar una parasitemia patente en cobayo.

4. A partir del inóculo determinado en el punto 3, se inocularan los lotes de cobayos para obtener la parasitemia correspondiente a cada cepa. Los resultados serán graficados.

5. Se determinarán a lo largo de la curva de parasitemia los siguientes puntos; a) Periodo prepatente, b) Pico máximo, c) Duración de la etapa aguda.

6) De manera semejante al punto anterior, se inocularán un lote de cinco cobayos para ser sacrificados durante la etapa aguda (6 días después de terminada la parasitemia) y determinar el organotropismo

7) Una vez terminada la parasitemia en los lotes de cobayos que sirvieron para construir la curva de parasitemia, 60 días después, se sacrificarán los cobayos y se diseccionarán órganos: cerebro, hígado, pulmón, músculo esquelético y un brazo, con el fin de determinar el organotropismo en la fase crónica.

CAPITULO IV

RESULTADOS Y DISCUSION

4.1 RESULTADOS:

1. En el cuadro 2 se presentan los inóculos evaluados en la determinación de la mínima concentración de tripomastigotes necesarios para producir parasitemia aparente en cobayos. Para ambas cepas se seleccionó una concentración de 250, 000 tripomastigotes.

2. En el cuadro 3 se presentan los datos obtenidos a partir del seguimiento de la curva de parasitemia (Figura No. 1) de la cepa NINOA y en cuadro 4 y Fig. 2 se muestran los datos del desarrollo de la parasitemia obtenida en el caso de la cepa MIGUZ.

3. La cepa MIGUZ mostró resultados (Cuadro 4) en un tiempo más corto a los obtenidos en el caso de la cepa NINOA (Cuadro 3). En la figura 2 se puede observar que el período prepatente para la cepa MIGUZ fue de 17 días, el pico máximo de la curva se presenta el día 39, en donde se alcanzaron concentraciones de hasta 2320 tripomastigotes por milímetro cúbico de sangre y la duración de la parasitemia es hasta el día 67.

4. Tanto para la etapa aguda y la crónica los órganos disecados, 60 días después de haber desaparecido la parasitemia, no mostraron la presencia de amastigotes.

CUADRO No. 2

**DETERMINACION DE LA DOSIS MINIMA INFECTANTE
DE LA CEPA NINOA DE *Trypanosoma cruzi* EN COBAYOS**

INOCULO	PRESENCIA DEL PARASITO
50,000	NO PATENTE
100,000	NO PATENTE
150,000	NO PATENTE
200,000	NO PATENTE
250,000	2/CAMPO 40X
300,000	3/CAMPO 40X
350,000	5/CAMPO 40X
400,000	5-10/CAMPO 40X

DOS COBAYOS FUERON INOCULADOS PARA CADA DOSIS INDICADA
Y REVISADOS CADA TERCER DIA EN BUSQUEDA DEL PARASITO

CUADRO 3. PARASITEMIAS DE CINCO COBAYOS INOCULADOS CON 250,000 TRIPOMASTIGOTES SANGUINEOS DE LA CEPA NINOA DE T. cruzi

TIEMPO	NUMERO DEL EJEMPLAR					
	1	2	3	4	5	X
21	50	-	-	-	-	10
23	50	100	-	-	-	30
25	200	300	50	50	-	120
27	300	700	300	100	300	340
29	300	600	700	400	650	530
31	500	500	1000	400	700	620
33	300	800	1300	700	900	800
35	800	1000	1500	900	1100	1040
37	1300	1200	1600	1300	1400	1360
39	1250	1600	1800	1750	1850	1650
41	1800	1900	2000	2300	1900	1980
43	1900	2100	2300	2100	2000	2080
45	1800	2400	1800	2300	2300	2320
47	1700	2300	1000	2000	1900	1780
49	1900	2000	800	16500	1800	1630
51	1500	1800	600	1300	1300	1100
53	1300	1500	500	1000	1400	1140
55	800	1400	900	800	1300	1040
57	700	1300	500	500	950	790
59	900	1300	400	500	900	720
61	700	1000	300	400	800	640
63	350	800	100	100	600	390
65	100	500	50	-	150	160
67	50	400	-	-	50	100
69	-	100	-	-	-	20
71	-	-	-	-	-	0

CUADRO 4. PARASITEMIAS DE CINCO COBAYOS INOCULADOS CON 250,000 TRIPOMASTIGOTES SANGUINEOS DE LA CEPA MIGUZ DE T. cruzi

TIEMPO	NUMERO DEL EJEMPLAR					
	1	2	3	4	5	X
17	50	100	-	-	-	30
19	150	200	50	100	50	110
21	200	350	50	50	150	160
23	200	400	100	100	450	250
25	300	700	200	500	750	290
27	700	900	500	800	800	740
29	600	1000	800	1000	1650	830
31	800	1500	1000	1400	1700	1280
33	1100	1800	1400	1700	2200	1640
35	900	2000	1800	2000	2600	1820
37	1300	2400	2000	2450	2800	1686
39	1450	2600	2000	2550	2450	2320
41	1600	2400	2300	2700	2400	2280
43	1550	2200	2000	2300	2000	2010
45	1600	2000	1900	2100	1800	1680
47	1500	1800	1600	2050	1900	1590
49	1700	1500	1500	1650	1600	1450
51	1500	1500	1300	1000	1700	1400
53	1300	1300	1200	1000	1400	1040
55	800	1400	1000	700	1300	1040
57	700	1300	900	800	950	930
59	900	1000	600	400	700	540
61	700	700	400	400	400	480
63	350	450	300	50	200	270
65	100	50	-	-	250	80
67	50	-	-	-	-	10
69	-	-	-	-	-	0

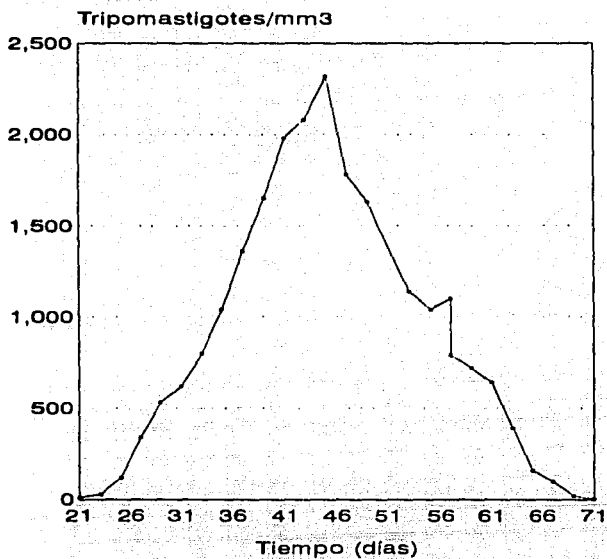


FIGURA 1. CURVA DE PARASITEMIA DE LA CEPA NIÑO A DE *T. cruzi* EN COBAYOS
 Los datos muestran el promedio de la parasitemia de cinco cobayos.

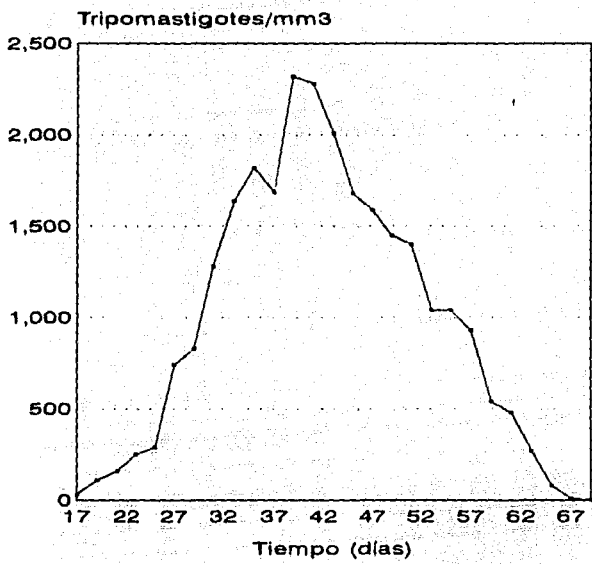


FIGURA 2. CURVA DE PARASITEMIA DE LA CEPA MIGUZ DE *T. cruzi* EN COBAYOS
 Los datos muestran el promedio de la parasitemia de cinco cobayos.

4.2 DISCUSION

Entre los motivos principales para la realización de este trabajo, se planteó la utilización de cobayos como un modelo biológico experimental para lograr la infección con *T. cruzi* y caracterizar cepas y/o clones del mismo parásito. La caracterización de las cepas es un aspecto importante dentro del estudio básico de la enfermedad de Chagas (Brener, 1985).

Lo anterior se realizó empleando la cepa NINOA y la cepa MIGUZ, ya que el comportamiento de ambas cepas en ratón se conoce tras haberse realizado trabajos previos con este modelo animal en el laboratorio.

La inoculación de los cobayos fue por vía intraperitoneal con fines de comodidad, mientras que la observación y seguimiento de la parasitemia se practicó tomando muestras de sangre obtenidas por punción de la oreja. Se realizó la cuenta de tripomastigotes en cámara de Neubauer para obtener resultados lo más precisos y exactos que nos fuera posible (Perlowagora, 1982).

Un parámetro a evaluar fue el determinar la dosis mínima de tripomastigotes sanguíneos necesarios para originar parasitemia patente en los cobayos, ya que no se cita cantidad alguna de inóculo en la bibliografía consultada en donde emplean al cobayo infectado con *T. cruzi*. 250 000 tripomastigotes (Cuadro 2) y dosis superiores originan parasitemia evidente en el cobayo,

cantidad mucho mayor a la necesaria para el ratón. Tal vez parece demasiada la diferencia entre las dos primeras dosis empleadas (entre la máxima y la mínima), pero se debe considerar que poco a poco se fue reduciendo esta diferencia hasta lograr tener cifras confiables.

En las Figura 1 y 2 se muestran los promedios de las lecturas realizadas a los lotes de cobayos infectados con las cepas NINOA y MIGUZ. Se observa que la cepa MIGUZ presenta un periodo prepatente más corto en comparación con la cepa NINOA, los picos máximos de parasitemia son semejantes a los obtenidos con ambas cepas, aunque la duración de la parasitemia es diferente, siendo ésta más prolongada en la cepa NINOA.

No se presentó la muerte de los animales de experimentación durante la determinación de la curva de parasitemia, tal como lo describen en la literatura algunos investigadores para el caso de ratones, esto podría deberse a tres factores:

- a) La poca patogenicidad de las cepas, ya que estas no son reportadas como de alta virulencia cuando son inoculadas en ratón.
- b) Las dosis utilizadas eran las mínimas infectantes.
- c) La mayor "potencia de la respuesta inmune" en cobayo, comparada con la del ratón (Neal, 1977; Dalmaso, 1980).

El siguiente objetivo fue el determinar el organotropismo, o sea la prevalencia, de los nidos de amastigotes al final de la etapa aguda y en la etapa crónica de la infección. El sacrificio de los animales se realizó por desnucamiento, con el fin de evitar que la intoxicación química por el cloroformo alterase la morfología microscópica de los nidos de amastigotes (Ferreira, 1970).

El fijador formol-fosfatos se utilizó para preservar los órganos disectados, debido a que se ha demostrado que soluciones neutras de formol actúan de mejor manera que las soluciones con pH ya sea ácido o alcalino (Comunicación personal del Profr. Fernando Alva Hurtado). La técnica de tinción seguida fue la de hematoxilina-eosina, la cual pone de manifiesto los nidos de amastigote, resaltándolos del tejido circulante de mejor forma que otras técnicas histológicas (Ferreira, 1970).

Los animales fueron sacrificados 60 días después de haber desaparecido la parasitemia y el organotropismo de las cepas de *T. cruzi* no fue posible determinarlo, ya que en ninguno de los cortes de los órganos, incluso miocardio, se encontraron nidos de amastigotes en los 30 cortes revisados en dos ocasiones. La calidad en los cortes y tinciones de las laminillas nos hace eliminar que factores relacionados a la técnica histológica seguida pudiesen haber originado problemas en la observación. La ausencia de nidos de amastigotes en los animales sacrificados (Lote 1: 6 días después de desaparecer la parasitemia y Lote 2: 60 días de haber

desaparecido la parasitemia) podemos explicarla de la siguiente manera:

- 1) La prevalencia y tamaño de los nidos de amastigotes fue tan baja que no fue posible encontrarlos en las laminillas observadas.
- 2) Poco después de desaparecer la parasitemia, se reduce el número de nidos de amastigotes, lo cual dificulta su hallazgo.
- 3) Sólo durante la parasitemia es posible encontrar nidos de amastigotes, mientras que en etapas avanzadas de la infección el número disminuye dificultando su localización, fenómeno semejante que reporta Ferreira en 1970.

Vargues (1956) menciona que al examen postmortem, al revisar cortes histológicos de animales sacrificados en la etapa crónica de la infección, sólo observa lesiones atribuibles a la patología ocasionada por el parásito, pero no reporta la presencia de amastigotes.

Sólo en el caso de cobayos inmunodeficientes se han encontrado nidos de amastigotes, aunque en muy baja prevalencia en comparación a ratones (Lelchik, 1977; Dalmaso, 1980). Al disectar corazón de cobayos sacrificados en etapas avanzadas de la infección (no determinan con exactitud la etapa de la infección) se observaron lesiones típicas de la enfermedad de Chagas en el hombre pero la

presencia de amastigotes fue mínima. Por lo cual deja entrever la participación de la respuesta inmune en la cantidad y tamaño de los nidos de amastigotes (González, 1968).

Todos estos planteamientos se podrían demostrar si se determinase el organotropismo durante la etapa aguda, tal vez durante el pico máximo de parasitemia.

CAPITULO V

CONCLUSIONES

I). Las dos cepas (NINOA y MIGUZ) son capaces de infectar al cobayo, originando una parasitemia que puede ser fácilmente detectable, no se alcanzan altas concentraciones de parásitos, comparando lo anterior con los obtenidos en ratón, aún utilizando cantidades menores de inóculo (10,000 tripomastigotes por ratón).

II. El empleo del cobayo, en comparación al uso de ratones, representa ventajas como es el obtener una mayor cantidad de sangre parasitada.

III. La parasitemia se presenta en forma semejante a lo que ocurre con el ratón, ya que se presenta un período prepatente (de alrededor de 15 a 21 días), un pico máximo de parasitemia, la cual desciende paulatinamente hasta pasar a la fase crónica, en donde la parasitemia ya no es evidente.

IV. Ambas cepas presentan la ventaja de no causar la muerte del cobayo (a las dosis empleadas), y así poder realizar en el mismo sujeto estudios en la etapa crónica de la infección.

Es recomendable en trabajos posteriores, aumentar la cantidad de dosis empleadas, para determinar si se reducen: el período prepatente, se aumenta la cantidad de tripomastigotes por milímetro³ de sangre y se obtiene una cantidad detectable de nidos de amastigotes.

V) La dosis mínima infectante para ambas cepas empleadas fue de 250,000 tripomastigotes por ratón, a dosis mayores siempre se presentó la infección y a dosis inferiores la infección no fue patente en la mayoría de los animales probados.

VI). En contraposición, este modelo experimental, no es recomendable para efectuar en él estudios histológicos con el propósito de evidenciar la presencia de nidos de amastigotes en la etapa crónica. Se sugiere que se empleen cobayos que presenten parasitemia evidente y/o que sean inmunodeprimidos con el fin de favorecer el hallazgo de los amastigotes.

VII) No se presentan dificultades operacionales en la toma de muestras, se conocen ampliamente las características biométricas y de cultivo de estos animales, además las condiciones de espacio y cuidado en la granja de este modelo experimental no requieren de equipo sofisticado por lo que la disponibilidad de cobayos no debe ser una limitante para el empleo de este modelo experimental en los laboratorios de investigación.

VIII) El cobayo representa una buena opción para la elección de un modelo experimental en el estudio de la enfermedad de Chagas.

V) La dosis mínima infectante para ambas cepas empleadas fue de 250,000 tripomastigotes por ratón, a dosis mayores siempre se presentó la infección y a dosis inferiores la infección no fue patente en la mayoría de los animales probados.

VI). En contraposición, este modelo experimental, no es recomendable para efectuar en él estudios histológicos con el propósito de evidenciar la presencia de nidos de amastigotes en la etapa crónica. Se sugiere que se empleen cobayos que presenten parasitemia evidente y/o que sean inmunodeprimidos con el fin de favorecer el hallazgo de los amastigotes.

VII) No se presentan dificultades operacionales en la toma de muestras, se conocen ampliamente las características biométricas y de cultivo de estos animales, además las condiciones de espacio y cuidado en la granja de este modelo experimental no requieren de equipo sofisticado por lo que la disponibilidad de cobayos no debe ser una limitante para el empleo de este modelo experimental en los laboratorios de investigación.

VIII) El cobayo representa una buena opción para la elección de un modelo experimental en el estudio de la enfermedad de Chagas.

BIBLIOGRAFIA

1. Braun, M. de Tito, E. (1985). Respuesta inmune al *Trypanosoma cruzi*. Un enfoque de patogenia en la enfermedad de Chagas. Acta Physio. Pharmacol. Latinoam. 35, 1-47.
2. Brener, Z. (1985). General review on *T. cruzi*. Classification and taxonomy. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 18: 1-8.
3. Brener, Z. (1987). Pathogenesis and immunopathology of chronic Chagas disease. In Meeting on immunopathology and pathogenesis of Chagas disease, Leishmaniasis and Leprosy. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 82, 205-213.
4. Chiari, E., E.P. Camargo (1984) Culturing and cloning of *T. cruzi*. In Genes and Antigens of parasites. A laboratory manual. 2nd. edition. C. M. Morel. UNDP/World Bank/W.H.O. pp. 23-26.
5. Dalmaso, A.P. CJarvinen, J.A. (1980). Experimental Chagas' disease in complement-deficient mice and guinea pigs. Infectec. Inm. 28(2):434-440.
6. Dvorak, A.J. (1985) Single cell isolates of *Trypanosoma cruzi*: How and Why? Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 18: 29-38.

7. Ferreira, A.L. (1970). Pathogenesis of testicular and epididymal lesions in guinea pigs experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. Rev. Inst. Med. trop. Sao Paulo 12(1):69-87.
8. Fife Earl, H. (1977) *Trypanosoma cruzi*. Parasitic Protozoa vol. 1; 146-159, Kreier, J.P. Editor, Academic Press. U.S.A.
9. Gable, F.C. (1970) South american trypanosomiasis. En Immunity of parasites animals. Jackson, G.J. Herman, editor. Academic, Press, U.S.A
10. González Cappa S.M., Schmunis, G.A., Traversa, O.C., Yanovsky, J.F., Parodi, A.S. (1968) Complement-fixation test, skin test, and experimental immunization with antigens of *Trypanosoma cruzi* prepared under pressure. Am. J. Trop. Med. Hyg. 17(5): 709-15.
11. Lelchuk, R., Cardoni, R.L., Levis, S. (1977) Nifurtimox-induced alterations in the cell mediated immune response to PPD in guinea pigs. Clin. Exp. Immunol. 30(3):469-73.
12. Neal R.A. (1977) Influence of the stage of infection of *Trypanosoma cruzi* in guinea-pigs on infectivity to *Rhodnius prolixus*. Ann. Trop. Med. Parasitol. 71(1):119-20.

13. Nogueira, N. Chaplan, S. and Cohn, Z. (1980) *Trypanosoma cruzi*: Factors modifying ingestiomn and fate of blood forms tripomastigotes. Journal of Experimental Medicine 152:447-451.
14. Perlowagora-Szumlewicz, A., Muller, C.A. (1982) Studies in search of suitable experimental insect model for xenodiagnosis of host with Chagas' disease. 1. comparative xenodiagnosis with nine Triatomine species of animals with acute infections by *Trypanosoma cruzi*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 77(1):37-53.
15. Soberón y P., G., Peláez, F.D. (1977) Nociones de parasitología y patología tropical. Editor Francisco Méndez Oteo, México. p. 92-99.
16. Velasco, O., Guzmán, C. (1986) Importancia de la enfermedad de Chagas en México. Rev. Lat-amer. Microbiol 28, 275-283.
17. Velasco, C. O. y cols. (1991) La enfermedad de Chagas. Boletín técnico No. 8. Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos. S.A. México.
18. Szarfman, A.P.M., Cossio, M., Schummins and Arana, R.M. (1977). The E.V.I. Antibody in acute Chagas disease. Journal Parasitology 63 (5): 149-153.

19. Wood, J.N., Hudson, L., Jessell, T.M., and Yamamoto, M. (1982).
A monoclonal antibody defining antigenic determinants on
subpopulations of mammalian neurons and *Trypanosoma cruzi*.
Parasites Nature 296: 34-37
- 20) W.H.O. (1985) World Health Organization. Report of a meeting
on the standardization of methods for *Trypanosoma cruzi*
classification. TDR/EPICHA-TCC/85.3: 1-14.
21. W.H.O. (1986) World health Organization. UNDP/World Bank
/W.H.O. Special Programme for Research and Training in Tropical
Disease: Actividades de Pesquisa do Scientific Working FGroup
(SWG) on Chagas' disease 1982/1985- Relatorio dos "Screening
Committes" (SC) ao "Scientific and Technical Review
Committes". Compilado por Moncayo, A. In Mem. Inst. Oswaldo
Cruz 81(8), 179-183.
22. World Health Organization. (1990) Division of Control of
Tropical Diseases (CTD). UNDP/ World Bank/ WHO Special
Programme for Research and Training in Tropical Disease (TDR).:
American tripanosomiasis TDR-CTD/ HH90.1: 12-13.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA