



24  
3

Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad de Química

**INFECCIÓN NATURAL DE *7. CRUZI*  
MEDIANTE CANIBALISMO EN RATONES.**



TESIS  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA  
PRESENTA:  
MARICEL CAYUELA GALLY



México, D.F.

1996

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON  
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 esta 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.

Jurado asignado

Presidente Prof. Ramírez Gama Rosa María

Vocal Prof. Gutiérrez Ramos Abel

Secretario Prof. Becerril Flores Marco Antonio

1er. suplente Prof. Tsuzuki Reyes María Guadalupe

2do. suplente Prof. Astigarraga Zavaleta Maite

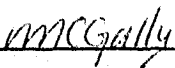
Sitio donde se desarrolló el tema : Facultad de Química, U.N.A.M.



---

Asesor del tema

M. en C. Marco Antonio Becerril Flores.



---

Sustentante

Maricel Cayuela Gally

A MIS PADRES

A MIS HERMANOS

A MIS ABUELOS

Y A PANCHO

QUISIERA AGRADECER DE MANERA MUY ESPECIAL A  
MARCO ANTONIO BECERRIL POR SU PACIENCIA,  
COLABORACIÓN Y APOYO PARA LA REALIZACIÓN DE  
ESTE TRABAJO.

TAMBIÉN QUISIERA AGRADECER LA COLABORACIÓN DE  
ISMAEL RAMÍREZ JIMÉNEZ.

POR ÚLTIMO QUISIERA AGRADECER A MI COMPAÑERA  
MARIBEL CERVANTES POR SU COLABORACIÓN Y  
APOYO.

# ÍNDICE

# ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	5
I.1 Epidemiología e importancia en Salud Pública de la Enfermedad de Chagas.	5
I.2 Biología de <u>T. cruzi</u>	12
I.3 Ciclo Biológico.	15
I.4 Relación Huésped- parásito.	17
I.5 Dinámica de transmisión en la enfermedad de Chagas.	25
II. OBJETIVO	30
III. MATERIAL Y METODOS	32
III.1 Parásitos	32
III.2 Distribución por lotes de los animales de experimentación.	32
III.3 Mantenimiento de <u>T. cruzi</u> en ratón.	32
III.4 Infección de ratones por vía i.p., oral y canibalismo.	33

III.5 Determinación de curvas de parasitemia.	34
III.6 Optimización de la técnica de ELISA indirecto para la detección de anticuerpos anti- <u>T.cruzi</u> .	34
III.7 Detección de anticuerpos anti- <u>T.cruzi</u> en ratones.	36
III.8 Preparación de cortes histológicos de corazón de ratones inoculados con <u>T.cruzi</u> .	37
IV. RESULTADOS	40
IV.1 Porcentaje de mortalidad.	40
IV.2 Determinación de curvas de parasitemia.	42
IV.3 Determinación de anticuerpos anti- <u>T.cruzi</u> .	48
IV.4 Porcentaje de ratones con nidos de amastigotes.	52
V. DISCUSIÓN	55
VI. CONCLUSIONES	59
VII. APÉNDICE	61
VIII. BIBLIOGRAFÍA	68



# INTRODUCCIÓN

# I. INTRODUCCIÓN

## I.1 EPIDEMIOLOGIA E IMPORTANCIA EN SALUD PUBLICA DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS

La enfermedad de Chagas es una parasitosis causada por el protozoo flagelado Trypanosoma cruzi que afecta al hombre y animales de sangre caliente, en la que el parásito es transmitido generalmente por las heces de una chinche que pertenece a la familia triatominae, la infección afecta a nivel del miocardio, esófago y colon.

Para que en una región prevalezca la enfermedad de Chagas deben coexistir tres elementos : el parásito, el huésped vertebrado que puede ser cualquier animal de sangre caliente a excepción de las aves y el huésped invertebrado que actúa como transmisor del parásito. Una zona que reúna estas tres condiciones se le considera endémica. (1)

La enfermedad de Chagas, constituye un problema de salud pública limitado únicamente al continente Americano.

Existen áreas endémicas en zonas que se extienden desde el paralelo 43° de latitud norte ( Sur de California ), hasta el paralelo 49° latitud sur ( Región central de Argentina ). (1)

Se ha estimado, que aproximadamente 35 millones de personas que viven en áreas rurales, localizadas en Centro y Sur de América tienen riesgo de infectarse, y que 10-12 millones de personas presentan la enfermedad. (2).

En la República Mexicana se considera como área endémica las dos terceras partes del territorio nacional debido al hallazgo de triatóminos infectados por T. cruzi dentro de la habitación humana. (1).

Los estados de la República Mexicana más afectados son : Oaxaca, Chiapas, Jalisco, Michoacan, Guerrero, Zacatecas, Yucatán, Veracruz, Edo. de México, Sonora, Nayarit y Tabasco. (3). ( MAPA 1 ).

En los estados donde se ha encontrado más casos humanos de la enfermedad de Chagas por el hallazgo del parásito mediante examen directo, cultivo o xenodiagnóstico y en menor proporción por el estudio de biopsias o necropsias son :

Estado	Nº de casos
Chiapas	44
Jalisco	44
Yucatán	33
Zacatecas	12

En algunas regiones del país como Oaxaca, Morelos, Puebla y Guerrero se han reportado índices de frecuencia muy elevados, lo que indica que podría existir una transmisión muy activa de la enfermedad en dichas regiones.

( TABLA 1 ).

En cuanto a los reservorios encontrados en México, no hay muchas investigaciones, sin embargo se han reportado los que aparecen en la ( TABLA 2 ).

En el ( MAPA 2 ) se puede observar que sólo en 10 estados de la República se han capturado reservorios infectados con T.cruzi .

En el Continente Americano se han encontrado diversas clases de reservorios, los cuales incluyen alrededor de 100 especies de mamíferos pertenecientes a diferentes órdenes : Marsupialia, Endentata, Chiroptera, Carnivora, Lagomorpha, Rodentia y Primates.

Los reservorios domésticos como : perros, gatos, ratas y ratones son comúnmente infectados con T.cruzi en áreas endémicas. (4)

Actualmente, en todo el territorio de la República Mexicana, se piensa en la probable existencia de triatóminos infectados por T. cruzi, lo que nos indica que el área endémica de la Enf. de Chagas es muy amplia. ( MAPA 3 ).

Las poblaciones que están en riesgo de infección son aquellas que se localizan en zonas endémicas y cuya población presenta condiciones de vida poco saludables. En estas zonas las viviendas son de adobe o paja, condiciones favorables para el desarrollo y permanencia de los triatóminos; esto aunado a la poca educación de la gente y la convivencia con animales permite la prevalencia de la enfermedad de Chagas.

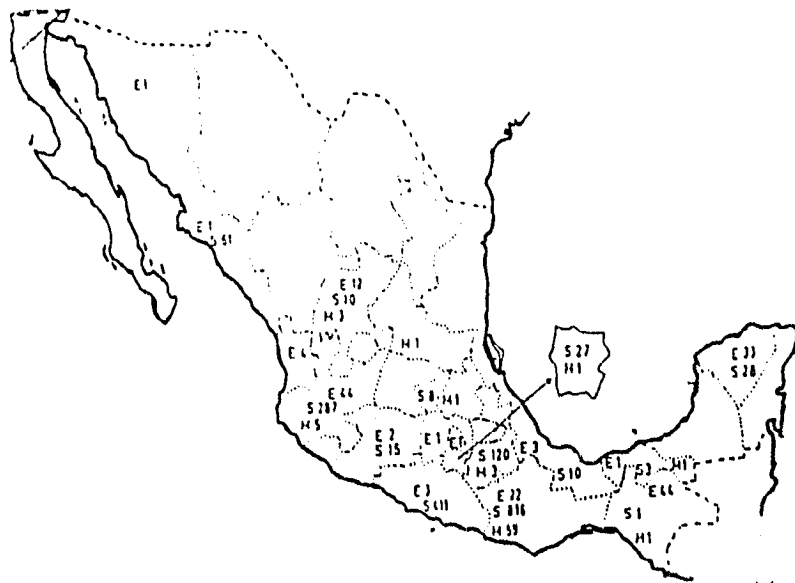
Una persona que ha sido infectada puede presentar diferentes manifestaciones clínicas, sin embargo más de la mitad de las personas que se han reportado como infectadas no desarrollan sintomatología. Esta variación clínica depende de factores que conciernen al parásito y al huésped, por ejemplo la virulencia, la dosis infectante, el número de infecciones del parásito; en cuanto al huésped probablemente dependa de la susceptibilidad a la infección.

Nº de examinados	Estados	Positivos		Investigadores y años
		Nº	%	
-	Guerrero	4	-	Perrin y col. 1974
200	Guerrero	18	9.0	Biagi y col. 1964
-	Guerrero	4	-	Aceves y col. 1964
-	Oaxaca	2	-	Biagi y Arce. 1965
165	Michoacán	12	7.3	Tay y col. 1967
75	Zacatecas	10	13.3	Tay y col. 1968
4.023	Oaxaca	655	16.3	Goldsmith y col. 1978
2.245	Yucatán	28	1.2	Zavala. 1974
-	Guerrero	1	-	Rotberg y col. 1975
30	México	5	6.0	Marcuschamer y Reyes. 1978
530	Jalisco	70	13.2	Tay y Salazar. 1979
34	Tabasco	1	2.9	Reyes y col. 1983
30	Querétaro	8	25.7	Velasco y Guzmán. 1986
85	Veracruz	10	11.6	Velasco y Guzmán. 1986
135	Sinaloa	61	45.2	Velasco y Guzmán. 1986
384	Morelos	110	28.6	Velasco y Guzmán. 1986
835	Jalisco	140	16.8	Velasco y Guzmán. 1986
587	Puebla	120	20.4	Velasco y Guzmán. 1986
657	Oaxaca	126	19.2	Velasco y Guzmán. 1986
1.546	Guerrero	329	21.3	Velasco y Guzmán. 1986
52	Oaxaca	46	88.5	Tay y col. 1986
242	Morelos	17	7.0	Tay y Gutiérrez. 1987

TABLA 1. Distribución de casos humanos de enfermedad de Chagas diagnosticados por reacciones serológicas en 1777 personas de diferentes estados de México hasta 1987. (Jorge Tay y col. Bol. Chil. Parasitol, 1992, 47:43-53)

Huésped	Localidad	Investigadores y año
Perro	Tututepec. Oaxaca	Mazzotti y Dias. 1949
	Tepechitlán. Zacatecas	Velasco y col. 1970
	Yucatán	Quintanal y col. 1971
	Cuernavaca. Morelos	De Alhija. 1985
Borrego	Yucatán	Quintanal y col. 1975
	Morelos	Velasco y col. 1985
Ratón	Zacoalco. Jalisco	Tay y col. 1979
Rata noruega	Cd. de México (mercado)	Beltrán, E. 1949
	Zacoalco. Jalisco	Tay y col. 1979
Armadillo	Colima	Mazzotti y Dias. 1949
	Yucatán	Quintanal y col. 1975
Tlacuache	Monterrey. Nvo. León	Aguirre. 1947
	Tetitlán. Guerrero	Biagi y col. 1964
	Agua Buena. Michoacán	Perrin, Dias y Brenes. 1974
	Yucatán	Quintanal y col. 1975

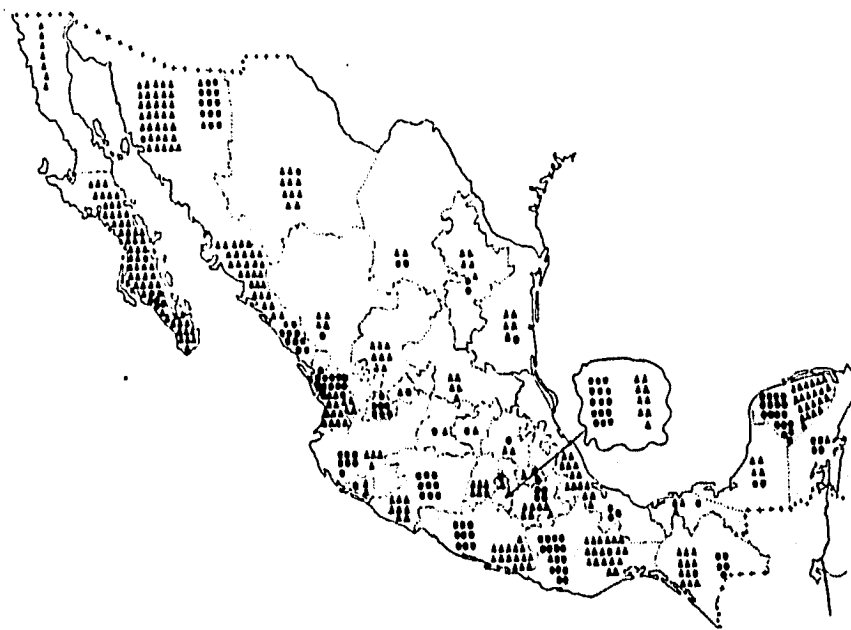
TABLA 2. Infecciones por Trypanosoma Cruzi comprobadas en huéspedes vertebrados no humanos en México hasta 1985. (Tay y col. Bol. Chil. Parasitol, 1992, 47:43-53)



MAPA 1. Distribución por estados del número de casos humanos de infección por *T. cruzi* y de miocarditis compatible con dicha etiología registrados en México hasta 1991. E= diagnóstico etiológico. S= diagnóstico serológico. M= con miocarditis compatible con etiología chagásica.(3)



MAPA 2. Reservorios infectados con *T. cruzi* en México hasta 1985. C= perro. B= vaca. M= ratón. R= rata. noruega. S= ardilla. D= tlacuache. N= armadillo.(3)



MAPA 3. Números de colectas de triatóminos efectuadas en cada estado de la República Mexicana hasta 1991. ● = infectados *T. cruzi*. ▲ = no infectados.  
(3)



## I.2 BIOLOGÍA DE T. cruzi

### FASES DEL PARÁSITO.

T. cruzi se presenta en la naturaleza con 4 estadios morfológicos : tripomastigote, promastigote, epimastigote y amastigote. (1).

Tripomastigote : es un flagelado de aspecto fusiforme que mide de 20-25 micras de largo y 2 micras de ancho, con un citoplasma granuloso y un núcleo central vesiculoso., cinetoplasto subterminal posterior al núcleo, el cual está formado principalmente por DNA, donde surge una membrana ondulante que recorre al parásito, saliendo libre por la porción anterior para moverse activamente. Esta fase en mamíferos se encuentra extracelularmente en la circulación, y en huéspedes invertebrados se encuentra siempre extracelularmente y se localiza en el intestino posterior de los triatóminos infectados cuya forma se conoce como tripomastigote metacíclico, que es la fase infectante para los huéspedes vertebrados.

( FIGURA 1 )

Epimastigote : es de aspecto fusiforme, y mide de 20-25 micras de longitud, en esta forma, el cinetoplasto está localizado cercano al núcleo y el flagelo se observa desde el cinetoplasto hasta la parte posterior donde sale libre, formando una pequeña membrana ondulante. Es una fase de replicación de T. cruzi que se encuentra en el intestino medio de los triatóminos y en medios de cultivo. ( FIGURA 2 )

Promastigote : es un estadio flagelado alargado de 20-25 micras de largo, en el que el cinetoplasto se localiza en la porción anterior y lejano al núcleo del cual emerge el flagelo sin formar membrana ondulante, sale libre por la porción anterior del cuerpo. Es una fase de transición difícilmente observable entre los estadios de amastigote y epimastigote. ( FIGURA 3 )

Amastigote : es la forma redondeada, que mide de 2-2.5 micras, sin flagelo libre, pero al microscopio electrónico se ve al flagelo dentro de una bolsa, presenta un gran núcleo y cinetoplasto. Esta fase se replica por fisión binaria en 7-14 hrs. Es la forma de multiplicación intracelular del parásito, ya que se encuentra en el interior de las células del huésped mamífero donde se multiplica profusamente.

( FIGURA 4 ). (5).

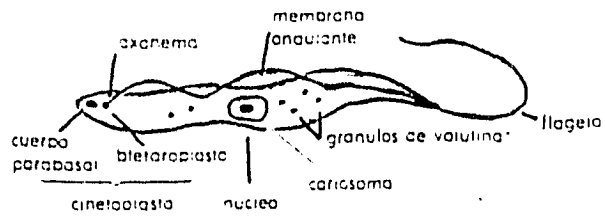


FIGURA 1. Representación esquemática de un tripomastigote.(11)

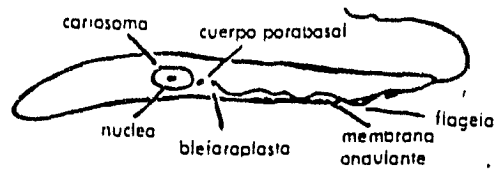


FIGURA 2. Representación esquemática de un epimastigote.(11)

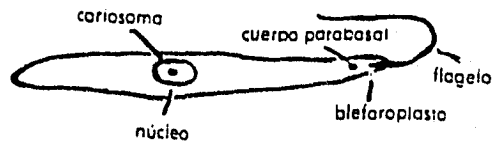


FIGURA 3. Representación esquemática de un promastigote.(11)

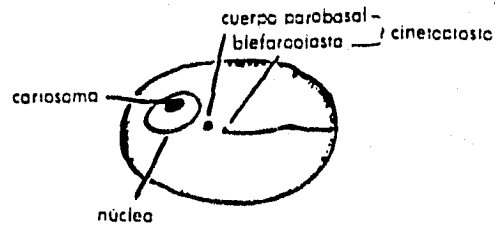


FIGURA 4. Representación esquemática de un amastigote.(11)

### I.3 CICLO BIOLÓGICO

El ciclo biológico puede comenzar cuando los triatóminos se infectan al ingerir la sangre de un mamífero que contiene tripomastigotes circulantes que pasan al intestino del insecto y se transforman en epimastigotes, los cuales se multiplican por fisión binaria longitudinal y al cabo de 15-30 días se desarrollan los tripomastigotes metacíclicos en el intestino posterior del triatómino.

Cuando el insecto infectado pica al mamífero, se repleta de sangre provocando su defecación, cuyas heces contendrán tripomastigotes metacíclicos capaces de penetrar a través de la piel y por el sitio de la picadura.

En el mamífero, los tripomastigotes metacíclicos se introducen en las células del tejido celular laxo y adquieren la forma de amastigote, éstos se multiplican por fisión binaria repetidas veces hasta que la célula se rompe y los libera, entonces se transforman hasta tripomastigotes; éstos infectan células adyacentes o pueden entrar a la circulación sanguínea diseminándose por todo el organismo. El ciclo biológico se completa cuando los tripomastigotes son ingeridos por los triatóminos. ( FIGURA 5 ). (2,5)

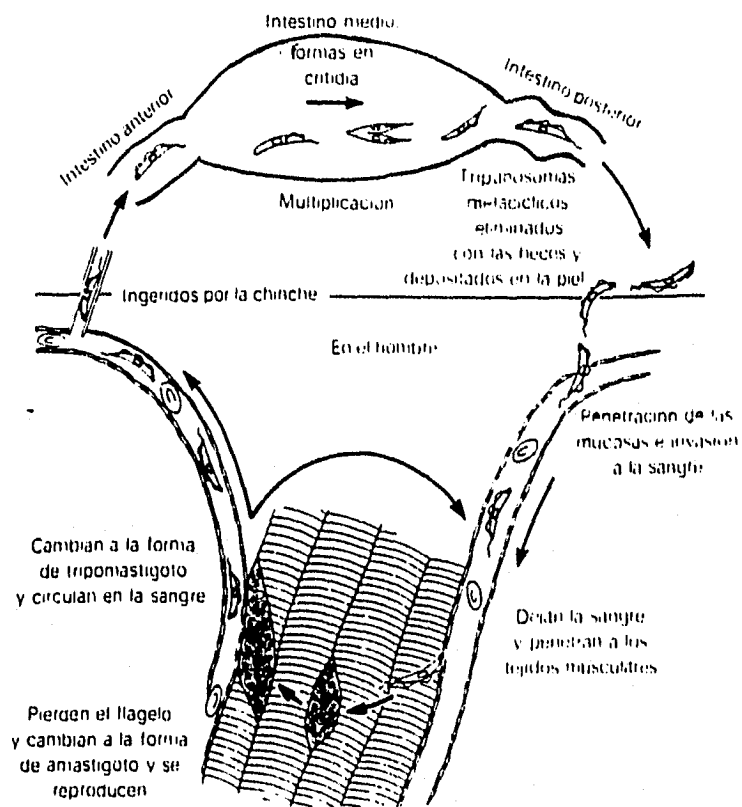


FIGURA 5. Ciclo biológico de *trypanosoma cruzi*. (De Adam, K. M. G., J. Paul, y V. Zaman. 1971. *Medical and Veterinary protozoology. Guía ilustrada*. Churchill Livingstone, Edinburgh.) (12)

#### I.4 RELACIÓN HUÉSPED- PARÁSITO

Cuando T. cruzi penetra al huésped se lleva a cabo un contacto del parásito con las células del huésped mediante el flagelo de T. cruzi, éste al estar en contacto, secreta proteasas y glicosidasas que actúan sobre los componentes membranales de las células del huésped, permitiendo así la entrada del parásito. (2).

Una vez establecido el parásito dentro del citoplasma se transforma intracelularmente en amastigote y se reproduce repetidas veces por fisión binaria hasta que la gran cantidad de amastigotes lisan la célula; se transforman a tripomastigotes y llegan a la circulación sanguínea, los cuales se dirigen a diversos tejidos para establecerse principalmente en tejido muscular, cardíaco y esquelético. Si los amastigotes no llegan al torrente sanguíneo, son fagocitados por células adyacentes del sitio de infección. (2).

Clínicamente, en la enfermedad de Chagas se presentan 3 fases : la fase aguda, la indeterminada y la crónica.

## FASE AGUDA

Esta se da después de un periodo de incubación de aproximadamente 4 - 10 días, se caracteriza por una alta parasitemia y por afecciones en el sitio local de infección, después de este periodo se presentan las manifestaciones de la puerta de entrada :

Signo de Romaña. ( complejo oftalmoganglionar ), que consiste en un edema bipalpebral unilateral, indoloro con hiperemia conjuntival, escasa secreción conjuntival, dacriocistitis del ojo infectado y adenopatía local, en la que están comprometidos los ganglios cercanos al sitio de penetración de T.cruzi. Todos estos síntomas desaparecen espontáneamente en unos 15 días.

Chagoma de inoculación. Generalmente aparece en la cara, pero se puede presentar en otras partes del cuerpo, es un nódulo subcutáneo, acompañado de microadenitis regional y localizado en el sitio de penetración del parásito.

Otros síntomas que caracterizan a este período, presentes en el huésped pero que no se relacionan a la puerta de entrada son :

Manifestaciones sistemáticas que pueden incluir : fiebre, edema, linfadenopatía generalizada y agrandamiento del corazón. (4).

Complicaciones viscerales. En todos los infantes se presenta como un cuadro grave, el cual se caracteriza por : la presencia de fiebre, hepatoesplenomegalia, poliadenitis generalizada, anasarca, diarrea, signos bronquiales, cardiomegalia y meningoencefalia.

No en todos los casos se encuentra afectado el corazón, pero si esto sucede, se presenta miocarditis de diferente intensidad. También en niños pequeños suele presentarse meningoencefalitis.

El diagnóstico durante la fase aguda es establecido por la detección de tripanosomas circulantes en sangre o por métodos serológicos. El rango de mortalidad en esta fase es del 2-8%.

El periodo agudo dura de 1 a 2 meses, después de este tiempo todo tiende a normalizarse. Sin embargo la infección queda latente y entra a una fase indeterminada.

#### FASE INDETERMINADA

Esta fase puede durar entre 10 - 20 años, y se caracteriza por una baja parasitemia; durante la cuál desaparece la sintomatología y el individuo se considera curado. Sin embargo la serología es positiva, y pueden existir datos relevantes en un electrocardiograma que nos indique miocarditis.



Aproximadamente 40% de los pacientes infectados por T.cruzi pertenecen a esta fase y presentan síntomas clínicos menores como focos de inflamación y fibrosis cardiaca.

Sin embargo cuando el paciente lleva mucho tiempo en esta fase presenta manifestaciones clínicas graves.

Se creé que en esta fase se desarrolla lentamente un periodo de autoinmunidad. (2).

## FASE CRÓNICA

Esta fase se manifiesta generalmente en personas de 20 a 50 años, esta es la fase que hace trascendente a la enfermedad de Chagas, ya que además de incapacitar al hombre en la edad más productiva de su vida, con frecuencia lo lleva a la muerte. (7).

Los datos más relevantes de esta fase señalan la existencia de cardiomegalia con insuficiencia cardiaca, la cual se caracteriza por reducción en el latido del corazón y peristalsis, con reducción del tono muscular; el cuadro clínico varía considerablemente de acuerdo al grado de insuficiencia cardíaca o al tipo de alteración del ritmo.

La evolución de la miocarditis es insidiosa y en ocasiones se suelen presentar accidentes cerebrales de tipo vascular ocasionados por trombos.

Dentro de la fase crónica, la mayoría de los pacientes presenta los llamados " megas " en órganos viscerales como megacéfago y megacolon. Este proceso se debe a la acción directa del parásito, la denervación, la estasis sanguínea, los fenómenos isquémicos y a los fenómenos inmunes y autoinmunes en el huésped.

Los órganos afectados pueden ser duodeno, estómago, intestino delgado, hígado, vías biliares extrahepáticas, páncreas, bronquios y pulmón, tracto urinario y además produce alteraciones secretorias a nivel de glándulas salivales y sudoríparas.

En esta fase se presenta la muerte inesperada en un 60-70% de los pacientes ; y esto podría ser resultado directo de las fallas del corazón. (2).

## FACTORES DE RESISTENCIA INESPECÍFICOS Y ESPECÍFICOS A LA INFECCIÓN POR T.cruzi.

En los animales susceptibles a la infección, se desarrolla una inmunidad parcial contra T.cruzi. Esta respuesta inmune es de tipo humoral y celular, y se hace evidente por anticuerpos específicos y por reacciones de hipersensibilidad. (2).

El parásito flagelado T.cruzi es susceptible a la destrucción por reacciones inmunológicas, principalmente por la acción de anticuerpos y el complemento.(6).

Se ha reportado que las células NK producen acción lítica en las formas virulentas de este parásito , y que las células T citotóxicas pueden matar células infectadas con T.cruzi. (6).

El papel que juegan los macrófagos en la respuesta inmune contra T.cruzi, es muy complicado, ya que estas células pueden matar al parásito, o favorecer el crecimiento intracelular del parásito, o bien actuar como célula presentadora de antígenos.(3).

Al comienzo de la infección, el huésped reacciona con una inflamación predominantemente polimorfonuclear en el sitio de infección.

A medida que continúa la multiplicación intracelular del trypanosoma, los componentes antigénicos, constituidos por los parásitos muertos y el material proteico que secretan y excretan, estimulan la respuesta inmune celular y luego humoral.

En la enfermedad de Chagas existe compromiso de los órganos ricos en sistemas linfomacrofágico ( ganglios linfáticos, hígado y bazo ), sistema nervioso central, miocardio y órganos huecos, especialmente el tubo digestivo.

#### SUSCEPTIBILIDAD A LA INFECCIÓN.

La susceptibilidad a la enfermedad de Chagas, es de carácter universal, ya que la raza, edad y sexo carecen de importancia. Sin embargo el estrato socioeconómico es muy importante así como la región geográfica ya que es un padecimiento endémico propio de áreas rurales y suburbanas y por lo tanto afecta a campesinos y marginados. (7).

La enfermedad aguda predomina entre los menores de edad, y la crónica generalmente aparece muchos años después y por lo común después de un largo periodo de latencia, casi siempre afecta a mayores de 40 años.

La edad tiene importancia en el pronóstico de la enfermedad aguda, ya que es mucho más grave en el feto, el lactante y el adolescente.

También dentro de la susceptibilidad que se produce en el hombre deben considerarse los factores que se relacionan con el parásito, los cuales son : virulencia, dosis infectante, el número de infecciones del parásito, la diferente susceptibilidad a los agentes quimioterápicos entre otros.

En los estudios realizados con ratones, se ha planteado que la diferente susceptibilidad que presentan las cepas de ratones depende de las características genéticas de los mismos. Se ha comprobado que la cepa C3H en ratones, es muy susceptible a la infección con T.cruzi, presentando una parasitemia y mortalidad alta (4). Sin embargo la cepa C57BL/10 es más resistente a la enfermedad.

Esto se puede explicar con el complejo principal de histocompatibilidad de ratón ( H-2 ) el cuál regula la defensa anti T.cruzi . Se ha comprobado que el haplotipo H-2<sup>k</sup> ( relacionado con ratones de la cepa C3H ) es el que le da a los ratones la poca resistencia ala infección.

En la cepa C57BL/10 el haplotipo relacionado es el H-2<sup>b</sup>.

## 1.5 DINÁMICA DE TRANSMISIÓN EN LA ENFERMEDAD DE CHAGAS

La infección con T.cruzi en el hombre puede llevarse a cabo a través de :

### DEYECCIONES DE LOS TRIATÓMINOS

Esta es la vía de transmisión más efectiva. Consiste en la defecación del triatómino infectado sobre el huésped, en las heces del insecto se encuentran los tripomastigotes metacíclicos que penetran la piel en el lugar de la picadura. Este proceso de transmisión se facilita cuando el huésped se rasca en el lugar de la picadura, ayudando así la penetración del parásito.

También el parásito puede penetrar por la mucosa oral y nasal, si el huésped se frota la boca o la nariz con los dedos contaminados con materias fecales de triatóminos infectados.

### INFECCIÓN A TRAVÉS DE LA PLACENTA

La transmisión transplacentaria de T.cruzi es posible en la segunda mitad del embarazo, lo que indica que este parásito es capaz de producir fetopatías y no embriopatías; o afecciones congénitas que se pueden desarrollar después del nacimiento del niño infectado.

La transmisión es siempre un accidente, en el cual se conjugan dos hechos : presencia de tripomastigotes en sangre y aumento en la permeabilidad placentaria. Lo que indica que la repetición del fenómeno en los próximos embarazos de una madre que haya tenido un hijo chagásico, si bien es posible, es muy poco frecuente. Los parásitos producen en el feto una infección generalizada aguda, con parasitemias elevadas e innumerables nidos de multiplicación en los tejidos, especialmente a nivel del SNC, del miocardio, del sistema reticuloendotelial y de la musculatura esquelética. El niño en el momento del nacimiento, puede presentar bajo peso, hepato y esplenomegalias, y compromiso variable del corazón y del SNC.

#### TRANSFUSIÓN SANGUÍNEA

Esta forma de transmisión de la enfermedad de Chagas, es muy importante, ya que en países en donde no se tiene un control adecuado de los donadores de sangre, es muy posible la transmisión de T.cruzi a otras personas, las cuales ya son susceptible a adquirir la infección. Esto sucede, por que el parásito es viable a la temperatura de 4°C , y puede durar viable hasta por dos meses, condiciones bajo las cuales se almacena la sangre de los donadores.

## LECHE MATERNA

Existen muy pocos estudios en cuanto a esta vía, sin embargo se ha reportado un caso de infección. Esta vía puede ser importante, si la madre contrae la infección en el periodo en el cual amamanta a su hijo. (10).

## INFECCIONES EN EL LABORATORIO

Esta forma de transmisión de la enfermedad, es muy importante, ya que si no se tiene cuidado en el manejo de los animales que se están trabajando, o en los animales que mantienen la cepa de T.cruzi existe un gran riesgo de infección.

## EXPERIMENTALMENTE

Experimentalmente se han demostrado otras vías de infección tales como :

oral

nasal

conjuntival.

Las cuales se pueden llevar a cabo de manera directa por las heces de los triatóminos infectados, o por contacto con sangre contaminada y diferentes animales de experimentación.



Los estudios relacionados con estas vías de transmisión no son muchos. Estas últimas vías no son naturales por lo que no tienen mucha relevancia en el ciclo biológico de T.cruzi que ocurre en la naturaleza. (9).

Estos procesos de infección afectarían más a las personas que se dedican por cuestiones de trabajo, al manejo constante de animales, y del parásito.

# OBJETIVO

## II. OBJETIVO

Analizando la dinámica de transmisión de la enfermedad de Chagas, nos damos cuenta que en la naturaleza, T.cruzi se transmite mediante las heces de los triatóminos infectados, y artificialmente se logra la transmisión por inoculación intra peritoneal ( i.p.) y oral en ratones. Esto nos indica que T.cruzi puede ser transmitido a través de varias vías.

Pensando que en la naturaleza los animales carnívoros se alimentan cuando cazan a su presa, es posible que un animal presa que este infectado con T.cruzi pueda ser fuente de transmisión para la adquisición de la enfermedad de Chagas.

Por esta razón se propuso el siguiente objetivo :

Demostrar si ratones sanos, pueden infectarse al efectuar el canibalismo sobre ratones infectados con T.cruzi y de esta manera establecer si el carnivorismo es una vía de transmisión en la naturaleza. De ser así entonces se puede prescindir de la presencia de triatóminos en una zona para que prevalezca la enfermedad de Chagas.

# MATERIAL Y MÉTODOS

### III. MATERIAL Y METODOS.

#### III.1 PARASITOS

Se trabajó con la cepa Querétaro de T.cruzi, mantenida en ratones.

#### III.2 DISTRIBUCIÓN POR LOTES DE LOS ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

LOTE A : 10 ratones control ( - ) sin Inocular con T.cruzi

LOTE B : 5 ratones control ( + ) Inoculados por vía i.p. con T.cruzi

LOTE C : 10 ratones control ( + ) Inoculados por vía oral, mediante cánula,  
con T.cruzi

LOTE D : 10 ratones sometidos a canibalismo, sobre ratones infectados  
con T.cruzi.

#### III.3 MANTENIMIENTO DE T.cruzi EN RATON.

Se utilizaron ratones hembras o machos, de la cepa CFW, a los cuales se les inoculó por vía intraperitoneal ( i.p. )  $10^6$  tripomastigotes sanguíneos, se hizo un seguimiento de parasitemia y cuando se alcanzó el pico de parasitemia se extrajo la sangre por punción cardiaca, y con esta se inocularon por vía i.p. nuevos ratones.

#### III.4 INFECCION DE RATONES POR VIA i.p., ORAL Y CANIBALISMO

LOTE A: se utilizaron 10 ratones sin inocular con T.cruzi, como control negativo de infección.

LOTE B : se inocularon 5 ratones por vía i.p. con  $10^6$  tripomastigotes sanguíneos por cada ratón, en un volumen de 200  $\mu$ l de sangre.

LOTE C : se inocularon 10 ratones por vía oral mediante cánula y previamente anestesiados con éter con una dosis de  $10^6$  tripomastigotes sanguíneos por cada ratón, en un volumen de 200  $\mu$ l de sangre.

LOTE D : ( canibalismo ), este lote se dividió en dos grupos de 5 ratones, cada grupo se dejó en ayunas durante 24hrs. una vez transcurrido este periodo, se colocó a cada grupo un ratón que presentaba una parasitemia de  $10^6$  tripomastigotes/ml de sangre, el cual sirvió de alimento a los ratones en ayunas.

### III.5 DETERMINACION DE CURVAS DE PARASITEMIA.

A partir del noveno o décimo día posinfección, los ratones fueron sangrados por la cola cada tercer, cuarto o quinto día, hasta el día 38 o hasta su muerte. Se extrajeron 10 µl de sangre que se diluyó 1/100 con PBS, y se contó el número de tripomastigotes / ml de sangre mediante un hemocitómetro.

### III.6 OPTIMIZACION DE LA TECNICA DE ELISA INDIRECTO PARA LA DETECCION DE ANTICUERPOS anti-T.cruzi

La detección de Ac's anti-T.cruzi en ratones se hizo mediante la técnica de ELISA indirecto. Primeramente se optimizaron las condiciones de trabajo en términos de concentración óptima de antígeno, dilución óptima de suero y de conjugado ; posteriormente se probaron todos los sueros de los ratones con las condiciones optimizadas ya establecidas.

- Se utilizó una placa para inmunoensayos de 96 pozos ( COSTAR. E.I.A./R.I.A. plates, medium binding ).
- Como antígeno se emplearon epimastigotes de T.cruzi cepa Querétaro fijados con paraformaldehído al 2%.

- Posteriormente se dejó secar la placa con los epimastigotes aproximadamente 72hrs.

- Una vez secos todos los pozos con el Ag, se lavó 3 veces con PBS-T20 al 0.5%.

- Se bloqueó con BSA al 1% en PBS-T20 agregando 200 µl / pozo y se dejó a temperatura ambiente ( TA. ) 2 hrs.

- Se probaron 2 diferentes diluciones del suero de un ratón infectado cuya seropositividad a T.cruzi se había confirmado previamente. De este modo se agregaron 100 µl de las diluciones en los correspondientes pozos a concentraciones de 1/100, 1 / 1000 y 1 / 10,000.

- Se dejó incubando 24hrs. a 4° C.

- Se lavó 3 veces con PBS-T20

- Como conjugado se empleó anticuerpos de cabra específico a cadenas γ de inmunoglobulinas de ratón, acoplado a peroxidasa Goat-anti-mouse-peroxidase, ( GAM-POD ). Y se agregaron 100 µl / pozo a diluciones de : 1 / 10,000 y 1 / 20,000.



- Se dejó incubar 2hrs. a TA.
- Se lavó 3 veces con PBS-T20
- Se agregaron 100 µl / pozo del sustrato TMB, ( ver apéndice ) dejando actuar de 10-20 minutos.
- La reacción se paró agregando 100 µl / pozo de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1N.
- La lectura se llevó a cabo espectrofotométricamente a 450nm.

### III.7 DETECCIÓN DE ANTICUERPOS anti-T.cruzi en ratones

Para la detección de Ac's anti-T.cruzi se empleó una concentración de 10<sup>5</sup> epimastigotes / pozo, suero de los ratones diluidos 1 / 100 y el conjugado GAM-POD diluido 1 / 10,000 de acuerdo a los resultados de la optimización del ensayo.

Se obtuvieron los sueros de cada ratón al día 38 posinfección, mediante extracción de sangre por punción cardíaca.

### III.8 PREPARACION DE CORTES HISTOLOGICOS DE CORAZON DE RATONES INOCULADOS CON T.cruzi

Puesto que la cepa Querétaro de T.cruzi es cardiotrópica se investigó la presencia de amastigotes en los corazones de los ratones ensayados realizando los siguientes pasos:

- Se extrajeron los corazones de cada ratón sobreviviente al día 38 posinfección después de haberles extraído sangre para la obtención de los sueros probados en el ensayo de ELISA indirecto.
  
- Fijación con formol al 10% : inmediatamente después de la extracción, el corazón se colocó en formol al 10%, durante por lo menos 24 hrs.
  
- Deshidratación e inclusión en parafina : la deshidratación de los corazones se llevó a cabo embebiéndolos en soluciones crecientes de etanol durante 10 minutos en cada solución, empezando con una concentración al 96% y terminando en etanol absoluto y luego en xilol concentrado.
  
- Una vez realizada la deshidratación, los corazones se colocaron en parafina fundida durante 1 hr.

Posteriormente cada corazón se colocó en moldes rellenos de parafina fundida, y una vez que éstos se endurecieron se llevaron a cabo los cortes de los órganos.

- Cortes : estos se hacen a 4 micras de espesor aproximadamente, con microtomo y a diferentes profundidades del corazón. Los cortes se colocaron sobre un portaobjetos y se dejaron secar para poderse teñir.

- Tinción : la tinción que se utilizó para estos cortes, es la de Eosina-Hematoxilina, la cual se caracteriza por teñir a los núcleos de color azul por la hematoxilina, y al citoplasma de color rosa por la eosina.

- Montaje : una vez teñidos todos los cortes, se cubrieron con una resina sintética y se colocó un cubreobjetos encima de cada uno.

# RESULTADOS

#### IV. RESULTADOS.

Los experimentos se reportan en términos de porcentaje de mortalidad para cada lote de ratones, determinación de curvas de parasitemia, presencia de Ac's anti-T.cruzi y presencia de nidos de amastigotes en corazón.

##### IV.1 PORCENTAJE DE MORTALIDAD.

Se determinó el porcentaje de mortalidad de los ratones infectados con T.cruzi hasta el día 38 posinfección. El resultado se muestra en la TABLA I.

LOTE	A	B	C	D
Vía de Inoculación	S/ Infectar	Vía i.p.	Vía Oral	Canibalismo
% de mortalidad	0 (0/10)	60 (3/5)	12.12 (1/9)	0 (0/10)

TABLA I. Pcentage de mortalidad por cada lote de ratones, hasta el día 38 posinfección.

Los resultados de la TABLA I indican, en primer lugar, que la muerte de los ratones experimentados se debe a la infección por T.cruzi, ya que sobrevivieron todos los ratones sin inocular empleados como control negativo de infección.

En cuanto a los otros lotes, se observa que los ratones inoculados por vía oral ( LOTE C ), y los sometidos a canibalismo (LOTE D ), tienen un porcentaje de mortalidad más bajo que los ratones inoculados por vía i.p. (LOTE B ); esto tiene una explicación si se toma en cuenta que los tripomastigotes sanguíneos son lábiles a ambientes ácidos como el jugo gástrico; posiblemente el paso por este medio influye en la destrucción de los parásitos, de manera que la cantidad de ellos que realmente infecta al huésped es menor que los inoculados inicialmente, lo que se compara con los inoculados i.p., puesto que en este caso se inoculan sin pasar por ninguna barrera inespecífica como lo es el tracto gastrointestinal.

## IV.2 DETERMINACION DE CURVAS DE PARASITEMIA.

Para analizar el efecto de la infección por T.cruzi en ratones, se determinó la curva de parasitemia que se presentaba para cada ratón, cuantificando el número de tripomastigotes / ml de sangre, cada tercer, cuarto o quinto día, a partir del día 9 o 10 hasta el día 38 posinfección, TABLAS II, III y IV.

Se construyó la curva de parasitemia promedio por cada lote de los ratones experimentados ( GRAFICA 1 ).

Los ratones sin infectar se emplearon como control negativo de infección para demostrar que el efecto que se presenta en los ratones inoculados por T.cruzi se debe a la presencia del parásito y no al ambiente donde se mantienen los ratones ( resultados no mostrados ).

Se inocularon ratones por vía i.p. como control positivo de infección, a dosis de  $10^6$  tripomastigotes / ratón. Con esta dosis se presenta parasitemia detectable en el 100% de los ratones durante el curso de la infección.

( TABLA II, GRAFICA 1 )

Los ratones inoculados por vía oral se infectan para tener un control de vía de inoculación puesto que los ratones sometidos a canibalismo se iban a infectar por esta vía ( TABLA III, GRAFICA 1 ).

Día Posinf.	Nº de ratón	No. Tripomastigotes sanguíneos/ml sangre ( $\times 10^6$ )				
		1	2	3	4	5
10		0	ND	2	1	1
14		0	ND	ND	1	5
16		5	ND	9	1	4
18		7	ND	17	1	9
21		13	ND	8	1	25
23		7	ND	30	<1	0
25		5	ND	23	<1	3
30		0	7	X	0	0
38		X	0	X	0	0

TABLA II. Parasitemia presentada en los ratones infectados por vía i.p. Se inocularon 5 ratones con  $10^6$  tripomastigotes/ 200 $\mu$ l por ratón.

( LOTE B ) ND = No Determinado, X = Muerte del ratón.



No. de ratón Día Posinf.		No. tripomastigotes sanguíneos/ml. sangre (x10 <sup>6</sup> )								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
9	0	0	<1	0	0	0	0	0	<1	0
14	0	0	8	ND	0	0	0	0	1	0
17	0	0	4	0	0	0	0	0	1	0
21	0	0	ND	0	0	0	0	0	1	0
23	0	0	3	0	0	<1	0	0	0	0
25	0	0	3	0	0	3	0	<1	0	0
30	0	0	0	0	ND	X	0	0	0	0
38	0	0	0	0	0	X	0	0	0	0

TABLA III. Parasitemia presentada en los ratones inoculados artificialmente por vía oral.

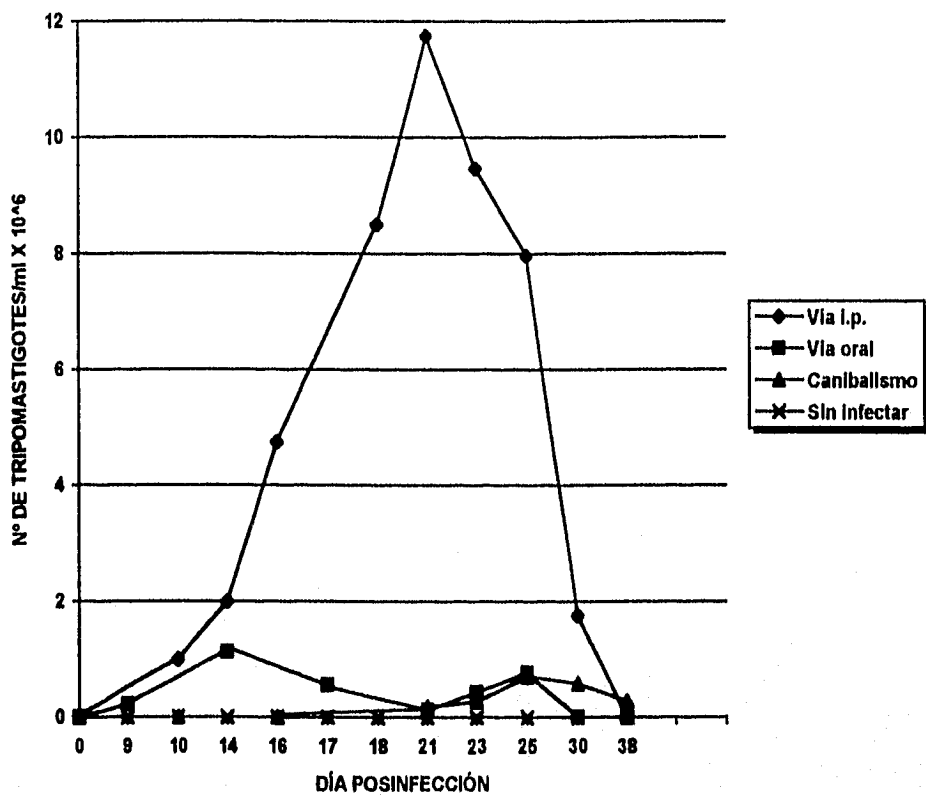
( LOTE C ) ND = No Determinado, X = Muerte del ratón.

No. de ratón Día Posinf.		No. tripomastigotes sanguíneos/ml. sangre (x10 <sup>6</sup> )									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
21	0	<1	0	0	<1	0	0	0	0	0	0
23	0	<1	0	<1	<1	0	0	0	0	0	0
25	0	2	0	3	2	0	0	0	0	0	0
30	0	<1	0	<1	4	0	0	0	0	0	0
38	0	<1	0	<1	<1	0	0	0	0	0	0

TABLA IV. Parasitemia presentada en los ratones sometidos a canibalismo.

( LOTE D )

GRÁFICA N° 1.



GRAFICA 1. Curvas de parasitemia promedio para cada lote de ratones. De acuerdo a la cinética de infección, se iba graficando el número promedio de tripomastigotes sanguíneos / ml sangre para los ratones de cada lote, por cada día de postinfección.

En la gráfica 1 se observa que los ratones sin infectar ( LOTE A), no presentan parasitemia durante el experimento. Los ratones inoculados por vía i.p., presentan una curva de parasitemia, en la que al día 14 posinfección, hay  $2 \times 10^6$  tripomastigotes / ml, y llega al pico de parasitemia al día 21 posinfección presentando  $11.75 \times 10^6$  tripomastigotes/ml, el número de parásitos disminuye notablemente, y en el día 30 posinfección, hay  $1.75 \times 10^6$  tripomastigotes / ml, hasta disminuir a cero en el día 38 posinfección.

En cuanto a las curvas que presentan los lotes C y D, se observa que el número máximo de parásitos que se llegan a observar en sangre es mucho menor que el que se presenta para la curva de los ratones inoculados por vía i.p.

En los ratones inoculados por vía oral de manera artificial ( LOTE C ), se observa el pico de parasitemia al día 14 posinfección, con un número de  $1.125 \times 10^6$  tripomastigotes/ml, y en los siguientes días de la infección el número de parásitos disminuye hasta llegar a cero el día 38 posinfección.

En los ratones sometidos a canibalismo ( LOTE D ), se observa que la parasitemia no se presenta hasta el día 21 posinfección, presentándose el pico de parasitemia el día 25 posinfección con un número de parásitos de  $0.7 \times 10^6$  tripomastigotes / ml, este número disminuye llegando a  $0.27 \times 10^6$  tripomastigotes / ml en el día 38 posinfección.

Los resultados anteriores, indican que existe un comportamiento totalmente diferente en los ratones inoculados por vía i.p., y en los ratones inoculados oralmente de manera artificial o mediante canibalismo, sin embargo entre los LOTES C y D, hay similitud en cuanto a que en los picos de parasitemia se alcanzó casi la misma cantidad de tripomastigotes sanguíneos.

Este comportamiento indica que la vía de inoculación influye en la presentación de las curvas de parasitemia en ratones.

Con base en lo anterior se concluye que en los ratones inoculados por vía oral y en los sometidos a canibalismo, existe un comportamiento similar, ya que las curvas son muy parecidas; ambas presentan pico de parasitemia con muy pocos parásitos, comparándolas con la curva que presentan los ratones inoculados por vía i.p. Estos resultados se deben a que no todos los parásitos inoculados inicialmente por vía oral llegan a sangre, lo mismo sucede para los ratones sometidos a canibalismo.

También se observa que los picos de parasitemia, presentados por los lotes C y D están notoriamente desfasados, para los ratones del lote C el pico se presenta al día 14 y para el lote D al día 25 posinfección.

### IV.3 DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS anti- T.cruzi

IV.3a Optimización de la técnica de ELISA indirecto para la detección de anticuerpos anti-T.cruzi.

Se determinaron las concentraciones óptimas de Ag acoplado a los pozos, y diluciones óptimas de suero y conjugado.  
( ver material y métodos ).

El resultado muestra se muestra en la GRAFICA 2.

Este resultado muestra que la concentración de antígeno óptima es de  $10^5$  epimastigotes/ml ya que es la concentración en la cual se presentó mayor absorbancia a las dos diluciones empleadas del conjugado; y a las diluciones de 1/100 y 1/ 1000 del suero. Las diluciones óptimas de suero y conjugado son 1/100 y 1/10,000 respectivamente debido a que presentan la mayor absorbancia.

IV.3b Detección de anticuerpos anti T.cruzi en sueros de ratones.

Una vez establecida la concentración óptima de antígeno, y las diluciones óptimas de suero y conjugado se investigó la presencia de anticuerpos anti-T.cruzi.

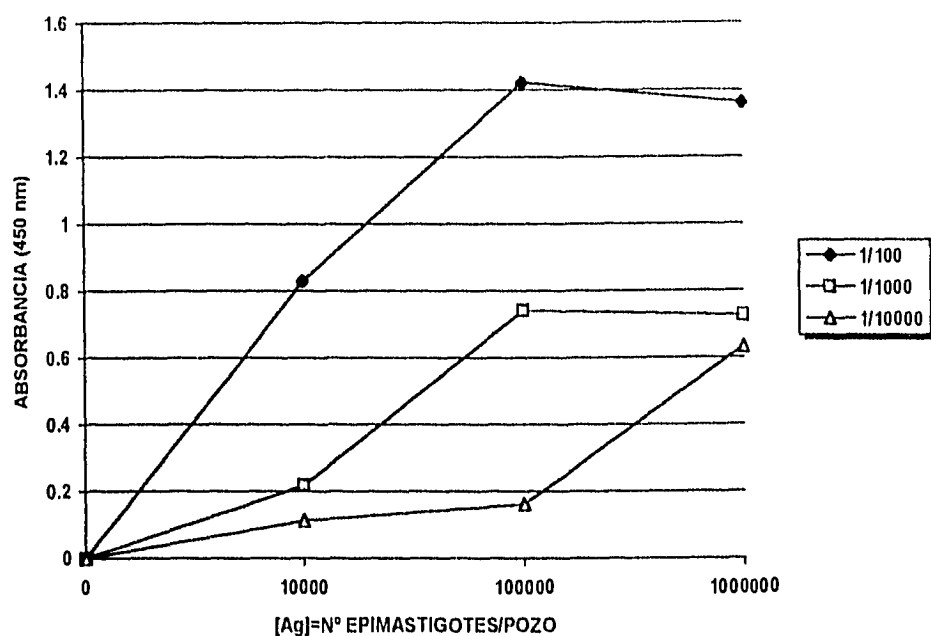
En este proyecto se determinaron anticuerpos anti-T.cruzi para comprobar que la infección se había llevado a cabo en los ratones.

Para determinar si los sueros de los ratones empleados en el estudio eran positivos o negativos se realizó un ELISA indirecto con las condiciones optimizadas anteriormente. Se consideraron como positivos únicamente aquellos sueros que presentaron una absorbancia mayor a la absorbancia promedio de los sueros controles más dos desviaciones estándar.

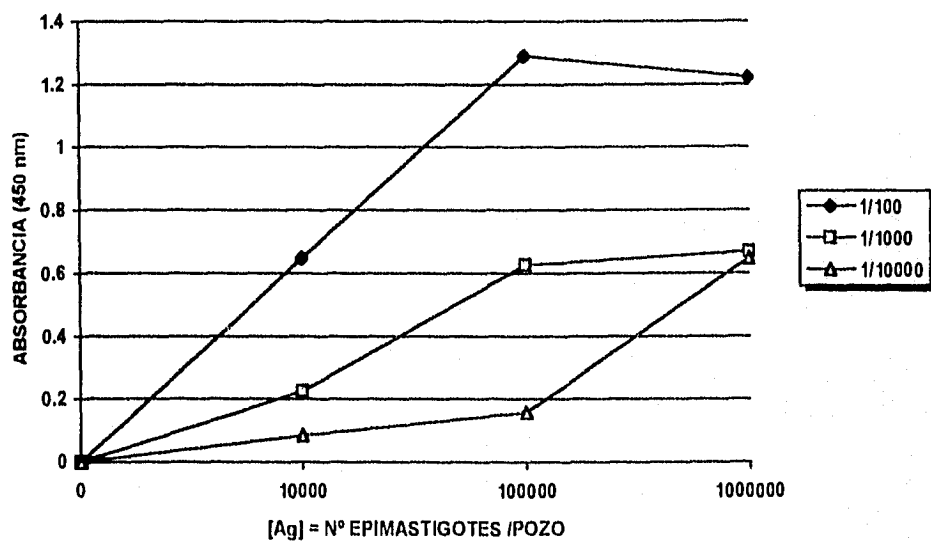
( Seropositivo =  $\bar{A}_{\text{sueros control (-)}} + 2 SD$  ).

Observamos que todos los sueros de los ratones inoculados por vía i.p., oral y los sometidos a canibalismo son positivos a T.cruzi y por tanto se llegaron a infectar con el parásito. También se observa que no se presentaron falsos positivos en ninguno de los sueros control negativos.

CONJUGADO 1/10000

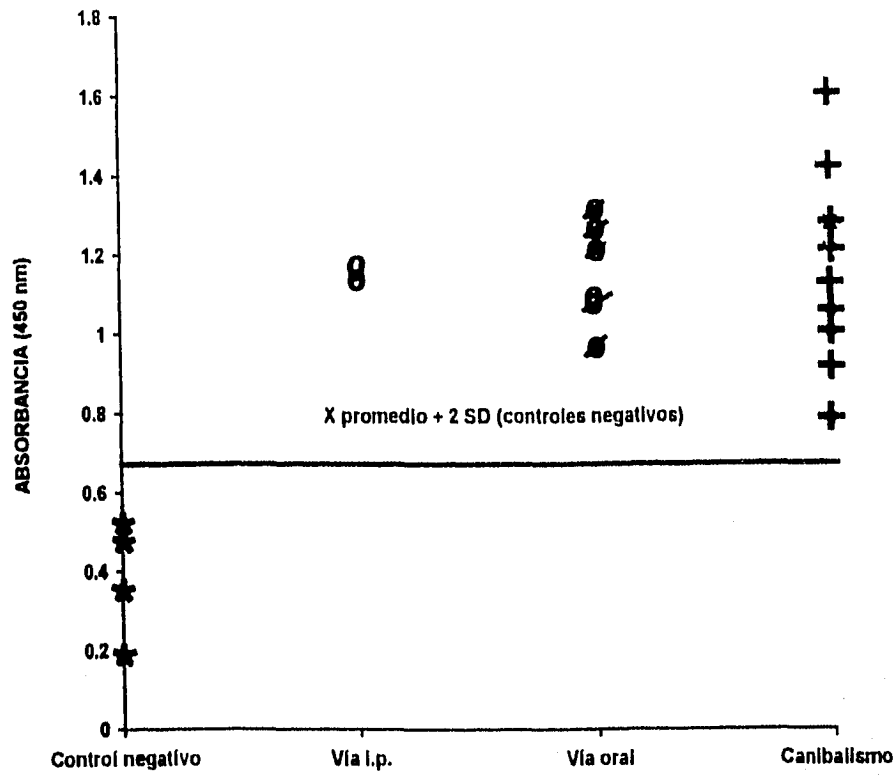


CONJUGADO 1 / 20000



GRÁFICA 2. Determinación de la concentración óptima de epimastigotes/pozo y de las diluciones óptimas de suero y conjugado para ELISA indirecto. Se empleó un suero de ratón positivo a *T. cruzi* determinado previamente mediante pruebas de Western - Blot, Hemaglutinación indirecta y ELISA en un laboratorio de referencia. Diluciones del suero:  $\blacklozenge$  1/100,  $\square$  1/1000,  $\triangle$  1/10000.

GRÁFICA 3



GRÁFICA 3. Detección de anticuerpos anti-*T.cruzi* en sueros de ratones. Se obtuvieron los sueros de los ratones en estudio y se detectó la presencia de anticuerpos anti-*T.cruzi* mediante ELISA indirecto; utilizando cuatro sueros de referencia negativos a *T.cruzi*.



#### IV.4 PORCENTAJE DE RATONES CON NIDOS DE AMASTIGOTES.

Para investigar si en los ratones de experimentación se produjeron nidos de amastigotes, se realizaron cortes histológicos de sus corazones, tiñéndolos con Eosina-Hematoxilina.

En la TABLA V se observan los resultados.

	s/ Infectar	Vía i.p.	Vía oral	Canibalismo
% de ratones con nidos de amastigotes.	0 (0/5)	80 (4/5)	25 (2/8)	40 (4/10)

TABLA V. Porcentaje de ratones con nidos de amastigotes.

Observamos que los ratones sin infectar ( LOTE A ), no presentaron nidos de amastigotes, los ratones inoculados por vía i.p. ( LOTE B ) presentaron el mayor porcentaje de ratones con nidos de amastigotes con un 80%. En los ratones inoculados por vía oral ( LOTE C ) se presenta un 25% de ratones con nidos de amastigotes. Mientras que en los ratones sometidos a canibalismo se obtuvo un 40% de ratones con nidos de amastigotes.

Esto significa que la vía de inoculación influye en la producción de nidos de amastigotes, puesto que en los lotes de ratones inoculados por vía oral, ya sea natural o artificial, se presenta un porcentaje menor de ratones con nidos de amastigotes que los inoculados por vía i.p.

Al comparar los resultados obtenidos entre los ratones inoculados por vía oral de manera artificial y los sometidos a canibalismo, se observa que el lote formado por estos últimos tiene un porcentaje mayor de ratones con nidos de amastigotes; esto indica que posiblemente estos ratones, en el momento de alimentarse con los ratones infectados, consumieron gran cantidad de parásitos, y por lo mismo tuvieron mayor número de tripomastigotes sanguíneos; esto es sólo una posibilidad ya que no se puede saber la cantidad exacta que infectó a cada ratón.

# DISCUSIÓN

## V. DISCUSION.

Los resultados obtenidos indican que existe gran diferencia, entre los obtenidos por vía i.p. y por vía oral (artificialmente y canibalismo ).

En primer lugar, se observa que en la vía i.p. el porcentaje de mortalidad, es seis veces mayor que el porcentaje de mortalidad que presentan los ratones inoculados por vía oral.

En cuanto a las parasitemias, se observa que todos los ratones inoculados por vía i.p. presentan parásitos en sangre, lo que no sucede con la vía oral, ya que sólo un 30% presenta parásitos en sangre. Lo que coincide con los hallazgos de Calvo y Col; ( 8 ) quienes encuentran que el 30% de los ratones inoculados por vía oral presentan parásitos en sangre cuando son inoculados con tripomastigotes sanguíneos.

También hay diferencias en el pico de parasitemia, ya que el número de tripomastigotes/ml en la vía i.p. es aproximadamente seis veces mayor al número que presentan los ratones inoculados por vía oral.

Otro factor importante, es el tiempo en el cual se presenta el pico de parasitemia, en la vía i.p. se presenta al día 21, y en la vía oral por inoculación artificial se presenta al día 14, y en la vía oral natural ( canibalismo ) se presenta al día 25.

El resultado de los cortes histológicos, indica que hay mayor número de ratones con nidos de amastigotes inoculados por vía i.p. ( 80% ), que en la vía oral ( 25-40% ).

Esta diferencia en los resultados se debe a la vía de transmisión empleada. Posiblemente lo que sucede en la vía i.p., es que una vez efectuada la inoculación, los parásitos atraviesan el peritoneo, y una vez dentro de la cavidad peritoneal, son fagocitados por los macrófagos, y de esta manera se reproducen; ya que al momento de ser fagocitados, se transforman a amastigotes, se reproducen por fisión binaria hasta lisar el macrófago que los contiene. Y una vez en la circulación, son fagocitados nuevamente por otros macrófagos, y así sucesivamente hasta que llegan a la circulación sanguínea, dando altos niveles de parasitemia.

Por la vía oral, los parásitos tienen que pasar por más barreras, ya que atraviesan directamente el tracto gastrointestinal, y al llegar al estómago, se pierden parásitos ya que estos son lábiles a ambientes ácidos como el jugo gástrico; los parásitos que pasan al intestino son fagocitados por macrófagos de nódulos mesentéricos y sucede lo mismo que en la vía i.p., sólo que en este caso el número de parásitos que llega a la sangre es seguramente mucho menor.

Una pequeña diferencia se observa en las curvas de parasitemia de los ratones inoculados por vía oral artificialmente y los sometidos a canibalismo, los primeros presentan dos picos pequeños, y los últimos solo presentan un pico con la misma cantidad de parásitos en sangre, pero al día 25. Esto se puede explicar considerando que alrededor de la segunda semana se desarrolla una respuesta inmune de tipo humoral que disminuye el número de parásitos en sangre, y dado que la dosis que realmente infecta al ratón es baja en estos dos casos, los parásitos se pueden eliminar con mayor rapidez, lo que no sucede en la vía i.p., por el mayor número de parásitos que se ha desarrollado hasta la segunda semana.

Quizá la diferencia en el número de picos que se presentan en la vía oral se debe a que al ser inoculados artificialmente pasan de una manera más facilitada por la cánula que se les introduce; en cambio en los ratones sometidos a canibalismo los parásitos forzosamente tienen que pasar por el estómago.

# CONCLUSIONES

## VI. CONCLUSIONES.

Con base en los resultados obtenidos se concluye que:

- T.cruzi se puede transmitir por carnivorismo, por lo menos realizado mediante canibalismo.
  - La vía i.p. favorece la infección por T.cruzi mientras que por vía oral la magnitud de la infección es menor.
  - Existe una alta probabilidad de que ratones que presentan parasitemia, presenten nidos de amastigotes.
  - El grado de infección depende de la vía de transmisión.
  - La enfermedad de Chagas podría existir en lugares donde no existan triatóminos si se efectúa un carnivorismo natural sobre animales infectados, esto implica que la gente en contacto con animales infectados también está en riesgo de infectarse.
- Otra implicación es la generación de una nueva zona endémica al pasar accidentalmente un animal infectado a lugares donde no existen triatóminos, pero que si se realiza un carnivorismo natural.



# APÉNDICE

## VII. APÉNDICE

### 1. PBS. Dulbecco's PBS ( DPBS )

NaCl            8g     ( 138 mM )

KCl             0.2g   ( 2.7 mM )

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>       1.15g   ( 8.1 mM )

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>       0.2g   ( 1.2mM )

H<sub>2</sub>O megapura 1000ml.

Filtrar por 0.22  $\mu$ m y esterilizar en autoclave. Se conserva indefinidamente a temperatura ambiente.

### 2.- PBS-azida.

NaCl 0.15M, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10mM, pH 7.8, azida de sodio 0.01%

Para preparar un Stock 10x :

NaCl                    90g

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ,2 H<sub>2</sub>O      13.8g

Disolver en 900ml de H<sub>2</sub>O bd estéril

Ajustar el pH a 7.8 con NaOH 5M

NaN<sub>3</sub> 1g

Aforar 1 l con H<sub>2</sub>O bd estéril

Filtrar sobre membrana de 0.2 μm

Se conserva varios meses a TA.

### 3.- PBS-T20

NaCl 0.15 M, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10 mM, pH 7.8, 0.5% Tween 20

Para preparar un Stock 10x :

NaCl 90g

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2 H<sub>2</sub>O 13.8g

Disolver en 900 ml de H<sub>2</sub>O bd estéril

Ajustar el pH a 7.8 con NaOH 5M

Aforar 995 ml

Filtrar sobre membrana de 0.2 μm

Tween 20 5ml

Se conserva 6 meses a TA.



7.- Solución amortiguadora para sustrato.

0.1 M acetato de sodio / ácido cítrico pH 6.0

Preparar 50 ml de solución de ácido cítrico 0.1 M ( 1.05 g de ácido cítrico monohidratado en 50 ml de agua bd autoclaveada )

Pesar 1.36g de acetato de sodio

Disolver en 80 ml de agua bd autoclaveada

Agregar ácido cítrico 0.1 M hasta la obtención de pH 6.0

Filtrar sobre membrana de 0.2  $\mu$ m

Guardar a 4° C

8.- Solución de sustrato a preparar al momento de su uso : 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina ( 0.3 g/l ),  $H_2O_2$  1.3 mM en buffer de ác. cítrico/acetato pH 6.0.

9.- Solución de paro de reacción  $H_2SO_4$  1N.

10.- Eosina.

Eosina Stock :

Eosina y amarillenta	1g
Agua destilada	20 ml
OH-96%	80 ml

Eosina solución de trabajo :

Eosina stock	1 parte
OH-80%	3 partes.

11.- Hematoxilina de Harris.

Hematoxilina	2.5g
Alumbre de potasio	
o	
Sulfato de aluminio y amonio	50g
Oxido rojo de mercurio	1.25g
Alcohol 100%	25 ml
Agua destilada	500 ml

Procedimiento :

- Disolver la hematoxilina en el alcohol absoluto.
- Disolver el alumbre de potasio en el agua caliente ( 500 ml )
- Agregar la hematoxilina-alcohol, cuando estén a punto de ebullición, agregar el óxido de mercurio poco a poco.
- Retirar del calor y hacer cambio brusco en hielo.
- Filtrar y usar.

# BIBLIOGRAFÍA



## VIII. BIBLIOGRAFIA

- 1.- Tay Z. J., Schenone H., Sánchez V. J. T., y Robert G. L. Estado actual de los conocimientos sobre la enfermedad de Chagas en la República Mexicana. En "Ciclo de conferencias parasitológicas In Memoriam del Dr. Antonio Acevedo Hernández". (1992) pp 38-78.
- 2.- Garry B. Takle & David. Snary. South American trypanosomiasis (Chaga's disease). Immunology and Molecular Biology of parasitic infections. In: Kenneth S. Warren. Blackwell scientific Publications. Boston USA third Edition. (1993). p 213-236.
- 3.- Tay J., Schenone H., Sánchez J.T., Robert L. Estado Actual de los conocimientos sobre la enfermedad de Chagas en la República Mexicana. Bol. Chil. Parasitol (1992) 47:43-53
- 4.- Zlgman Brener. Immunology to Trypanosoma cruzi. Adv. Parasitol. (1980). 18:247.
- 5.- Zlgman Brener. Biology of Trypanosoma cruzi. Ann. Rev. Microbiol (1973). 27:349-381.

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

6.- Kierszenbaum F. and Sztein B. M. Chaga's disease ( American Trypanosomiasis ). In Parasitic Infection and the Immune System. Kierzenbaum, F. Academic Press, Inc. USA ( 1994 ) p 53-87.

7.- Velasco O. La enfermedad de Chagas. Secretaría de Salud. Dirección general de epidemiología. Instituto Nacional de Diagnóstico y referencia epidemiológicos. " Dr. Manuel Martínez Baez ". Publicación técnica del INDRE No 8 ( 1991 ).

8.- Calvo Méndez M<sup>a</sup> L. La vía oral : una puerta de acceso para T.cruzi. Rev Lat-amer. Microbiol. ( 1992 ). 34: 39-42

9.- Ortega M. y Tay J. Ensayo experimental de diferentes vías de infección por T.cruzi en ratón blanco. Bol. Chile. Parasit; ( 1972 ), 27: 6-11.

10.- Achilèal Bittencourt, Moisés Sadigursky y Col. Evaluation of Chaga's disease transmission though breast-feeding. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. Río de Janeiro. ( 1988 ) Vol. 83 ( 1 ) : 37-39 jan/mar.

11.- Zinzer. Microbiología. 18<sup>a</sup> edición. p 1371

12.- Schmidt G. D. Fundamentos de parasitología. TOMO 1 p 76.