



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

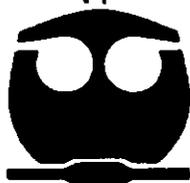
FACULTAD DE QUIMICA

PROPUESTA DE UNA METODOLOGIA PARA
CLASIFICAR PARASITOS EN FUNCION
DE LA VIRULENCIA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

PRESENTA:
DALIA MINERVA TORRES FRAUSTO



MEXICO, D.F.



EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

1998

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

123
29

263864



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:

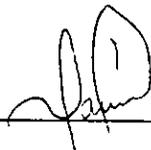
Presidente Prof. Velasco Castrejón Oscar.
Vocal Prof. Gutiérrez Ramos Abel
Secretario Prof. Becerril Flores Marco Antonio
1er. Suplente Prof. Astigarraga Zavaleta Maite
2º. Suplente Prof. Hernández Gómez Luciano

Sitio donde se desarrollo el tema: Facultad de Química, UNAM.



ASESOR DEL TEMA

M. en C. Marco Antonio Becerril Flores



SUSTENTANTE

Dalia Minerva Torres Frausto

AGRADECIMIENTOS.

Especialmente quiero agradecerle a mi tutor y amigo: M. en C. Marco A. Becerril, por su gran apoyo y paciencia que permitieron que esta tesis se llevara a cabo. Mil gracias Marco por haberme regalado las ideas necesarias para la elaboración de esta tesis y por haberme dado la oportunidad de trabajar contigo; gracias también por darme parte de tu tiempo, no solo como tutor sino como amigo.

También les agradezco al Dr. Oscar Velasco Castrejón y al Q.F.B. Abel Gutierrez Ramos: por sus valiosas observaciones y comentarios.

Agradezco a la Máxima Casa de Estudios, y en especial a la Facultad de Química, por haberme dado la oportunidad de realizar uno de mis más grandes logros.

Le agradezco a la Dra. Paz María por su apoyo y por haberme permitido trabajar en su laboratorio.

Por último mil gracias a todos aquellos profesores que han participado en mi formación, incluyendo a mis padres, Jesús y Coco, que han sido mis mejores maestros.

DEDICATORIA

Dedico con todo mi cariño la realización de esta tesis a mis Padres, que han sido para mí, mis más grandes amigos. Gracias por haber depositado en mí toda su confianza, por darme la más grande de las herencias, y por haber compartido conmigo momentos tan dichosos e inolvidables.

También dedico esta tesis a mi hermana, por su comprensión y cariño. Muchas gracias Coco por ser como eres.

No pueden faltar en esta dedicatoria Toño y Toñito: A ti Toñito te dedico esta tesis, por esas maravillosas sonrisitas, y a ti Toño por tu cariño, que te hace ser un hermano más.

A Mauricito: por el gran apoyo y cariño que me brindas día a día. Muchas gracias Mau por formar parte de mi.

A mis abuelitos: Lupe^{*}, Marisol^{*} y Jesús^{*} por su gran amor y cariño, que hace que los lleve siempre en mi corazón.

A todos mis Tíos y Tías: por su cariño.

A Mauricio, Eva, Paty y Abuela: por permitirme ser parte de su familia.

A mi par de amigos David y Larry: por todos esos momentos de locura, y por su incomparable amistad.

“ Estoy preparado para abordar ese gran misterio de las enfermedades pútridas, del que no puedo desprender mi pensamiento, aunque tengo conciencia de su dificultad y de su peligro. “

L. Pasteur

ÍNDICE

I. Introducción	1
II. Hipótesis	3
III. Objetivos	3
IV. Antecedentes	4
IV.1.1 <i>Entamoeba histolytica</i>	4
IV.1.2 Ciclo biológico	4
IV.1.3 Patogenicidad y sintomatología de la amebiasis	9
IV.2.1 <i>Trypanosoma cruzi</i>	13
IV.2.2 Ciclo biológico	15
IV.2.3 Patogenicidad y sintomatología de la enfermedad de Chagas	18
IV.3.1 <i>Toxoplasma gondii</i>	22
IV.3.2 Ciclo biológico	25
IV.3.3 Patogenicidad y sintomatología de la toxoplasmosis	27
IV.4 Virulencia	30
V. Justificación	32
VI. Análisis de la virulencia de <i>Entamoeba histolytica</i>, <i>Trypanosoma cruzi</i> y <i>Toxoplasma gondii</i>, y resultados.	33
VI.1 <i>Trypanosoma cruzi</i> : El modelo ejemplar para clasificar parásitos en función de la virulencia	33
VI.2 Metodología para clasificar a <i>Toxoplasma gondii</i> en función de la virulencia. . .	58
VI.3 Metodología para clasificar a <i>Entamoeba histolytica</i> en función de la Virulencia	65
VII. Discusión de resultados	70
VIII: Conclusión	74
Bibliografía	75

I.- Introducción.

La vasta diversidad de especies que rodean al humano lo han obligado a aprender a convivir con ellas. Algunas le han sido benéficas, otras neutrales, pero existen varias que lo han perjudicado. Las asociaciones entre dos organismos se denominan simbiosis, si ambos se benefician la simbiosis es mutualista; la simbiosis, en la que uno de los organismos llamado comensal se beneficia de otro, denominado huésped, sin causarle daño es llamada comensalismo; la asociación en la que uno de ellos, llamado parásito, vive a expensas de otro, denominado huésped causándole daños, se denomina parasitismo.

En la naturaleza existen decenas de organismos que actúan como parásitos del humano, los cuales se pueden agrupar en protozoarios, helmintos y artrópodos. Un protozoario es un organismo unicelular, eucariote, no presenta pared celular y puede vivir solitario o en grupo. Los helmintos son gusanos que presentan como capa externa un tegumento o cutícula y son organismos pluricelulares que pueden vivir solitarios o en grupo. Los artrópodos son animales invertebrados, con simetría bilateral, multicelulares, de cuerpo segmentado, apéndices segmentados y presencia de exoesqueleto compuesto de quitina.

Dado que un parásito de importancia médica tiene una relación con el humano muy estrecha, a grado de ocasionarle problemas en su salud, es importante conocer los mecanismo que ocurren para producir el daño. A este respecto, es difícil conocer con precisión los daños que ocasionarán, puesto que dependen tanto del grado de susceptibilidad o resistencia del huésped como de la virulencia del parásito. Lo anterior ha hecho difícil la tarea del investigador y del médico en la búsqueda de medicamentos y vacunas que curen y prevengan a la gente de las infecciones parasitarias así como el empleo de pruebas de diagnóstico que identifiquen la etiología y los métodos de control de parasitosis. A pesar de estos obstáculos, los investigadores estudian estos problemas tratando de emplear los modelos más convenientes para encontrar respuestas a sus preguntas sobre la problemática de las enfermedades parasitarias.

Sin embargo, en muchas ocasiones el modelo escogido es inadecuado, lo que entorpece sus investigaciones ya que, aunque se tengan a la mano parásitos de importancia médica mantenidos en animales de experimentación o medios de cultivo, la subpoblación de parásitos que escogen no es la óptima. Por ejemplo para el estudio de vacunas se emplean cepas virulentas y no virulentas de una especie de parásito, dependiendo de la estrategia de estudio; pero aunque encuentran resultados alentadores, no se llega a la optimización en la protección a la infección por no contar con la cepa que presente la virulencia necesaria para lograr su objetivo.

La caracterización de las cepas en función de la virulencia se realiza en muchos laboratorios, sin embargo la clasificación de las mismas se realiza en forma empírica, lo cual provocó que los investigadores seleccionen las cepas bajo criterios netamente empíricos lo que puede ocasionar una mala selección de modelos para los intereses que persiguen; en este sentido, sería importante contar con un banco de parásitos de una especie determinada, clasificados ordenadamente por sus características de virulencia. Esto facilitaría al investigador la elección correcta de una cepa para sus estudios, en este caso en función de la virulencia.

En este trabajo se pretende dar a conocer una guía general que permita clasificar a parásitos de importancia médica en función de su virulencia. Para ello se describirá su aplicación en tres parásitos que servirán de ejemplos en la clasificación general de parásitos. Los tres ejemplos son protozoos que cubren el rango de rutas patogénicas que realizan el resto de los parásitos: desde las vías de entrada y localización en el humano, hasta el comportamiento biológico del parásito en el huésped. Los parásitos son: *Entamoeba histolytica*, *Toxoplasma gondii* y *Trypanosoma cruzi*; *Entamoeba histolytica* es un parásito extracelular, *Trypanosoma cruzi* es intracelular facultativo y *Toxoplasma gondii* es intracelular obligado; los tres protozoarios pueden afectar al humano al grado de ocasionar la muerte, y cubren el amplio espectro de patogénesis de parásitos de importancia médica, incluyendo helmintos y artrópodos.

Las investigaciones sobre estos parásitos permiten dilucidar su papel patogénico en las infecciones y se ha demostrado que la virulencia que presenta depende en mucho de la cepa, puesto que cada uno de ellos está compuesto en la naturaleza por innumerables poblaciones designadas como aislados o cepas. Para entender con más detalle la justificación de su elección en este trabajo, se hará una breve revisión de sus características.

II.- Hipótesis.

Los parámetros que permiten medir diferentes efectos patogénicos ocasionados por distintos parásitos, pueden ser ordenados bajo criterios biológicos que nos permitan la clasificación de las diferentes poblaciones de cada parásito en función de la virulencia que presenten.

III.- Objetivos.

Objetivo general:

En este estudio se propone establecer metodologías bien sistematizadas para clasificar las diferentes poblaciones de los parásitos del humano en función de la virulencia, a partir de los resultados que varios investigadores han obtenido al evaluar su patogenicidad.

Objetivos particulares:

- Establecer una metodología sistematizada para la clasificación de las diferentes poblaciones de un parásito intracelular facultativo (*Trypanosoma cruzi*), un intracelular obligado (*Toxoplasma gondii*) y uno extracelular (*Entamoeba histolytica*) en función de la virulencia.
- Clasificar algunas poblaciones de *Trypanosoma cruzi* empleando el método propuesto.
- Establecer una guía general para la clasificación de otros parásitos del humano como son helmintos, artrópodos y otros protozoos.

IV.- Antecedentes.

IV.1.1 *Entamoeba histolytica*.

Entamoeba histolytica se presenta en la naturaleza en tres estadios morfológicos principales: el trofozoito (forma móvil o vegetativa), el prequiste y el quiste (estos dos últimos son formas inmóviles y de resistencia)¹.

1.- Trofozoito:

Los trofozoitos suelen tener un movimiento activo, se mueven mediante pseudópodos: extensiones citoplasmáticas que pueden formarse en cualquier punto de la superficie del protozoo. Los pseudópodos se emiten con rapidez y su forma es variable, desde cortos, romos y anchos, hasta alargados como dedos de guante. La parte clara y traslúcida, el ectoplasma, que constituye la zona más externa del cuerpo de la ameba, se proyecta hacia afuera para formar el pseudópodo, característicamente hialino en esta especie cuando está recién formado. El endoplasma más granuloso, fluye lentamente hacia el pseudópodo

cuando la ameba se desplaza en la dirección en que éste se ha emitido². En esta fase se alimentan de bacterias mediante fagocitosis y si en las heces estuvieran en contacto con glóbulos rojos los fagocitarían.

El tamaño de los trofozoitos oscila entre 10 y 60 micras, y más frecuentemente entre 15 y 30 micras. El ectoplasma hialino representa más o menos la tercera parte del parásito. Tiene un núcleo excéntrico con una membrana nuclear muy clara cuya superficie está cubierta de gránulos de cromatina uniformes, pequeños y en contacto íntimo, el núcleo presenta un cariosoma pequeño en el centro, y está formado por varios gránulos encerrados en una cápsula, de donde nace una fina red de fibrillas que se dirigen a la periferia del núcleo^{3y4} ver figura 1.

2.- Prequiste:

Cuando los trofozoitos se encuentran bajo condiciones adversas se transforman a formas quísticas de resistencia, expulsan todo el material ingerido y se redondean, a esta fase se le denomina forma prequística; las amibas prequísticas son células incoloras más pequeñas que el trofozoito y carecen de inclusiones de alimentos que los almacenan como reserva^{1,3y5} ver figura 1.

3.- Quiste:

Los quistes son redondos u ovoides, ligeramente asimétricos, miden entre 10 y 20 micrómetros de diámetro, son hialinos, con una pared lisa y refringente que no se tiñe. El citoplasma de los quistes jóvenes contiene vacuolas con glucógeno y cuerpos alargados oscuros de extremos redondeados. Estos cuerpos cromatoides que al parecer contienen ácido ribonucleico y desoxirribonucleico, así como fosfatos, tienden a desaparecer cuando el quiste madura. ^{1,3y5}

El quiste inmaduro tiene un sólo núcleo, de la tercera parte de su diámetro aproximadamente, mientras que el quiste maduro infectante posee cuatro núcleos más pequeños, rara vez en mayor número, ver figura 1.

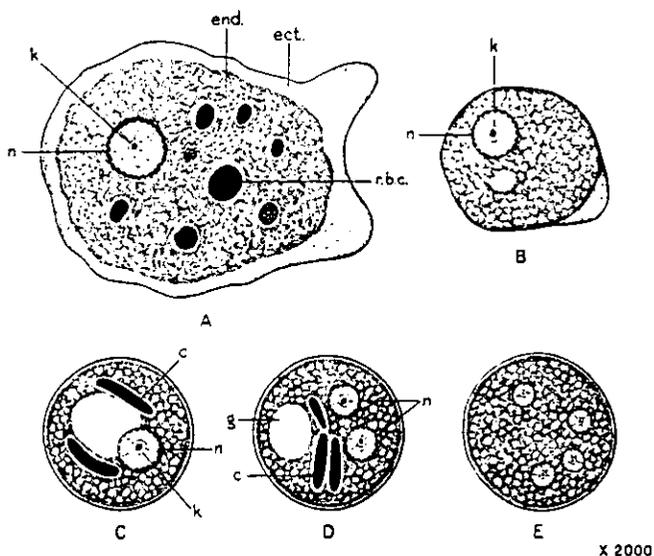


Fig. 1 Representación esquemática de *E. histolytica*. A, trofozoito que contiene glóbulos rojos semidigeridos; B, amiba prequistica sin inclusiones citoplasmáticas; C, quiste mononucleado joven; D, quiste binucleado; E, quiste maduro tetranucleado.

C, cuerpos cromatoides; ect, ectoplasma; end, endoplasma; g, vacuola de glucógeno; k, cariosoma; n, núcleos; r.b.c., glóbulos rojos. Extraído de la referencia 3.

La infección por *Entamoeba histolytica* es cosmopolita, la incidencia generalmente es mayor en las zonas tropicales y subtropicales que en los climas templados.^{1,5 y 6}

La incidencia promedio mundial es alrededor del 10%, aunque en algunas áreas tropicales se han descrito índices tan altos como del 50 u 80 %.² La frecuencia de la infección varía en función de los métodos empleados para el diagnóstico y el número de exámenes realizados en cada caso.⁵ La prevalencia de la infección por *E. histolytica* en la población total de Estados Unidos está probablemente entre el uno y el cinco por ciento.² En Alaska sólo la población indígena presenta una frecuencia relativamente alta, y en México se presenta una incidencia promedio del 2 al 57 %.⁵

Existen diversos factores como la edad, sexo, clima, raza y condiciones socioeconómicas que influyen en la prevalencia de la infección. La prevalencia de la amebiasis en las regiones cálidas puede atribuirse a la insuficiencia de los servicios de sanidad pública en las regiones tropicales y subtropicales. La raza no influye sobre la frecuencia de la amebiasis; todas son susceptibles a estas parasitosis y las condiciones socioeconómicas tienen gran importancia siendo los más afectados los grupos de bajo nivel económico debido a una mala nutrición, hacinamiento y malas condiciones de higiene.^{1 y 5}

IV.1.2 Ciclo biológico.

El ciclo biológico se inicia cuando un huésped ingiere alimento o agua contaminada con quistes de *Entamoeba histolytica*. Una vez que se han ingerido los quistes, éstos pasan a lo largo del tracto digestivo y al pasar por el jugo gástrico, por la acción de los jugos digestivos alcalinos se rompe la pared del quiste, del cual se libera una amiba metaquistica de cuatro núcleos que finalmente se divide en ocho trofozoitos pequeños. El trofozoito vive en la pared y en la luz del colon, especialmente el ciego y el rectosigmoide, se multiplica por fisión binaria, y la división del núcleo corresponde a una mitosis modificada, también pueden reproducirse por formación del quiste que genera una amiba metaquistica, la cual al salir del quiste, produce ocho amébulas.³ La amiba absorbe sus alimentos de los tejidos disueltos por sus enzimas citolíticas e ingiere glóbulos rojos, hemoglobina, sustancias parcialmente sintetizadas por el huésped, y fragmentos de tejidos, todo ello por inclusión en unseudópodo.³

Las amibas inmaduras son arrastradas con el contenido intestinal al ciego, donde pueden ser expulsadas al exterior junto con la materia fecal o establecerse en el intestino grueso. Las condiciones que permiten el establecimiento son: tránsito intestinal lento,

IV.1.3 Patogenicidad y Sintomatología de la amebiasis.

Entamoeba histolytica produce lesiones primarias en el intestino y secundarias fuera de él. Las lesiones intestinales se encuentran en el colon y algunas en la parte baja del íleon. Los focos primarios son más frecuentes en ciego y rectosigmoide. Puede presentarse invasión general secundaria en pacientes con disentería clínica o infecciones leves o latentes; así, el hígado es la víscera que más invade, pero todos los órganos del cuerpo pueden estar afectados.³ Ver fig. 3

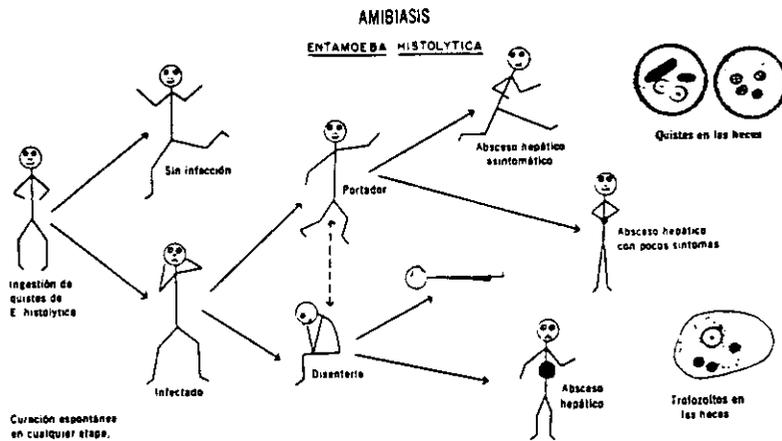


Fig. 3 Formas clínicas de la amebiasis y evolución de la infección.
extraído de la referencia 3.

I.- Amebiasis intestinal.

La amebiasis asintomática es la forma en la cual el parásito vive como comensal en el lumen intestinal. Ésta quizá sea persistente o pueda convertirse en infección extraintestinal.⁶

La primera lesión que se desarrolla ocurre principalmente en el ciego, apéndice o zonas contiguas del colon ascendente es una pequeña zona de necrosis en la mucosa superficial, o una pequeña elevación nodular con una abertura puntiforme que produce una cavidad en forma de botella con células muertas, moco y amibas. En la disentería aguda o crónica, los procesos ulcerados se extienden hacia los lados y hacia abajo, afectando las capas superficiales y profundas del intestino. Las lesiones pueden ir desde pequeñas úlceras crateriformes punteadas, distribuidas sobre una mucosa con aspecto de campo bombardeado, hasta grandes úlceras irregulares con bordes socavados y fondos necróticos, gelatinosos, cubiertos a menudo por una membrana amarilla purulenta; pueden llegar a presentarse grandes áreas de necrosis, que a veces abarcan toda la circunferencia del intestino. La destrucción de los tejidos va seguida de proliferación regenerativa de tejido conectivo; en caso de lesión extensa, suele haber engrosamiento fibroso de la pared del intestino.³

Las complicaciones de la amebiasis intestinal comprenden: apendicitis, perforación, hemorragia, constricción, granulomas yseudolipolisis. Las perforaciones intestinales son más frecuentes en el ciego, y la lesión de un vaso grande puede producir hemorragia intensa. Las constricciones suelen afectar ciego y sigmoides. Los granulomas amebianos son engrosamientos inflamatorios duros, dolorosos, móviles y nodulares de la pared intestinal alrededor de una úlcera.³

Sintomatología:

La respuesta clínica es sumamente variable, según la localización e intensidad de la infección.

a) Amebiasis intestinal asintomática.

Las infecciones asintomáticas son las más frecuentes, especialmente en las zonas templadas. Estos portadores sanos pueden expulsar millones de quistes por día, y pueden tener molestias abdominales vagas, debilidad y neurastenia, también pueden alternar

estreñimiento y diarreas leves con dolor abdominal irregular de tipo cólico con hipersensibilidad local o sin ella, e invasión de la mucosa por el parásito.³

b) Amebiasis intestinal aguda.

La amebiasis intestinal aguda tiene un periodo de incubación que va de una a 14 semanas. Hay disentería intensa con evacuaciones pequeñas y numerosas en las cuales se encuentran sangre, moco y filamentos de mucosa necrosada; se encuentra dolor abdominal, hipersensibilidad y fiebre de 38 a 39°C. Es posible encontrar deshidratación, toxemia y postración intensa. En este tipo de amebiasis las heces contienen trofozoitos de *E. histolytica*.³

c) Amebiasis intestinal crónica.

La amebiasis crónica se caracteriza por ataques recurrentes de disentería; se presentan trastornos intestinales leves o moderados y estreñimiento. El abdomen es hipersensible y el hígado puede crecer.³

II.- Amebiasis extraintestinal.

A partir del foco primario intestinal, la diseminación ocurre principalmente por vía sanguínea, pero a veces por invasión directa.

a) Amebiasis hepática.

En una primera etapa, el absceso es una pequeña masa redonda u oval de células hepáticas pardogrisáceas. Al aumentar de tamaño, el centro se vuelve líquido, la pared se engruesa y el contenido se transforma en una masa viscosa de color chocolate, rojizo o crema, formada por células hepáticas autolisadas, glóbulos rojos, bilis, grasa y otros productos de desintegración tisular, mezclados con fibras de tejido conectivo. Los abscesos

hepáticos pueden ser únicos o múltiples y agudos o crónicos. Aproximadamente el 85% de los abscesos afectan casi exclusivamente al lóbulo derecho del órgano, sobre todo la porción posterior de la convexidad, desplazando el diafragma hacia arriba. El involucramiento del lóbulo izquierdo facilita la invasión pericárdica.³

Sintomatología:

La amebiasis hepática es una grave complicación de la amebiasis intestinal, y la más frecuente, proviene de la metástasis de la infección de la mucosa intestinal mediante la circulación portal. La hepatitis amibiana se caracteriza por un gran hígado hipersensible con dolor en el hipocondrio derecho que puede irradiar al hombro derecho, es frecuente la fiebre y puede haber escalofríos. Las pruebas de función hepática suelen ser normales o presentar muy ligeras alteraciones.³

b) Amebiasis pulmonar.

La amebiasis pulmonar, aunque poco frecuente, ocupa el segundo lugar después del absceso hepático, se debe ordinariamente a la invasión directa a partir de un absceso hepático, los abscesos pulmonares que a menudo presentan infección bacteriana secundaria, se presentan como condensación neumónica de la parte inferior del pulmón derecho.³ La sintomatología de la amebiasis pulmonar se caracteriza por escalofríos, fiebre y leucocitosis.³

c) Amebiasis cerebral.

El absceso cerebral es una complicación rara que generalmente supone amebiasis hepática y pulmonar.³ La sintomatología de las infecciones amibianas del cerebro dan los signos y síntomas usuales de absceso o tumor cerebral. Por desgracia estas infecciones solo se han podido diagnosticar en las autopsias.³

d) Amebiasis mucocutánea.

En la región perianal o en la desembocadura de fistulas intestinales o hepáticas, aparecen lesiones cutáneas secundarias bajo forma de úlceras duras indoloras con bordes socavados. Las úlceras crónicas del recto pueden producir hemorroides, fisuras, fistulas y abscesos anorrectales.³

IV.2.1 *Trypanosoma cruzi*

El agente etiológico de la enfermedad de Chagas o Trypanosomiosis Americana es el protozoo intracelular facultativo *Trypanosoma cruzi* que es un organismo pleomórfico que presenta tres fases morfológicas: tripomastigote, epimastigote y amastigote; la identificación de las diferentes fases está basada en la posición de una estructura subcelular denominada cinetoplasto, del núcleo y de la región de donde emerge el flagelo.

1.- Tripomastigote:

Es de aspecto fusiforme, mide aproximadamente 20 micrómetros de largo, dos micrómetros de ancho, presenta un citoplasma granuloso y un núcleo central vesiculoso. Posee un cinetoplasto subterminal posterior al núcleo del cual emerge una membrana ondulante que recorre al parásito y en cuyo borde libre lleva un flagelo que emerge por la extremidad anterior. El cinetoplasto consta de un blefaroplasto puntiforme y de un corpúsculo parabasal ovoide de mayor tamaño; la raíz del flagelo, el axonema, nace en el blefaroplasto y se extiende por el borde de una delgada membrana ondulante que tiene pocos pliegues, y sale por el extremo anterior del cuerpo como flagelo libre.

En huéspedes mamíferos los tripomastigotes son encontrados extracelularmente en la circulación sanguínea, en los huéspedes invertebrados siempre son extracelulares y son localizados en el intestino posterior; cuando los tripomastigotes están presentes en el intestino posterior del huésped invertebrado son denominados tripomastigotes metacíclicos y son las formas infectantes para los mamíferos.^{5,8 y 9} Ver figura 4.

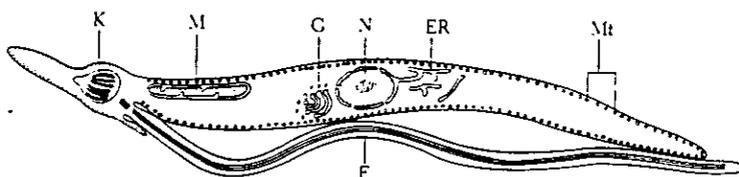


Fig. 4 Representación esquemática del tripomastigote. K, cinetoplasto; M, mitocondria; G, aparato de golgi; N, núcleo; ER, retículo endoplásmico rugoso; Mt, microtúbulo; F, flagelo. Extraído de la referencia 4.

2.- Epimastigote:

Es de aspecto fusiforme, mide de 20-40 micrómetros de largo y su cinetoplasto está localizado posterior pero muy cercano al núcleo, presenta una corta membrana ondulante y un flagelo libre; los epimastigotes son encontrados en el intestino medio del huésped invertebrado donde se multiplican.^{5,8 y 9}

3.- Amastigote:

El amastigote es de forma redondeada que mide aproximadamente dos micrómetros de diámetro, posee núcleo, cinetoplasto y un corto flagelo no emergente, es la forma intracelular replicativa de *T. cruzi* y se multiplica por fisión binaria.^{5,8,9 y 10} Ver figura 5

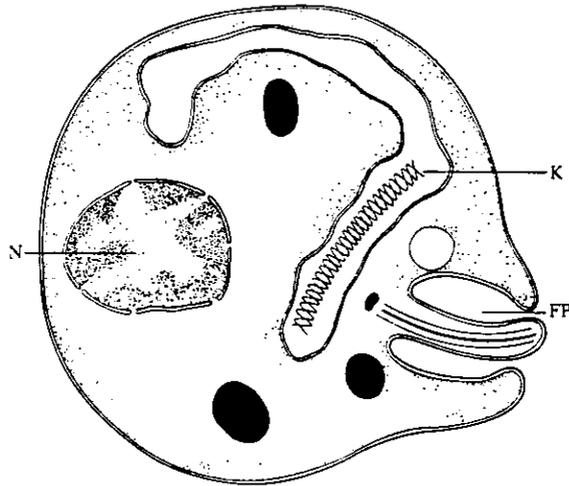


Fig. 5 Representación esquemática del amastigote. K, cinetoplasto; N, núcleo; FP, pocket flagelar. Extraído de la referencia 4.

La enfermedad de Chagas es un problema grave de salud pública en Latinoamérica. Las estimaciones actuales de la Organización Mundial de la Salud en Ginebra indican que 16 a 18 millones de personas están infectadas, con otras 90 millones de personas con riesgo de adquirir la enfermedad, ^{11, 12, 13, y 14} lo que presenta una prevalencia media del 4% en la población total de Latinoamérica.¹²

IV.2.2 Ciclo biológico.

El *T. cruzi* es un parásito en cuyo ciclo de vida intervienen los mamíferos y un insecto que actúa como transmisor. Los insectos vectores son reduvídeos denominados triatóminos, y están representados por diversos géneros. Se inicia cuando un triatómino infectado con *T. cruzi* pica a un huésped mamífero y emite deyecciones con tripomastigotes que penetran al cuerpo por el sitio de la picadura, por abrasión de la piel o por las mucosas.

Fig. 6

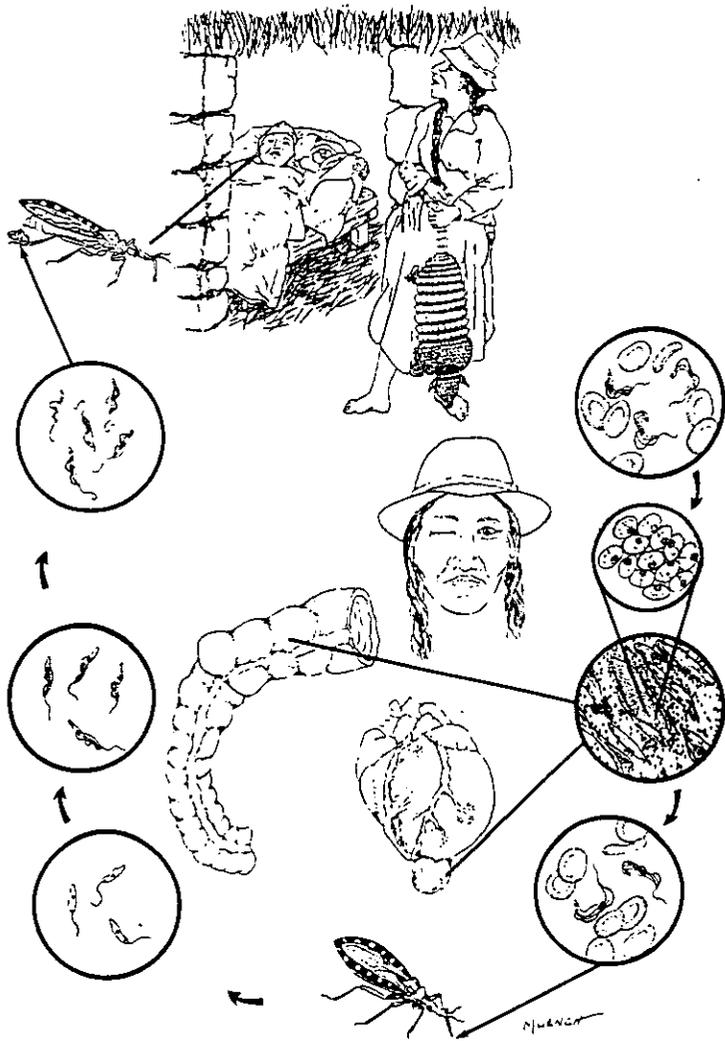


Fig. 6 Ciclo biológico de *T. cruzi*. 1.- trypomastigotes en circulación, 2.- amastigotes en tejido ocasionado megacolon, megaesófago y megacardias, 3.- trypomastigotes en circulación, 4.- Triatómino alimentándose de una persona infectada, 5.- epimastigotes en el intestino medio del triatómino, 6.- Trypomastigotes metacíclicos , 7.- Transmisión de los trypomastigotes por parte del triatómino a una persona no infectada, cerrándose el ciclo biológico. Extraído de la referencia 6.

Los tripomastigotes infectan a las células del tejido subcutáneo vecinas al sitio de penetración y adquieren la forma de amastigotes; éstos se multiplican por fisión binaria y cuando la célula está repleta de amastigotes, éstos se convierten en tripomastigotes dentro de la célula huésped, la cual termina por lisarse y liberarlos para que nuevamente infecten a nuevas células vecinas o salgan a la circulación sanguínea propagando la infección por todo el cuerpo. El ciclo biológico en los mamíferos termina cuando un insecto reduvídeo al alimentarse de un huésped infectado ingiere tripomastigotes sanguíneos. En este momento inicia el ciclo biológico en el huésped invertebrado, en donde los tripomastigotes se transforman en epimastigotes que migran al intestino medio donde se multiplican y luego al intestino posterior invadiendo las glándulas rectales en donde se diferencian a tripomastigotes metacíclicos que son las formas infectantes para los mamíferos.^{6,8, 9,15,16 y 17}

Fig. 6

La transmisión por vectores representa más del 80% de la transmisión total de *T. cruzi*; el hombre puede infectarse con *Trypanosoma cruzi*, mediante diversos mecanismos:

1.- Por las deyecciones de triatóminos.

Los tripomastigotes metacíclicos contenidos en las heces de los triatóminos son las formas infectantes del parásito que pueden atravesar la piel por el hoyo de la picadura, por la abrasión de la piel ocasionada por el rascado y por acarreo a los ojos y boca, en donde el parásito penetra a través de las mucosas.⁶

2.- Por la placenta.

Ocurre en el 2-4% de recién nacidos hijos de madres infectadas, la infección sucede en la segunda mitad de gestación en donde los tripomastigotes sanguíneos salvan la barrera placentaria e infectan al producto.

3.- Por transfusiones sanguíneas.

Este es un mecanismo de transmisión importante en aquellos países en donde no se lleva un control adecuado de los donadores de sangre, lo que constituye un peligro real, puesto que *Trypanosoma cruzi* mantiene su vitalidad a la temperatura del refrigerador, hasta por dos meses.

4.- Por trasplantes de órganos infectados.

5.- Por manipulación inadecuada de sangre y animales contaminados.^{1, 8 y 18}

IV.2.3 Patogenicidad y Sintomatología de la enfermedad de Chagas.

Tras su entrada en el hospedador vertebrado, *Trypanosoma cruzi* produce una reacción inflamatoria local aguda. Las células parasitadas preferencialmente son las del sistema retículo endotelial, las del músculo cardíaco, esquelético y liso y las de la glía. El chagoma es una lesión local asociada al sitio de picadura del transmisor; consiste en una intensa reacción inflamatoria, con invasión de histiocitos, células adiposas del tejido subcutáneo y células musculares adyacentes con afluencia a las zonas que contienen neutrófilos y linfocitos.

Cuando la infección se extiende más allá de los ganglios linfáticos cercanos, los tripanosomas aparecen en el torrente sanguíneo, infectando otros órganos y tejidos. Las células de Küpffer del hígado, los macrófagos del bazo y las células del músculo cardíaco, son especialmente proclives a la infección. Dentro del músculo cardíaco, los amastigotes proliferan formando pseudoquistes; se produce una pérdida de materia muscular, aparece un exudado inflamatorio difuso y prolifera el tejido conectivo intersticial.

Al principio de la fase crónica de la infección, el corazón presenta un tamaño normal o ligeramente superior, aunque más tarde se puede desarrollar una cardiomegalia masiva. Se produce una inflamación difusa del miocardio, así como fibrosis e infiltración de linfocitos, macrófagos y células plasmáticas. Aumenta el peso del corazón y se dilatan todas las cámaras, especialmente del ventrículo derecho. Se producen daños en el sistema autónomo del corazón, a la vez que en el plexo de Auerbach de las paredes del tubo digestivo; dándose una hipertrofia de las capas musculares y una disminución de las células ganglionares de las zonas afectadas del tubo digestivo, normalmente el esófago y el colon.

2, 8, 19, 20 y 21.

La enfermedad de Chagas puede ser adquirida o congénita:

1.- Enfermedad de Chagas adquirida.

Después de un periodo de incubación, estimado entre cuatro y 14 días, se desarrolla la enfermedad, en la cual se distinguen la forma aguda, la forma de latencia o indeterminada y la forma crónica.

a) Forma aguda:

La mayoría de los pacientes adquieren la infección sin manifestaciones clínicas evidentes y sólo alrededor del 5% de los infectados presentan la forma aguda. La sintomatología de la forma aguda se caracteriza por los signos de la primoinfección como son el chagoma de inoculación y el signo de Romaña Mazza.

- **Chagoma de inoculación:**

En el lugar de la infección los organismos proliferan produciendo un área endurecida eritematosa conocida como chagoma de inoculación, habitualmente se produce en la cara pero puede afectar otros sitios, esta lesión alcanza su máximo tamaño en unos cuantos días y desaparece lentamente en un periodo de dos a tres meses.

- Signo de Romaña Mazza:

Cuando la picadura del insecto ocurre en la región periorbitaria o conjuntival, se produce el complejo oftalmoglanglionar o signo de Romaña Mazza, caracterizado por un edema periocular unilateral, bipalpebral, elástico, duro, de color violáceo e indoloro que puede dificultar la apertura palpebral; se presenta además hiperemia de la conjuntiva, escasa secreción conjuntival, dacriocistitis y adenopatía satélite; el complejo desaparece en unas cuatro semanas.

En la forma aguda que de ordinario se observa en niños, puede existir compromiso visceral que se caracteriza por fiebre elevada, linfadenitis generalizada, hepatoesplenomegalia y anasarca, la forma aguda de la enfermedad dura de 20 a 30 días.

b) Forma latente o indeterminada:

Transcurrida la forma aguda, la sintomatología se apaga y se entra a un estado de latencia caracterizado por una multiplicación intracelular lenta de los parásitos sin signos clínicos, esta forma puede durar toda la vida o entrar en la forma crónica de la enfermedad.

c) Forma crónica:

La forma crónica aparece después de diez o más años de la primoinfección y se caracteriza por el daño irreversible de algunos órganos huecos especialmente el corazón presentándose la cardiopatía chagásica crónica y el tubo digestivo, principalmente el colon y el esófago generándose el megaesófago y el megacolon.

- **Cardiopatía chagásica crónica:**

Se estima que alrededor del 30% de los infectados chagásicos sufren el compromiso cardiaco en la etapa crónica de la enfermedad, el electrocardiograma indica un bloqueo completo en la rama derecha del haz de Hiss y un hemibloqueo anterior izquierdo, el paciente puede continuar con la alteración durante toda la vida, o bien se hace sintomático, en este caso el paciente presenta disnea de esfuerzo, palpitaciones, dolor precordial y puede caer en la insuficiencia cardiaca; la cardiomegalia se hace evidente cuando aumenta la fibrosis y en estos casos actúan los mecanismos para mantener la dinámica circulatoria produciendo la dilatación del corazón.

Los pacientes con daños severos del miocardio desarrollan enormes aumentos del tamaño del músculo cardiaco, insuficiencia cardiaca y fenómenos de tromboembolismo. La muerte súbita por fibrilación ventricular puede ocurrir en cualquier momento de la evolución de la enfermedad.

- **Formas digestivas:**

Algunos enfermos chagásicos desarrollan trastornos del tubo digestivo que terminan en la formación de megaesófago y megacolon, los trastornos de la motilidad del esófago provocan una disfagia, dolor epigástrico o retroesternal y regurgitaciones; existen fases evolutivas del megaesófago, en la primera el esófago es de calibre normal pero con retardo del tránsito esofágico, en la segunda fase aparece la dilatación del órgano con la producción del megaesófago que puede alcanzar de dos a tres veces el calibre normal, y por último se agrega la elongación del órgano.

En el megacolon existe retención de las materias fecales durante 10, 15 ó más días con un desarrollo enorme del abdomen y comúnmente existe torsión intestinal.

2.- Enfermedad de Chagas congénita:

El paso de *T.cruzi* al feto durante la gestación determina un cuadro clínico caracterizado por prematuridad, hepatomegalia y esplenomegalia, compromiso variable del SNC y del miocardio. La enfermedad de Chagas congénita debe considerarse grave, porque produce una elevada mortalidad especialmente en aquellos niños que presentan sintomatología al nacer.^{1, 2, 4 y 11.}

IV.3.1 *Toxoplasma gondii*.

El agente etiológico de la toxoplasmosis es el protozoario intracelular obligado. *Toxoplasma gondii*. Es un parásito cosmopolita que infecta una amplia variedad de aves y mamíferos incluyendo al hombre.^{1 y 4} Presenta tres formas infectantes: Taquizoito, Quiste y Ooquiste.

1.- Taquizoito:

Es la forma del parásito que se divide activamente, mide aproximadamente 6 micrómetros de largo y dos micrómetros de ancho, presenta muchas estructuras características de células eucariotas, como núcleo, mitocondria, aparato de golgi, retículo endoplásmico y el RNA ribosomal que consiste de moléculas grandes y cortas y esta asociado a las subunidades ribosomales respectivas. Están cubiertos con tres membranas; la membrana externa es continua; las dos membranas internas son discontinuas y terminan en una estructura denominada anillo polar, el cual está localizado en la parte anterior y posterior del parásito. La membrana interna presenta una estructura denominada microporo el cual está involucrado en la obtención de nutrientes. El citoesqueleto de la pared celular esta compuesto de 22 microtúbulos que están unidos al anillo polar anterior del parásito.

La parte anterior del Taquizoito se identifica por la presencia del conoide, estructura en forma de cono formado por fibras de la clase de los microtúbulos enrolladas en espiral; otras dos estructuras son los rhoptries, los cuales terminan en el conoide por su parte estrecha y cuya función es secretora y los micronemas que son pequeñas vesículas que juegan un papel muy importante en la penetración hacia células huésped. Carece de órganos de locomoción y su desplazamiento lo hace por flexión del cuerpo, deslizamiento, rotación y movimiento en espiral.(fig.7)

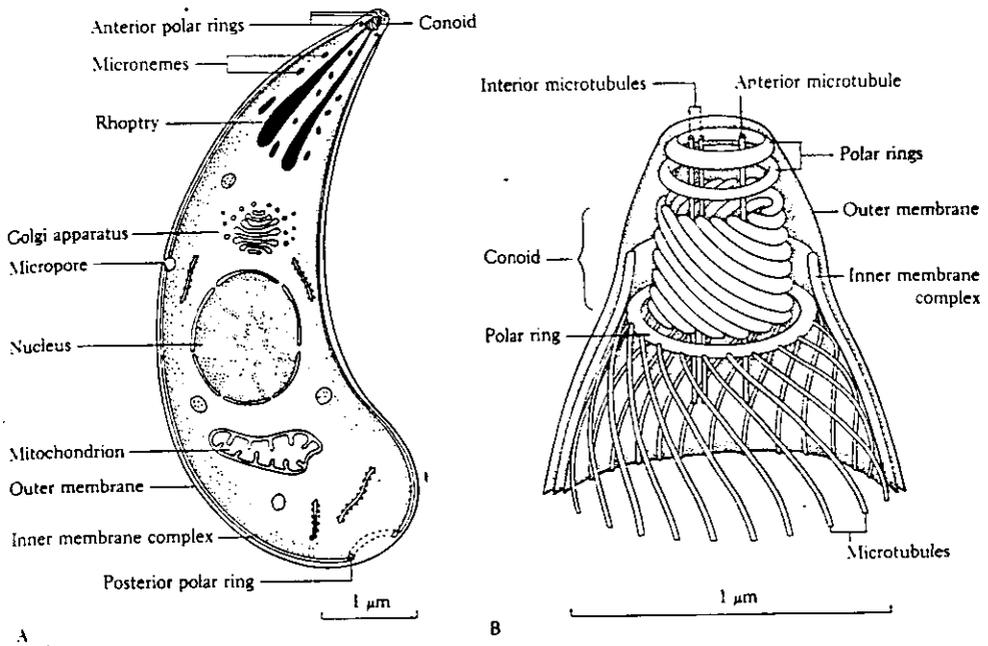


Fig. 7 Representación esquemática del taquizoito y de la parte anterior del taquizoito. Extraído de la referencia 4.

2.- Quiste.

El quiste es de localización tisular en el huésped intermediario y está constituido por formas del parásito que se multiplican lentamente a los que se les llama bradizoitos; su tamaño varía de 50 a 200 micras, son esféricos cuando se localizan en el cerebro u otros órganos y adoptan la forma alargada en tejido muscular y en corazón.

3.- Ooquiste.

El ooquiste es la forma que eliminan los felinos en sus heces, diseminándose ampliamente en la naturaleza llegando a contaminar los alimentos; resulta de la reproducción sexual que tiene lugar en el epitelio intestinal del felino, son esféricos u ovalados y miden aproximadamente 12 micrómetros de largo por 11 micrómetros de ancho.^{2,4 y 7}

La incidencia anual de la toxoplasmosis en algunos climas tropicales es alrededor del 10% de la población, estudios serológicos en América Central indicaron que arriba del 30% de los niños menores de 5 años de edad estaban infectados y el 70% de la población en personas menores de 25 años. Altas prevalencias de la infección se observan en Hawai y otras islas pacíficas, Japón, Africa tropical y Brasil. En Estados Unidos sólo del 0.5 al 1% de la población se infecta cada año; en países como México la tercera parte de la población esta infectada.^{1 y 6}

La prevalencia de la enfermedad varía de un lugar a otro, existe una incidencia muy alta en las mujeres parisinas que prefieren la carne cruda o semicruda y al menos un 50% de sus hijos están igualmente infectados.²

Algunos factores que están en relación con la prevalencia de la toxoplasmosis a parte de la población de gatos son: el clima, la altitud sobre el nivel del mar, hábitos alimenticios y susceptibilidad al desarrollo de la infección. La toxoplasmosis puede

presentarse en cualquier estación del año sin importar raza, sexo, ocupación, o condiciones socioeconómicas.⁵ El riesgo de infección intrauterina dependerá del trimestre del embarazo en el cual la madre adquiera la toxoplasmosis. Si ésta ocurre durante el primer trimestre, la proporción es del 17% siendo los síntomas más graves, la proporción aumenta al 25 % en el segundo trimestre y al 65% en el tercero.¹ Si los gatos infectados no habitan casas particulares éstos al defecar a la intemperie pueden infectar a diversos mamíferos como vacas, cerdos, etc. que pueden infectar al hombre, si éste ingiere carne cruda o semicruda.¹

IV.3.2 Ciclo biológico.

En el ciclo de vida de *Toxoplasma gondii* los huéspedes definitivos son los gatos y los huéspedes intermediarios son otras especies de animales, aves y mamíferos. El ciclo biológico involucra una fase sexual y una fase asexual, la fase sexual se desarrolla en las células epiteliales del intestino delgado de los gatos y la fase asexual se desarrolla en varias células del cuerpo, pero principalmente en las células del cerebro y del músculo estriado de los huéspedes intermediarios.

Los gatos infectados excretan ooquistes junto con la materia fecal, éstos bajo condiciones favorables de humedad, aireación y temperatura desarrollan dos esporoblastos que generan esporoquistes, y cada uno de éstos desarrollan cuatro esporozoítos. Los ooquistes permanecen infectivos hasta 12 meses en condiciones favorables.

Cuando el ooquiste esporulado es ingerido por un mamífero o ave, los esporozoítos son liberados e infectan a las células epiteliales del intestino. Ellos empiezan a multiplicarse como taquizoítos que producen primero una infección aguda y después una infección crónica con taquizoítos enquistados denominados bradizoítos.

Cuando un felino ingiere un tejido con bradizoítos; la acción de los jugos digestivos del intestino delgado del felino rompe la pared del quiste liberando los esporozoítos, éstos penetran las células epiteliales del intestino delgado y por esquizogonia producen merozoítos que pueden parasitar a otras células o diferenciarse en micro y macrogametocitos masculinos y femeninos que se fusionan entre sí generando un cigoto que es liberado en las heces como ooquiste, el ciclo vuelve a iniciarse cuando el ooquiste es ingerido. ^{1 y 4}Ver fig. 8

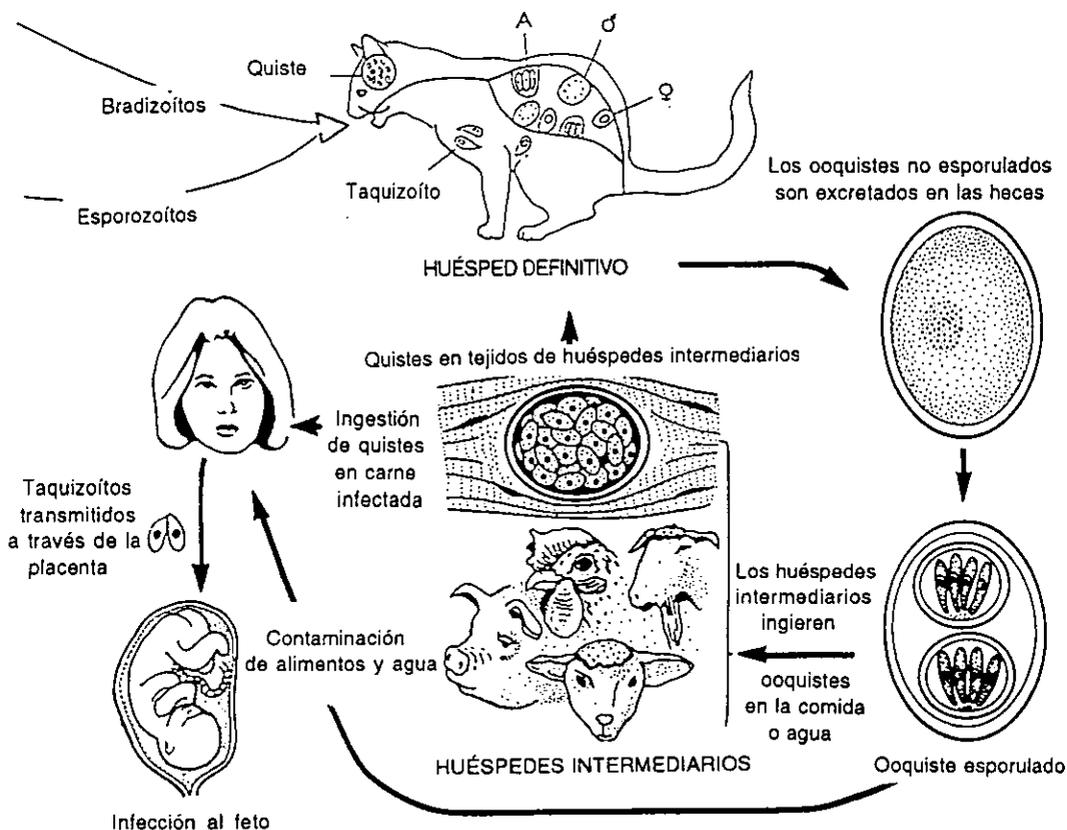


Fig. 8 Representación esquemática del ciclo biológico de *Toxoplasma gondii*.

IV.3.3 Patogenicidad y sintomatología de la toxoplasmosis.

Para el estudio de patogenicidad y sintomatología dividimos a la toxoplasmosis en:

- a) Toxoplasmosis aguda.
- b) Toxoplasmosis crónica.
- c) Toxoplasmosis recurrente.
- d) Toxoplasmosis congénita.
- e) Toxoplasmosis ocular.

a) Toxoplasmosis aguda:

La liberación de los esporozoítos del ooquiste, o bradizoítos de los quistes tisulares ingeridos en carne infectada, se convierten en taquizoítos que penetran la mucosa intestinal y se expanden por vía linfática a los nódulos linfáticos y después hematógicamente al hígado, a los pulmones y a todo el cuerpo. Esta corta etapa de la infección muchas veces es asintomática e irreconocible. Los taquizoítos se multiplican en todas las células nucleadas del tejido, y quizá produzca zonas necrosadas. Como el desarrollo de anticuerpos generalmente requiere de una a dos semanas, y la inmunidad de dos a cuatro semanas, la destrucción celular es significativa.⁶

Sintomatología:

Después de la ingestión de quistes u ooquistes de *Toxoplasma gondii*. el periodo de incubación es de una a dos semanas. Un gran porcentaje de la población infectada presenta infección asintomática, y ésta al igual que la infección sintomática persiste durante mucho tiempo como infección crónica.⁶

Los síntomas más comunes de la toxoplasmosis aguda son dolor generalizado y linfadenopatías, éstas acompañadas de fiebre, dolor de cabeza, anemia, dolor muscular,

mialgia, anorexia, artralgia, algunos pacientes presentan una lesión maculopapular o urticaria, hepatoesplenomegalia y algunas veces complicaciones pulmonares y confusión.^{6,7}

b) Toxoplasmosis crónica:

En la mayoría de las infecciones crónicas, asintomáticas o no, los bradizoítos permanecen enquistados en los tejidos, principalmente en el cerebro, en la retina, en el músculo cardíaco y en el músculo esquelético, ésto probablemente continúe por el resto de la vida del paciente sin presentar un proceso patológico.

Cuando los quistes son desintegrados, o rotos por algún trauma o por otra causa, los bradizoítos son liberados, éstos pueden ocasionar una necrosis tisular que es de gran importancia ya que puede afectar a la retina y tener un daño progresivo, o puede ocasionar una encefalitis. Ésta puede ser limitada por anticuerpos o por inmunidad mediada por células.⁶

Sintomatología:

Cuando la inmunidad es suficiente para suprimir la proliferación de taquizoítos la infección es conocida como toxoplasmosis crónica.

Aunque la mayoría de este tipo de toxoplasmosis se presenta asintomática, y puede persistir indefinidamente sin causar daño, ésta puede reactivarse como resultado de una inmunosupresión produciendo algún tipo de toxoplasmosis sintomática. La toxoplasmosis crónica puede ocasionar miocarditis, daño permanente al corazón y neumonía.^{6 y 7}

c) Toxoplasmosis recurrente:

La toxoplasmosis recurrente se presenta en personas con toxoplasmosis crónica asintomática que han adquirido enfermedades de inmunodeficiencia tales como el SIDA, o que han recibido algún tratamiento inmunosupresor, se inicia cuando hay ruptura de los quistes de *T.gondii* seguida de una proliferación de los taquizoítos, las zonas más afectadas son el cerebro, la retina y los pulmones. Los síntomas pueden ser: coriorretinitis, neumonía, miocarditis y miositis.⁶

d) Toxoplasmosis congénita:

La toxoplasmosis congénita se presenta cuando una mujer embarazada contrae la toxoplasmosis aguda esto es debido a que el parásito salva la barrera placentaria invadiendo al feto. Afortunadamente la mayoría de las infecciones neonatales son asintomáticas, sin embargo un número significativo muere o tiene malformaciones tales como hidrocefalia, microcefalia, calcificación cerebral, coriorretinitis o retraso psicomotor. Los niños que llegan a sobrevivir, pueden presentar retardo mental, o ataques epilépticos recurrentes.⁷

Sintomatología:

Las manifestaciones de la toxoplasmosis congénita en el recién nacido dependerán del trimestre del embarazo en el cual la madre adquiera la toxoplasmosis, si ésta la adquiere en el primer trimestre los daños serán mayores que si los adquiere en el tercer trimestre; el riesgo de adquirir la toxoplasmosis es menor en el primer trimestre que en el último. El recién nacido infectado puede presentar una lesión maculopapular, hepatoesplenomegalia, trombocitopenia, anemia, diarrea, linfadenopatía, neumonía e hipotermia. Algunos pacientes presentan daños en el sistema nervioso central, manifestados con convulsiones, calcificación intracraneal, encefalitis, microcefalia e hidrocefalia.

La hepatoesplenomegalia y linfadenopatía, aparecen durante los primeros dos meses, el daño al sistema nervioso central aparece algunos meses más tarde y el retraso psicomotor, sordera y coriorretinitis puede no aparecer durante años.^{1 y 6}

e) Toxoplasmosis ocular:

En la toxoplasmosis ocular la mayoría de las lesiones son limitadas y ocurren debido a un rompimiento de los quistes acompañado de una deficiencia en la respuesta inmune.⁶

Sintomatología:

El desarrollo de la coriorretinitis se manifiesta gradualmente desde las semanas hasta algunos años después de adquirir la toxoplasmosis congénita, raramente después de adquirir la infección en la niñez.

Las lesiones oculares en la toxoplasmosis congénita son bilaterales, mientras que en la toxoplasmosis adquirida son unilaterales, las lesiones pueden presentar visión borrosa, fotofobia, neuritis óptica, microftalmia, extravismo, y puede llegar a desarrollar ceguera.⁶

IV.4 Virulencia.

La **infección** es definida como la entrada, establecimiento y multiplicación de los microorganismos en la superficie o en el interior de un huésped; durante el inicio, desarrollo y resultado de una infección están implicadas una serie de interacciones complejas y variables entre el parásito y el huésped que pueden variar con los diferentes parásitos.²²

Las barreras físicas primarias del huésped contra la invasión, la capacidad de un parásito para eludir su destrucción por parte de las defensas del huésped, la manera como un parásito se disemina por el organismo ocasionando la enfermedad, y la capacidad inmunológica de adaptación del organismo para controlar y eliminar los parásitos invasores, son algunos de los factores que determinan la posibilidad de la infección parasitaria.²³

La infección en ocasiones no se expresa clínicamente (infección inaparente) o puede presentar alteraciones más o menos graves en el huésped que se manifiestan por diversos signos y síntomas clínicos que en conjunto se denominan enfermedad infecciosa.

A los organismos capaces de producir enfermedad en general se les denomina **patógenos**;²⁴ **patogenicidad** o poder patógeno es la capacidad que poseen algunos parásitos para producir una enfermedad. La patogenicidad no depende exclusivamente del parásito, sino también de las características del huésped, ya que algunos parásitos muy patógenos para un huésped determinado pueden ser menos para otros, según el grado de resistencia que el huésped presente.²²

La **virulencia** es una medida cuantitativa del grado de patogenicidad de un parásito en particular o de una cepa específica, es cuantificada por el número de parásitos necesarios para matar o alterar a una especie en particular, y varía no solo entre las especies sino también entre las cepas de una misma especie²⁵, la virulencia depende de la capacidad del parásito para colonizar, penetrar, multiplicarse, invadir, y producir alteraciones patológicas en el huésped. De esta manera, pueden aparecer cepas con diferente grado de patogenicidad.²⁶

V.- Justificación.

La virulencia es una medida cuantitativa del grado de patogenicidad y representa un balance entre diversos factores, algunos de los cuales se relacionan con la resistencia del huésped, y otros se relacionan con el parásito; cada especie parasitaria está formada por innumerables poblaciones que difieren en el grado de patogenicidad, y ésto es debido a las diferencias genéticas, moleculares y biológicas de cada población.

La virulencia de una cepa no es un carácter estable, sino que puede variar como consecuencia de la aparición de mutaciones en el curso de su desarrollo y la presencia de factores que condicionan a la selección de éstas mutantes, o factores que conducen a la atenuación. Múltiples genes intervienen en la virulencia de los parásitos, las alteraciones en la presencia o el grado de expresión de estos genes, pueden reducir de forma significativa la virulencia sin alterar necesariamente los antígenos de superficie que son los blancos del sistema inmunitario.

En la actualidad, es posible la manipulación experimental de la virulencia con el fin de obtener microorganismos atenuados que conservan la especificidad antigénica y la capacidad de multiplicación *in vivo*, pero pierden su potencialidad para provocar una enfermedad grave; muchas de las mejores vacunas vivas se han preparado de esta manera. Sin embargo, la obtención de vacunas, la preparación de medicamentos, la realización de pruebas de laboratorio y las estrategias de control sobre diversas enfermedades parasitarias aún no dan buenos resultados ya que los grupos de investigación, en ocasiones emplean una cepa inadecuada de acuerdo a los fines que persiguen. Esto se debe a que empíricamente escogen una cepa que más o menos reúne las características que quieren en cuanto a su virulencia, pero pueden estar muy lejos para que se obtengan resultados claros. Por ejemplo, si se requiere una población de un parásito, que infecte estableciéndose en un tejido, pero que no mate al huésped experimental, puede suceder que lo mata en un porcentaje tan bajo que el resultado es imperceptible. Sin embargo, en un lote grande de animales se detecta con mayor claridad su poder patogénico.

Por lo anterior sería necesario tener a la mano, no solo tablas de clasificación de las distintas cepas que se encuentran en la naturaleza, sino incluso, clasificar en función de la virulencia las cepas de los parásitos de manera ordenada. Un primer problema es que aún no se conoce una metodología que permita clasificar los parásitos en función de su virulencia. Sería de suma importancia saber como clasificar las distintas poblaciones de parásitos por su grado de patogenicidad.

VI.- Análisis de la virulencia de *Entamoeba histolytica*, *Trypanosoma cruzi* y *Toxoplasma gondii*, y resultados.

Ya descritas las características biológicas de los tres protozoos de importancia médica, se analizarán los parámetros que permitirán evaluar su virulencia.

VI.1 *Trypanosoma cruzi*: El modelo ejemplar para clasificar parásitos en función de la virulencia.

Como se mencionó antes, *T. cruzi* es un parásito cuya virulencia se observa *in vivo* e *in vitro*; *in vivo* se determina por los efectos patológicos en sus huéspedes como son la **mortalidad**, la **parasitemia** y el **histotropismo**. *In vitro* se determina por: el índice de infección, el índice de infección intracelular y el porcentaje de células lisadas.

$$\text{Índice de infección} = \frac{\text{Número de células infectadas}}{\text{Número de células observadas}}$$

$$\text{Índice de infección intracelular} = \frac{\text{Número promedio de parásitos}}{\text{célula}}$$

Por lo anterior sería necesario tener a la mano, no solo tablas de clasificación de las distintas cepas que se encuentran en la naturaleza, sino incluso, clasificar en función de la virulencia las cepas de los parásitos de manera ordenada. Un primer problema es que aún no se conoce una metodología que permita clasificar los parásitos en función de su virulencia. Sería de suma importancia saber como clasificar las distintas poblaciones de parásitos por su grado de patogenicidad.

VI.- Análisis de la virulencia de *Entamoeba histolytica*, *Trypanosoma cruzi* y *Toxoplasma gondii*, y resultados.

Ya descritas las características biológicas de los tres protozoos de importancia médica, se analizarán los parámetros que permitirán evaluar su virulencia.

VI.1 *Trypanosoma cruzi*: El modelo ejemplar para clasificar parásitos en función de la virulencia.

Como se mencionó antes, *T.cruzi* es un parásito cuya virulencia se observa *in vivo* e *in vitro*; *in vivo* se determina por los efectos patológicos en sus huéspedes como son la **mortalidad**, la **parasitemia** y el **histotropismo**. *In vitro* se determina por: el índice de infección, el índice de infección intracelular y el porcentaje de células lisadas.

$$\text{Índice de infección} = \frac{\text{Número de células infectadas}}{\text{Número de células observadas}}$$

$$\text{Índice de infección intracelular} = \frac{\text{Número promedio de parásitos}}{\text{célula}}$$

1. Mortalidad:

La virulencia de un microorganismo no es atribuible a una sola característica, representa un balance entre diversos factores relacionados con el microorganismo y con la resistencia del huésped. Para clasificar a los parásitos en función de la virulencia es necesario estudiar la capacidad de infección con efectos patogénicos observables en animales de experimentación que sean susceptibles.

La mortalidad ocasionada por un parásito se registra con el porcentaje de muertes producidas por unidad de tiempo en ratones de experimentación y en ocasiones como dosis media letal o dosis letal total. La población más virulenta es aquella que mata en el menor tiempo al mayor porcentaje de animales inoculados. En la tabla 1 se registran datos de mortalidad producida en ratones inoculados por diferentes poblaciones de *T. cruzi*. Nótese cómo existen poblaciones que matan al 100% de los ratones experimentales como son Y, m3, m4, m1, entre otras, mientras que existen otras poblaciones que sólo matan a un 30% ó 20% como lo son Sylvio X10 y Sylvio X10/4 respectivamente, también existen aquellas que no matan a ningún ratón pero esto no quiere decir que dichas poblaciones no sean virulentas, más bien el grado de virulencia no es tan alto que llegue a producir la muerte de los ratones, quizá la virulencia de este tipo de poblaciones se ve reflejada en el grado de histotropismo o en la parasitemia que ocasionan.

Entre las poblaciones que llegan a matar al 100% de los ratones en experimentación, existen unas que son más virulentas que otras, dichas poblaciones son aquellas que matan al 100% de los ratones en un menor tiempo y éstas en general son las más virulentas, un ejemplo de esto lo podemos observar en la tabla 1, la cual nos muestra como la cepa Y mata al 100% de los ratones en tan solo 13 días mientras que la cepa CL lo hace a los 33 días.

Población	Dosis inoculada	Huésped	Día de inicio de la parasitemia	Magnitud	Permanencia	Mortalidad	Día promedio de muerte	Referencia
Y	1X10 ⁵ tripomastigotes	Ratones Balb/C (18-20g)	3	37.5X10 ³ / 5mcl / día	12 días	100% (5/5)	día 13	M.T.Lima (1990) ²⁷
m3	1X10 ⁵ tripomastigotes	Ratones Balb/C (18-20g)	3	617.5X10 ³ / 5mcl / día	11 días	100% (10/10)	día 14	Lauria (1996) ³⁸
m4	1X10 ⁵ tripomastigotes	Ratones Balb/C (18-20g)	3	868.25X10 ³ / 5mcl / día	11 días	100% (10/10)	día 14	Lauria (1996) ³⁸
m1	1X10 ⁵ tripomastigotes	Ratones Balb/C (18-20g)	3	1155.5X10 ³ / 5mcl / día	12 días	100% (10/10)	día 15	Lauria (1996) ³⁸
m2	1X10 ⁵ tripomastigotes	Ratones Balb/C (18-20g)	3	884.0X10 ³ / 5mcl / día	13 días	100% (10/10)	día 16	Lauria (1996) ³⁸
Sylvio X10/7	1X10 ⁶ tripomastigotes	Ratones C ₃ H/HEN	NI	NI	NI	100% (26/26)	día 21	Postan M (1983) ²⁹
Tulahuén	1X10 ⁵ tripomastigotes	Ratones Swiss	7	7.61X10 ³ / 5mcl / día	20 días	100% (5/5)	día 27	González (1995) ³⁰
CL	1X10 ⁶ tripomastigotes	Ratones Balb/C (18-20g)	3	149.5X10 ³ / 5mcl / día	25 días	100% (8/8)	día 33	M.T.Lima (1990) ²⁷
Sylvio X10	1X10 ⁶ tripomastigotes	Ratones C ₃ H/HEN	NI	NI	NI	30% (6/20)	día 31	Postan M (1983) ²⁹
Sylvio X10/4	1X10 ⁶ tripomastigotes	Ratones C ₃ H/HEN	NI	NI	NI	20% (4/20)	día 45	Postan M (1983) ²⁹
Chinga	2.3X10 ⁷ tripomastigotes	Ratones C ^H (15.5 g)	4	3268.5X10 ³ / 5mcl / día	66 días	0% (0/20)	-	Bice D. (1970) ³¹
CR2	2.3X10 ⁷ tripomastigotes	Ratones C ^H (15.5 g)	4	1076.2X10 ³ / 5mcl / día	66 días	0% (0/20)	-	Bice D. (1970) ³¹
h ₃	1X10 ⁵ tripomastigotes	Ratones Balb/C (18-20 g)	5	168.7X10 ³ / 5mcl / día	40 días	0% (0/10)	-	Lauria (1996) ³⁸
ABC	1X10 ⁵ tripomastigotes	Ratones Albino	5	72.5X10 ³ / 5mcl / día	9 días (*)	ND	-	Brener (1978) ³²
hSLU239	1X10 ⁷ tripomastigotes	Ratones Balb/C (18-20 g)	2	65.25X10 ³ / 5mcl / día	53 días	0% (0/10)	-	Lauria (1996) ³⁸
h ₁	1X10 ⁵ tripomastigotes	Ratones Balb/C (18-20 g)	6	60.0X10 ³ / 5mcl / día	39 días	0% (0/10)	-	Lauria (1996) ³⁸

TABLA 1 (primera parte)

NI Dato no indicado

ND Dato no determinado

(*) Parasitemia interrumpida

Población	Dosis inoculada	Huésped	Día de inicio de la parasitemia	Magnitud	Permanencia	Mortalidad	Día promedio de muerte	Referencia
MSLU142	1X10 ⁵ tripomastigotes	Ratones Balb/C (18-20 g)	3	39.0X10 ³ / 5 mcL/ día	57 días	0% (0/10)	-	Lauria (1996) ³⁸
Berenice	1X10 ⁵ tripomastigotes	Ratones Albino	4	34.0X10 ³ / 5 mcL/ día	7 días (*)	ND	-	Brener (1978) ³²
Quitor 5	1X10 ⁵ tripomastigotes	Ratones Swiss	7	13.15X10 ³ / 5 mcL/ día	44 días (*)	0% (0/5)	-	González (1995) ³⁰
Quitor 3	1X10 ⁵ tripomastigotes	Ratones Swiss	11	11.29X10 ³ / 5 mcL/ día	41 días (*)	0% (0/5)	-	González (1995) ³⁰
Quitor 1	1X10 ⁵ tripomastigotes	Ratones Swiss	13	8.52X10 ³ / 5 mcL/ día	36 días (*)	0% (0/5)	-	González (1995) ³⁰
Toñoño	1X10 ⁵ tripomastigotes	Ratones Swiss	17	8.45X10 ³ / 5 mcL/ día	34 días (*)	0% (0/5)	-	González (1995) ³⁰
Checar 2	1X10 ⁵ tripomastigotes	Ratones Swiss	21	7.9X10 ³ / 5 mcL/ día	30 días (*)	0% (0/5)	-	González (1995) ³⁰
Coyo 3	1X10 ⁵ tripomastigotes	Ratones Swiss	17	3.43X10 ³ / 5 mcL/ día	34 días	0% (0/5)	-	González (1995) ³⁰
Punta de diamante	1X10 ⁵ tripomastigotes	Ratones Swiss	13	3.05X10 ³ / 5 mcL/ día	38 días (*)	0% (0/5)	-	González (1995) ³⁰
Checar 1	1X10 ⁵ tripomastigotes	Ratones Swiss	13	2.28X10 ³ / 5 mcL/ día	33 días	0% (0/5)	-	González (1995) ³⁰
Peñe	1X10 ⁷ tripomastigotes	Ratones Swiss	23	1.85X10 ³ / 5 mcL/ día	24 días	0% (0/5)	-	González (1995) ³⁰
Quitor 4	1X10 ⁵ tripomastigotes	Ratones Swiss	13	0.975X10 ³ / 5 mcL/ día	30 días (*)	0% (0/5)	-	González (1995) ³⁰
Domingo Ailanza I	1X10 ⁵ tripomastigotes	Ratones Swiss	25	0.535X10 ³ / 5 mcL/ día	22 días	0% (0/5)	-	González (1995) ³⁰
CRI	2.3X10 ⁷ tripomastigotes	Ratones C3H (15.5 g)	NI	NI	NI	0% (0/20)	-	Bice D. (1970) ³¹
Nitida	2.3X10 ⁷ tripomastigotes	Ratones C3H (15.5 g)	NI	NI	NI	0% (0/20)	-	Bice D. (1970) ³¹
Z-1	2.3X10 ⁷ tripomastigotes	Ratones C3H (15.5 g)	NI	NI	NI	0% (0/20)	-	Bice D. (1970) ³¹
Clona 14	2X10 ⁶ tripomastigotes	Ratones Balb/C (18-20 g)	-	0	0 hasta los 90 días	0% (0/30)	-	M.T.Lima (1990) ³⁷

TABLA 1 (segunda parte)

NI: Dato no indicado

ND: Dato no determinado

(*) Parasitemia interrumpida

Gracias a este tipo de observaciones el parámetro que nos permitirá clasificar las poblaciones de *T.cruzi* con mayor claridad es la mortalidad producida a ratones; en primer lugar consideraremos el porcentaje de mortalidad, y en segundo lugar el tiempo. Se consideró así ya que lo que preocupa en mayor grado es que el parásito ocasione la muerte, y en menor grado el tiempo que tarda en matar al 100% de los animales. En este sentido, las poblaciones de la tabla 1 quedarán clasificadas en el orden que indica el inciso siguiente.

a) De acuerdo al porcentaje de mortalidad:

100 %	30%	20%	0%
Y	Sylvio-X10	Sylvio-X10 clona 4	Chinga
m3			CR2
m4			h2
m1			ABC
m2			hSLU239
Sylvio-X10/7			h1
Tulahuen			mSLU142
CL			etc.

En este caso las poblaciones más virulentas son aquellas que produjeron una mortalidad del 100%, y las menos virulentas son las que no mataron ratones.

b) De acuerdo al día promedio de muerte su clasificación será:

$$Y > \left\{ \begin{matrix} m3 \\ m4 \end{matrix} \right\} > m1 > m2 > \left\{ \begin{matrix} \text{Sylvio} \\ \text{X10/7} \end{matrix} \right\} > \text{Tulahuen} > \text{CL} > \text{Sylvio-X10} > \left\{ \begin{matrix} \text{Sylvio} \\ \text{X10/4} \end{matrix} \right\} > \left\{ \begin{matrix} \text{Chinga} \\ \text{CR2} \\ \text{h2} \\ \text{ABC} \\ \text{hSLU239} \\ \text{h1} \\ \text{etc.} \end{matrix} \right\}$$

En este caso la población más virulenta es la cepa Y, ya que ésta mató al 100 % de los ratones en menos días.

c) De acuerdo al día de inicio de mortalidad:

En este caso no se pudieron clasificar las diferentes poblaciones, ya que los artículos empleados no reportaron el día de inicio de mortalidad.

Debido a que no pudieron ser clasificadas algunas poblaciones de *T. cruzi* con base a la mortalidad, y que *T. cruzi* ocasiona daño al huésped no necesariamente matándolo recurrimos a otros factores como la parasitemia y el histotropismo.

2. Parasitemia:

La parasitemia se presenta en los huéspedes debido a que *T. cruzi*, después de reproducirse como amastigote en los tejidos, sale a la circulación en forma de tripomastigote.

La parasitemia ha sido determinada por innumerables investigadores para distintas poblaciones del parásito y se registra como número de parásitos por unidad de volumen en función del tiempo de infección. Este tipo de registro permite observar curvas en forma de parábolas en las que hay una fase de inicio y un aumento exponencial seguido de una disminución hasta desaparecer; esto es debido a que la respuesta inmune del huésped ejerce acción destructiva de los tripomastigotes sanguíneos.

Estas curvas de parasitemia son indicativas de la velocidad de reproducción del parásito en tejidos, evasión de la respuesta inmune del huésped por parte del parásito o poca eficacia de la resistencia del huésped a la infección.

Algunos ejemplos de curvas de parasitemia observadas en ratones para cepas, clonas u otras poblaciones de *T. cruzi* pueden ser observadas en las figuras 9, 10 y 11.

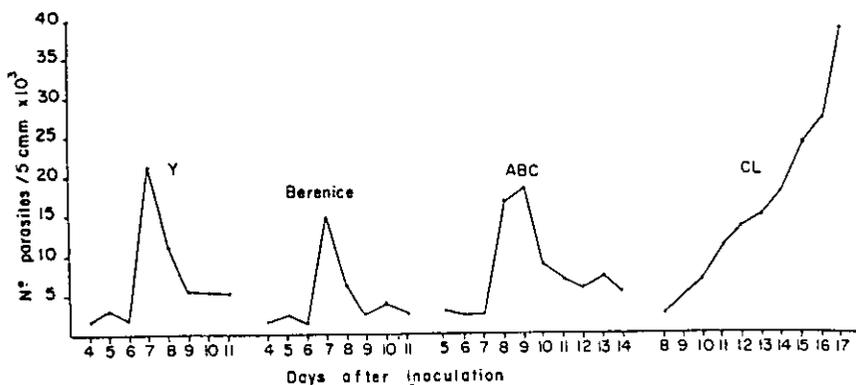


Fig. 9. Curvas de parasitemia en grupos de ratones inoculados con diferentes cepas de *T. cruzi*. Extraído de la referencia 32.

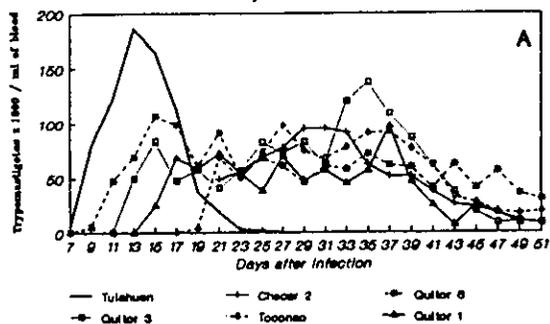


Fig. 10. Curvas de parasitemia en grupos de cinco ratones infectados con 10^5 tripomastigotes metacíclicos de diferentes aislados de *T. cruzi* extraídos de la referencia número 30.

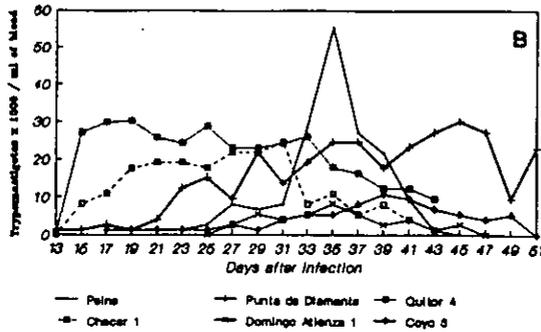


Fig. 11 Curvas de parasitemia en grupos de cinco ratones infectados con 10^5 tripomastigotes metacíclicos de diferentes aislados de *T. cruzi*. Extraído de la referencia número 30

En los ejemplos anteriores vemos que las curvas son muy variadas y difieren en:

1. Magnitud (área bajo la curva).
2. Inicio de la parasitemia.
3. Duración de la parasitemia.

En la figura 9, por ejemplo se observan distintas curvas de parasitemia, desde aquellas en las que en tan solo siete días se alcanza el pico de máxima parasitemia (cepa Y y Berenice) hasta en la que en más de 15 días la curva sigue ascendiendo sin disminuir (CL).

En la figura 10 se observan otras cepas que presentan variabilidad en el tipo de curvas, desde aquellas en la que la máxima parasitemia se alcanza al día 13 (Tulahuen) y otras con menos magnitud pero con mayor persistencia como son Chacar, y Qulbor, entre otras. Las cepas de la figura 11 producen mucho menor parasitemia, obsérvese como la cepa Peine

produce su máxima parasitemia al día 35 y disminuye rápidamente, mientras que el resto, aunque los picos son menores, tienen mayor duración de parasitemia. Esta variabilidad se observa en una gran cantidad de trabajos.^{27, 28 y 31}

La tabla uno resume las características más notables en las infecciones producidas en ratones inoculados con distintas poblaciones de *T.cruzi*.

Diferentes factores influyen en cada una de estas variables:

1. En la magnitud influyen factores como el número de parásitos inoculados y la respuesta inmune del huésped contra la infección; la magnitud aumenta en función del número de parásitos inoculados, esto es debido a que los parásitos al reproducirse generan una mayor cantidad de tripomastigotes en sangre. Por otro lado, si la respuesta inmune del huésped es deficiente los tripomastigotes no pueden ser eliminados rápidamente de la sangre y la magnitud aumenta, si es eficiente, los tripomastigotes son eliminados de la sangre y la magnitud de la parasitemia disminuye hasta desaparecer.

La magnitud de la parasitemia, está representada por el área bajo la curva, nótese la diferencia de magnitudes que existen en las figuras 9, 10 y 11.

Para determinar el área bajo la curva, se empleó el método de los trapezoides,³³ el cual está basado en la suma del área de los trapecios, la fórmula para obtener el área de un trapecio es:

$$\text{Área de un trapecio} = \frac{(B + b) h}{2}$$

En donde "B" es la base mayor, "b" es la base menor y "h" es la altura.

Si consideramos que una curva de parasitemia esta formada por muchos trapecios, la fórmula para obtener el área bajo la curva será aquella que sume al área de dichos trapecios, y esta fórmula es:

$$ABC'_0 = \frac{Cp_0 + Cp_1}{2} (t_1 - t_0) + \frac{Cp_1 + Cp_2}{2} (t_2 - t_1) + \frac{Cp_2 + Cp_3}{2} (t_3 - t_2) + \dots + \frac{Cp_{n-1} + Cp_n}{2} (t_n - t_{n-1})$$

En donde ABC'_0 es el área bajo la curva desde el tiempo cero hasta el tiempo t , Cp_0 es la concentración de parásitos en el tiempo cero, Cp_1 es la concentración de parásitos en el tiempo uno, t_1 es el tiempo uno, t_0 es el tiempo cero, y así sucesivamente.

De esta manera se puede obtener la magnitud de las parasitemias, la cual está dada por el número de parásitos por volumen por día, los valores de la magnitud de las diferentes poblaciones también están representados en la tabla 1.

2. El inicio de la parasitemia depende del tiempo que tardan los parásitos en adaptarse al huésped, y de la velocidad de multiplicación de los parásitos; si un parásito tarda poco tiempo en adaptarse y en multiplicarse, los tripomastigotes saldrán rápidamente a circulación observándose un inicio de parasitemia rápido.
3. La duración de la parasitemia es dependiente de la respuesta inmune del huésped y de la afinidad hacia los tejidos por parte del parásito, si la infección se presenta en un huésped inmunosuprimido, los tripomastigotes no podrán ser eliminados de la sangre y éstos estarán presentes por un tiempo mayor incrementando con esto la permanencia en sangre, si los parásitos tienen una buena afinidad por los tejidos, aquellos saldrán del torrente sanguíneo hacia los tejidos para establecerse allí, y seguirse reproduciendo como amastigotes en las células de los tejidos que infecta.

Dado lo anterior, la población más virulenta será aquella que presente una curva con una magnitud, duración grande, y un inicio de parasitemia pronto.

Debido a que algunas poblaciones de *T. cruzi* ocasionan las mismas mortalidades, para saber cuáles son más virulentas entre ellas mismas, se clasificarán en función de las mismas variables que involucran la parasitemia como lo son el tiempo de inicio, la magnitud y la duración de la parasitemia; se busca que haya una correlación entre mortalidad y parasitemia. De los parámetros de parasitemia veremos cual es el que se correlaciona.

- a) Clasificación en función de la magnitud para las poblaciones que ocasiona el 100% de mortalidad en ratones (ver tabla 1 de pág. 35 e inciso (b) de pág. 37).

$$m1 > m2 > m4 > m3 > CL > Y > Tulahuen$$

- b) Clasificación en base al día de inicio de la parasitemia:

$$\left. \begin{array}{l} Y \\ m3 \\ m4 \\ m1 \\ m2 \\ CL \end{array} \right\} > Tulahuen$$

- c) Clasificación en base a la duración de la parasitemia:

$$CL > Tulahuen > m2 > \left\{ \begin{array}{l} m1 \\ Y \end{array} \right\} > \left\{ \begin{array}{l} m3 \\ m4 \end{array} \right\}$$

La duración de la parasitemia resulta en un orden inverso al criterio de clasificación con base a la mortalidad y el día de inicio de la parasitemia es muy parecido para todas las

poblaciones por lo que son parámetros que no permiten una clasificación de las diferentes poblaciones de *T. cruzi*, sin embargo, tal parece que la magnitud es un parámetro correlacionado directamente con la mortalidad, por tanto el siguiente criterio para la clasificación es la magnitud de la parasitemia; de este modo el orden de las poblaciones anteriores en función de la virulencia resulta:

	Mayor virulencia	Y
		m4
		m3
		m1
		m2
		Sylvio X10/7
		Tulahuen
		CL
		Sylvio X10
		Sylvio X10/4
		Chinga
		CR2
		h ₂
		ABC
		hSLU239
		h ₁
		mSLU142
		Berenice
		Quitor 5
		Quitor 3
		Quitor 1
		Toconao
		Checar 2
		Coyo 3
		Punta de diamante
		Checar 1
	Peine	
	Quitor 4	
	Domingo Atienza 1	
	CR1	
	Nítida	
	Z-1	
Menor virulencia	Clona 14	

De esta manera, las poblaciones de la tabla uno fueron clasificadas y el orden de los factores que nos permitieron la clasificación de las diferentes poblaciones de *T. cruzi* es el siguiente:

- a) Porcentaje de mortalidad.
- b) Día promedio de muerte.
- c) Día de inicio de la mortalidad.
- d) Magnitud de la parasitemia.

Como fue mencionado anteriormente, existe otro parámetro que nos permitirá la clasificación de diferentes poblaciones de *T. cruzi* en caso de buscar una clasificación más fina o en casos en que no hayan sido reportados datos de mortalidad o de parasitemia, dicho parámetro es el grado de histotropismo que presentan las diferentes poblaciones de *T. cruzi*.

3. Histotropismo:

El histotropismo es la afinidad que presentan los parásitos hacia los tejidos, y se reporta como el número de amastigotes o nidos de amastigotes, presentes en un determinado tejido. Existen cuatro tipos de tejidos fundamentales que forman los diferentes órganos del cuerpo, estos tejidos son el tejido epitelial, el tejido conectivo o conjuntivo, el tejido muscular y el tejido nervioso.^{34 y 35}

Tejido epitelial:

El tejido epitelial se caracteriza por su escasísima sustancia intercelular; los epitelios están compuestos de células que recubren las superficies externas del cuerpo y revisten no solo las cavidades corporales cerradas sino también los tubos que comunican con el exterior (aparato digestivo, respiratorio y genitourinario). El epitelio también forma la porción secretora (parénquima) de las glándulas y sus conductos excretores.

Tejido conectivo:

El tejido conectivo contiene células muy separadas una de otra y presenta una gran cantidad de fibras extracelulares incluidas en una matriz de sustancia fundamental, está ubicado inmediatamente por debajo de los epitelios de revestimiento y sirve como estructura de sostén.

Clasificación del tejido conectivo:

- Tejido conjuntivo
 - Tejido laxo
 - Tejido denso
- Tejido conjuntivo especializado
 - Tejido conectivo denso modelado(ligamentos y tendones)
 - Tejido adiposo
 - Tejido sanguíneo
 - Tejido óseo
 - Tejido cartilaginoso
 - Tejido hematopoyético
 - Tejido linfoide
- Tejido conjuntivo embrionario
 - Mesénquima
 - Tejido conectivo mucoso.

Tejido muscular:

El tejido muscular se caracteriza por presentar grupos de células especializadas cuya función es la contracción, estas células son alargadas y se disponen en forma paralela de manera que actúan en conjunto para producir movimiento.

Clasificación del tejido muscular:

- Músculo estriado
 - Músculo esquelético
 - Músculo cardíaco
- Músculo liso (limitado a las vísceras y vasos sanguíneos)

Tejido nervioso:

El tejido nervioso se compone de células nerviosas llamadas neuronas, y de varios tipos de células de sostén asociadas. En el Sistema Nervioso Central las células de sostén se denominan colectivamente neuroglia; y en el Sistema Nervioso Periférico reciben el nombre de células de Schwann y células satélites.

Estos tejidos fundamentales forman a los diversos órganos, que agrupados por sus características fisiológicas forman los aparatos o sistemas.^{34 y 35}

- Sistema nervioso:

El sistema nervioso está compuesto por todo el tejido nervioso del organismo y puede dividirse en Sistema Nervioso Central y Sistema Nervioso Periférico, El Sistema Nervioso Central está formado por el encéfalo y la médula espinal, el resto del tejido nervioso forma el Sistema Nervioso Periférico que está compuesto de nervios, ganglios y receptores.

- Sistema cardiovascular:

El sistema cardiovascular está compuesto de vasos sanguíneos (capilares, arterias, arteriolas y vénulas poscapilares) que transportan la sangre por todo el organismo, por el corazón que bombea la sangre y por los vasos linfáticos que transportan la linfa.

- Sistema inmunitario:

El sistema inmunitario comprende al Timo, Médula ósea, Nódulos linfáticos, Ganglios linfáticos y Bazo.

- Aparato digestivo

El aparato digestivo esta formado por el tubo digestivo y sus glándulas anexas:

El tubo digestivo esta constituido por:

Cavidad oral

Faringe

Esófago

Estómago

Intestino delgado (duodeno, yeyuno e íleon)

Intestino grueso (ciego, colon ascendente, colon transverso, colon descendente, sigmoides, recto y conducto anal).

Las glándulas anexas del aparato digestivo son:-

Hígado

Vesícula biliar

Páncreas.

- Sistema respiratorio

El sistema respiratorio esta compuesto por pulmones y una serie de vías aéreas que lo comunican con el exterior.

Los conductos del aparato respiratorio se dividen en dos grupos: la porción conductora y la porción respiratoria; la porción conductora comprende las cavidades nasales, la faringe, la laringe, la tráquea, los bronquios y los bronquiolos; la porción respiratoria es aquella en la cual se producen los intercambios gaseosos entre el aire y sangre, y comprende a los bronquiolos respiratorios, conductos alveolares, sacos alveolares y alvéolos.

- Aparato urinario

Esta compuesto por dos riñones, dos uréteres, vejiga urinaria y uretra, la función del aparato es filtrar la sangre.^{34 y 35}

Existen otros sistemas o aparatos como el aparato reproductor, la piel, etc. pero los antes mencionados son los que más nos interesan porque son los que se encuentran comprometidos en la enfermedad de Chagas.

El grado de virulencia en función del histotropismo de cierta población de *T.cruzi* depende en primer lugar del sistema que infecta, y en segundo lugar de la carga parasitaria que éste presente; esto quiere decir que si el parásito infecta algún tejido u órgano vital como el corazón o el cerebro es más fácil que mate al huésped aun habiendo una baja carga parasitaria, que si infecta algún tejido como el músculo esquelético que, aun teniendo una alta carga parasitaria no le causaría la muerte al huésped debido a que no es un órgano tan importante.

Debido a estas observaciones se construyó una tabla de estudios histopatológicos que reporta el número de órganos que infecta, el tipo de órganos que infecta y la carga parasitaria por tejido, esto para lograr la clasificación de las diferentes poblaciones de *T.cruzi* en función al histotropismo que presentan.

Basándonos en la tabla II clasificaremos las diferentes poblaciones en función de las variables presentes en el histotropismo como lo son el tipo de sistema parasitado y la carga promedio parasitaria por sistema u órgano; las clasificaciones resultantes serán comparadas con la clasificación obtenida al basarnos en la mortalidad y en la parasitemia, con el fin de encontrar alguna correlación que compruebe que la clasificación hecha es correcta, y que el histotropismo es un parámetro adecuado para lograr una clasificación.

Población	# de órganos positivos / # de órganos revisados.		Esófago	Estómago	Duodeno	Yeyuno	Íleon	Ciego	Colon	Recto	Corazón	Músculo esquelético	Vejiga
	Machos	Hembras											
Chilga	Machos	18/18	2	25	5	4	1	5	10	13	20	90	197
CR 2	Machos	17/18	8	6	5	7	12	12	25	40	47	7	6
Nilda	Machos	10/18	-	2	1	1	-	2	1	2	3	-	4
Z1	Machos	13/18	3	5	3	2	-	1	5	5	7	23	14
Y	Machos	15/16	12	10	ND	ND	ND	ND	ND	ND	35	30	60
Bersalte	Machos	14/16	14	90	ND	ND	ND	ND	ND	ND	35	25	150
ABC	Machos	14/16	28	90	ND	ND	ND	ND	ND	ND	70	20	105
CL	Machos	13/16	12	17	ND	ND	ND	ND	ND	ND	170	70	30
BSLU 239	Machos	1/08	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	3	-	ND
h1	Machos	1/08	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	8	-	ND
b2	Machos	1/08	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	3	-	ND
msLU 142	Machos	1/08	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1	-	ND
m1	Machos	2/08	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	8	1	ND
m2	Machos	2/08	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	3	1	ND
m3	Machos	5/08	1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	13	3	ND
m4	Machos	2/08	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	13	13	ND
Sylvie-X 10/7	Machos	17/17	+	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND	+	+	+
Sylvie-X 10/4	Machos	14/17	+	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND	+	+	+

TABLA II. Histotropismo (primera parte)

El número indicado en cada celda es el número de psuduquistes por 50 campos.

ND No determinado

Población	Pulmón	Cerebro	Bazo	Hígado	Esófago	Glándulas salivales	Riñón	Intestino delgado	Intestino grueso	Tejido adiposo	Músculos linfáticos	Nervios periféricos	Carga parasitaria promedio
Chigua	19	5	1	1	1	7	7	ND	ND	ND	ND	ND	23
CH 2	2	6	1	5	10	-	7	ND	ND	ND	ND	ND	12
Nilda	2	1	-	-	-	-	-	ND	ND	ND	ND	ND	2
Z1	2	1	-	-	1	-	-	ND	ND	ND	ND	ND	6
Y	7	-	+	80	36	ND	8	5	15	72	ND	ND	25
Berence	14	-	+	110	58	ND	8	15	240	42	ND	ND	64
ABC	12	-	+	40	25	ND	15	30	255	45	ND	ND	58
CL	3	-	+	2	16	ND	-	5	50	16	ND	ND	33
BSLU 239	-	ND	-	-	ND	ND	ND	-	-	ND	ND	ND	3
m1	-	ND	-	-	ND	ND	ND	-	-	ND	ND	ND	8
m2	-	ND	-	-	ND	ND	ND	-	-	ND	ND	ND	3
mSLU 142	-	ND	-	-	ND	ND	ND	-	-	ND	ND	ND	1
m1	-	ND	-	-	ND	ND	ND	-	-	ND	ND	ND	4.5
m2	-	ND	-	-	ND	ND	ND	-	-	ND	ND	ND	2
m3	-	ND	-	-	ND	ND	ND	1	1	ND	ND	ND	3
m4	-	ND	-	-	ND	ND	ND	-	-	ND	ND	ND	10
Sylvie-X 10/7	+	+	+	+	+	+	ND	+	+	+	+	+	ND
Sylvie-X 10/4	-	-	+	+	+	-	ND	+	+	+	+	+	ND

TABLA II. Histotropismo (segunda parte)

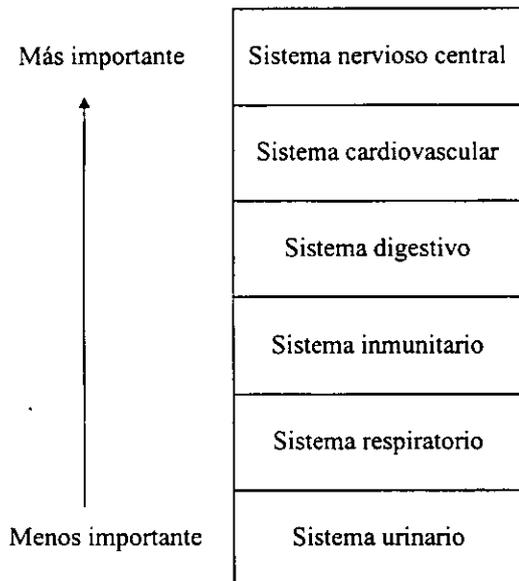
El número indicado en cada celda es el número de pseudoquistes por 50 campos.

ND No determinado

a) Clasificación con base al tipo de sistema parasitado:

Primero se ordenaron los diferentes sistemas en función de importancia clínica, siendo los más importantes aquellos que al ser infectados ocasionen la muerte al huésped en pocos días, y los menos importantes aquellos que no ocasionen gravedad clínica al paciente, por último clasificaremos las poblaciones de la tabla II en función del tipo de sistema parasitado, siendo la más virulenta aquella que infecte al órgano o sistema más importante.

Organización de los sistemas en función de importancia clínica, para un individuo normal:



Clasificación de las diferentes poblaciones de *T.cruzi* en función al tipo de órgano parasitado:

Sistema nervioso central	Sistema cardiovascular	Sistema digestivo	Sistema inmunitario	Sistema respiratorio	Sistema urinario
CR2	CL	Berenice	Chinga	Chinga	Chinga
Chinga	ABC	ABC	CR2	Berenice	Berenice
Nítida	CR	Y	Y	ABC	ABC
Z1	Y	CL	Berenice	Y	Y
Sylvio-X10/7	Berenice	CR2	ABC	CL	CL
	Chinga	Chinga	CL	CR2	Z1
	m3	Z1	Sylvio-X10/7	Nítida	CR2
	m4	Nítida	Sylvio-X10/4	Z1	Nítida
	h1	m3			Sylvio-X10/4
	m1	Sylvio-X10/7			Sylvio-X10/7
	Z1	Sylvio-X10/4			
	Nítida				
	hSLU239				
	h2				
	m2				
mSLU142					
Sylvio-X10/4					
Sylvio-X10/7					

Nota: Las poblaciones que están en un mismo recuadro tienen la misma carga parasitaria.

El histotropismo es un parámetro que permite conocer si un huésped vertebrado está infectado; como se observa en la tabla anterior las poblaciones de *T.cruzi* parasitan diferentes órganos. En la página 44 se presenta la clasificación de las poblaciones con base a la mortalidad y parasitemia que presentaron; ahora se tratará de observar si el histotropismo de cada población correlaciona con la virulencia del parásito; para ello se ordenaron los sistemas parasitados por las distintas poblaciones de *T.cruzi* de acuerdo a la

clasificación presente en la página 44, es decir, los órganos de mayor importancia serán aquellos parasitados por las poblaciones más virulentas y viceversa. De acuerdo a lo anterior el orden de importancia de los sistemas parasitados resultó:

Sistema cardiovascular	Sistema digestivo	Sistema inmunitario	Sistema urinario	Sistema respiratorio	Sistema nervioso central
------------------------	-------------------	---------------------	------------------	----------------------	--------------------------

Mayor importancia ← ————— Mayor importancia

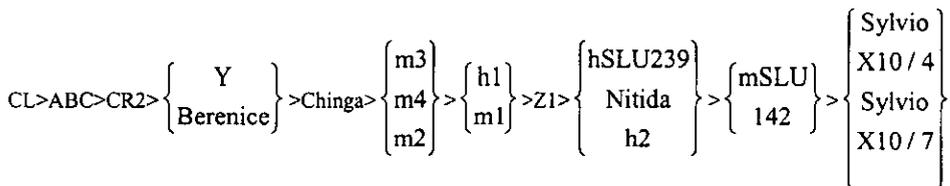
En seguida fue necesario observar si había una correlación entre la escala anterior y el orden que se presenta en la página 44, para lo cual se registró la clasificación obtenida en base a la mortalidad y parasitemia, con los sistemas parasitados por cada población, y el resultado fue el siguiente:

Mayor virulencia ↑	Población	Sistema cardiovascular	Sistema digestivo	Sistema inmune	Sistema urinario	Sistema respiratorio	Sistema nervioso central
		Y	+	+	+	+	+
	m4	+	-	-	-	-	-
	m3	+	+	-	-	-	-
	m1	+	-	-	-	-	-
	m2	+	-	-	-	-	-
	Sylvio X10/7	+	+	+	+	+	+
	CL	+	+	+	+	+	-
	Sylvio X10/4	+	+	+	+	-	-
	Chinga	+	+	+	+	+	+
	CR2	+	+	+	+	+	+
	h2	+	-	-	-	-	-
	ABC	+	+	+	+	+	-
	hSLU239	+	-	-	-	-	-
	h1	+	-	-	-	-	-
	mSLU142	+	-	-	-	-	-
	Berenice	+	+	+	+	+	-
	Nítida	+	+	-	+	+	+
Menor virulencia	Z1	+	+	-	+	+	+

Podemos observar que no hay correlación entre el histotropismo y la virulencia de las poblaciones de *T. cruzi*; sin embargo tal parece que las poblaciones más virulentas parasitan en primer lugar al sistema cardiovascular y en segundo lugar al sistema digestivo, por lo que aquí se concluye que el histotropismo se debe conocer para saber si el parásito es capaz de infectar dichos órganos, pero no para clasificar las poblaciones; en otras palabras, no existe correlación entre virulencia e histotropismo, de tal forma que las poblaciones sólo se clasifican en función de parasitemia y mortalidad.

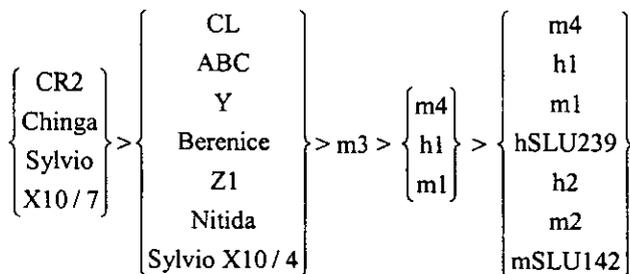
Debido a que no pudieron ser clasificadas las poblaciones con base al tipo de sistemas parasitados, las clasificaremos en función a la carga parasitaria presente en el sistema cardiovascular:

b) Clasificación en base a la carga parasitaria en el sistema cardiovascular:



En este caso tampoco se encontró correlación con la clasificación obtenida con base a la mortalidad, por lo que se hará otra clasificación en función al número de sistemas parasitados.

c) Clasificación en base al número de sistemas parasitados.



Esta clasificación tampoco correlaciona con la clasificación en función de la mortalidad y parasitemia, por lo que el siguiente paso fue analizar la cinética de la presencia de amastigotes en corazón.

d) Clasificación en función de la cinética de la presencia de pseudoquistes en corazón.

Analizando la cinética de la presencia de pseudoquistes en corazón es posible determinar la virulencia de las diferentes poblaciones. La cinética de la presencia de pseudoquistes nos indica el número de pseudoquistes presentes en un determinado tiempo de infección. Para poder clasificar a las diferentes poblaciones de *T. cruzi* se estableció un índice de carga parasitaria en tejido (ICPT), dicho índice está en función del tiempo.

$$\text{Índice de carga parasitaria en tejido} = \frac{\text{Número máximo de parásitos}}{\text{Día post - infección}}$$

Se determinó el ICPT para las diferentes, y la población más virulenta fue aquella que presentó el número mayor del ICPT, los resultados de los ICPT de las poblaciones se reportan en la siguiente tabla, y están reportados de mayor a menor, la gráfica de la cinética de pseudoquistes en corazón es mostrada más adelante.

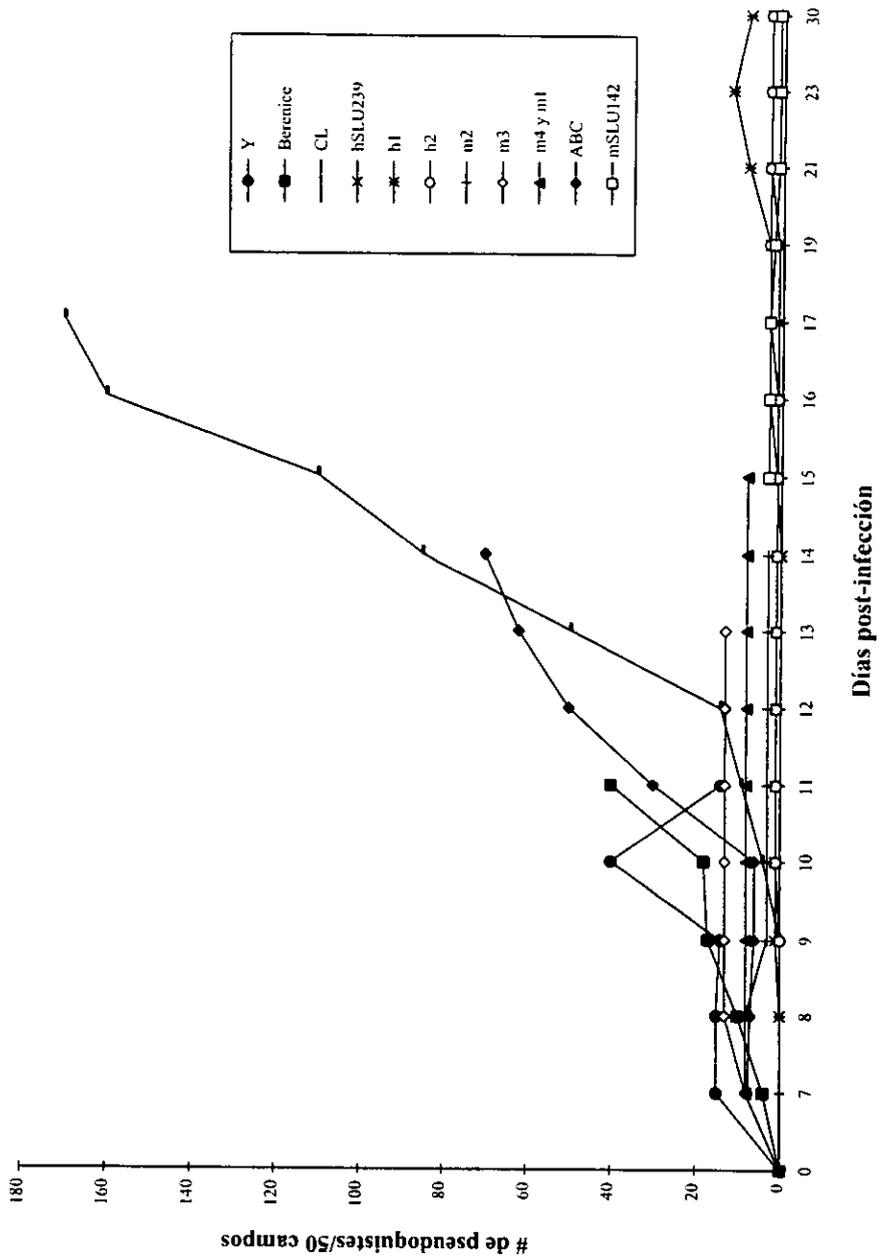
Población	Índice de carga parasitaria en tejido
CL	10
ABC	5.1
Y	4
Berenice	3.63
m3	2.4
m1 y m4	1.14
h1	0.52
m2	0.42
mSLU142	0.2
h2	0.18
hSLU239	0.14

Mayor virulencia



Menor virulencia

Cinética de presencia de pseudoquistes en corazón



Comparando las clasificaciones anteriores con la clasificación en base a la mortalidad y a la magnitud observamos que existe gran diferencia, nótese como en la clasificación en base al histotropismo, las poblaciones m1, m2, m4 y Y son clasificadas en grado de menor virulencia, siendo estas poblaciones las que matan a todos los ratones en experimentación en corto tiempo, esto nos conduce a pensar que la clasificación en función al histotropismo que presentan las diferentes poblaciones no es representativa del grado de virulencia que presentan, sin embargo es indicativa del grado de infectividad de las poblaciones, por lo que es recomendable no clasificar a las diferentes poblaciones de cada especie parasitaria sólo por el grado de histotropismo que presenten, más bien se deben comparar las clasificaciones resultantes con el grado de mortalidad que presenten, ya que éste es el parámetro principal para la clasificación en función de la virulencia.

VI.2 Metodología para clasificar a *Toxoplasma gondii* en función de la virulencia.

Al igual que *T. cruzi*, *T. gondii* ocasiona diversos efectos patogénicos que sirven para clasificar a las diferentes poblaciones en función de su virulencia, para esto es necesario analizar los efectos patogénicos observados *in vivo*, los cuales pueden conducir a la muerte al huésped, o solo ocasionarle ciertos daños más o menos graves que son manifestados por diversos signos y síntomas clínicos. Los efectos patogénicos que ocasiona el parásito se ven reflejados en la mortalidad del huésped, parasitemia e histotropismo que presente el parásito.

Mortalidad:

Debido a que la mortalidad ocasionada por *T. gondii* es registrada con el porcentaje de muertes producidas por unidad de tiempo en animales de experimentación, las diversas poblaciones serán clasificadas en primer lugar por la mortalidad que ocasionen, siendo más virulentas aquellas poblaciones que maten al mayor número de animales en el menor

tiempo. Se consideró así ya que lo que importa es el porcentaje de muertes que ocasiona no importando tanto el tiempo en que lo haga.

De esta manera será clasificada como más virulenta aquella población que mate a un número mayor de animales en un menor tiempo y los parámetros que nos permitirán clasificar a las diversas poblaciones de *Toxoplasma gondii* en función de la mortalidad son:

- a) Porcentaje de muertes ocasionadas.
- b) Día promedio de muerte.

Con relación al porcentaje de muertes ocasionadas, serán más virulentas aquellas poblaciones que ocasionen un mayor porcentaje de muertes; y con el día promedio de muerte, serán más virulentas aquellas poblaciones que presenten un día promedio de muerte menor.^{36,37, 38 y 39}

Existen algunas poblaciones que quizá no ocasionan la muerte al huésped, pero esto no quiere decir que estas poblaciones no sean virulentas, más bien el grado de virulencia es menor, y los efectos patológicos que ocasionan no son tan graves que ocasionen la muerte al huésped, pero sí le ocasionan ciertos daños, manifestados por síntomas clínicos, como lo son: fiebre, pérdida de peso, meningitis, etc., debido a esto, recurrimos a otros parámetros que nos pueden ayudar en la clasificación de las diversas poblaciones de *Toxoplasma gondii*, éstos parámetros son la parasitemia y el histotropismo, que serán explicados con más detalle a continuación.

Parasitemia:

En huéspedes infectados con *T. gondii*, la parasitemia se representa por el número de taquizoítos presentes en determinado volumen de sangre.

Las taquizoítos después de la infección son liberados, y estos pueden llegar a la sangre causando una parasitemia presente del día cinco al día 12 después de la infección, diseminándose ésta a muchos tejidos. La cesación de la parasitemia se presenta al desarrollarse la respuesta inmune que acaba con los taquizoítos en sangre, pero la infección persiste al ser enquistados los bradizoítos en un quiste tisular.⁴⁰ La intermitente ruptura de dichos quistes puede ocurrir y quizá ésta también sea la responsable de la continua estimulación del sistema inmune y de las parasitemias que han sido observadas en animales infectados crónicamente y en el hombre.⁴¹

En huéspedes inmunocompetentes, la respuesta inmune ocasiona que la mayoría de los toxoplasmas liberados mueran, sin embargo unos pocos escapan de la respuesta inmune y entran al sistema vascular explicando con esto parasitemias bajas e intermitentes que estimulan continuamente la respuesta inmune del huésped.

Los taquizoítos presentes en la sangre pueden ser contados empleando la técnica de inmunofluorescencia^{42 y 43} y aplicando la siguiente fórmula para determinar la cantidad de parásitos en un volumen de sangre determinado.

$$\text{Número de parásitos} = \frac{\text{Título recíproco}}{\text{volumen de sangre}}$$

Si el número de parásitos es determinado para diferentes días⁴² se puede hacer una gráfica de parasitemia en función del tiempo, y determinar la magnitud de la parasitemia empleando el método de los trapecios previamente mencionado (página 42).

Una vez que se determinó la magnitud de la parasitemia y que ésta indica la velocidad de reproducción del parásito, las diferentes poblaciones podrán ser clasificadas de acuerdo

a la magnitud de la parasitemia, siendo éste, otro parámetro para la clasificación de *Toxoplasma gondii*.

Otro parámetro relacionado con la parasitemia es la temperatura corporal del huésped, la cual se presenta como respuesta a la infección, y es un parámetro que en el caso de la toxoplasmosis es muy cuantificado. En algunos estudios ^{39, 43 y 44} se ha determinado la temperatura rectal de los animales en experimentación, concluyéndose que a mayor temperatura mayor virulencia de la cepa.

Con los parámetros ya descritos podrían ser clasificadas todas las poblaciones de *T. gondii*. Otro dato que permite clasificar las diferentes poblaciones en función de su virulencia es el histotropismo, que aunque refleje el grado de infectividad de la población y no el de virulencia, podría ser utilizado para lograr la clasificación.

Histotropismo:

El histotropismo como se mencionó para el caso de *T. cruzi*, es la afinidad que presentan los parásitos hacia los tejidos y es reportado como el número de quistes presentes en determinado tejido, los quistes son encontrados principalmente en sistema nervioso central, músculo cardiaco, pulmones, músculo esquelético y retina, lo cual indica que el sistema nervioso central, el sistema cardiovascular y el sistema respiratorio son los sistemas más afectados. Cuando los quistes son desintegrados o rotos por algún trauma u otra causa liberando los bradizoítos en un paciente inmunosuprimido, aquellos ocasionarán necrosis tisular que puede terminar en una encefalitis fatal, neumonía, miocarditis, ceguera o provocar algún otro daño. ^{41, 45, 46 y 47}

Con base a lo anterior, el grado de virulencia de las diferentes poblaciones de *T. gondii* depende en primer lugar del órgano o sistema que afecten y en segundo lugar de la carga parasitaria que presenten, para ésto serán ordenados los diferentes órganos y sistemas en función de importancia clínica.

En muchos estudios se han reportado el número de quistes en diferentes órganos^{37-39, 42-44, 46-48}. Algunos estudios reportan como más virulentas a las poblaciones que presentan un mayor número de quistes en pulmones que en sistema nervioso central;³⁹ se basan en que la neumonía ocasionada por la presencia de quistes en pulmón, conduce a la muerte al huésped en menos tiempo, y el número de casos es mayor que el número de casos con encefalitis que, por el contrario conduce a la muerte en un tiempo mayor.

Apoyados en este estudio, ordenaremos los diferentes órganos y sistemas en función de importancia clínica colocando en primer lugar de importancia al sistema respiratorio por lo antes señalado, y en menor importancia al ojo, ya que si la población tiene afinidad a este órgano, lo único que le ocasionará al huésped es ceguera y no la muerte.

Organización de los sistemas en orden de importancia clínica:

Sistema respiratorio	Sistema nervioso central	Sistema cardiovascular	Sistema inmunitario	Sistema digestivo	Ojo
----------------------	--------------------------	------------------------	---------------------	-------------------	-----

Mayor importancia ←————— Menor importancia

Además del sistema parasitado y la carga parasitaria por sistema, el número de sistemas parasitados, es otro parámetro que puede considerarse para la clasificación en función del histotropismo, éste es de gran importancia ya que entre más sistemas parasite determinada población, ésta será más virulenta ya que habrá más posibilidad de desencadenar alguna

enfermedad de importancia como la neumonía o encefalitis, si alguno de los dos, o los dos sistemas involucrados en ambas enfermedades están parasitados.

Quizá existan poblaciones que aún no hayan podido ser clasificadas con base a los anteriores parámetros de clasificación, en este caso es necesario recurrir a otros parámetros como lo son la cinética de la presencia de pseudoquistes en el sistema respiratorio y en el sistema nervioso central, empleando el índice de carga parasitaria en tejido, que como ya se mencionó, entre más grande sea, más virulenta será la población. Éste índice de carga parasitaria, nos muestra la rapidez de parasitación de las poblaciones ya que está en función del tiempo, por lo que es de gran importancia.

Una vez descritos todos los parámetros de clasificación para *T.gondii* en orden de importancia, se ordenarán dichos parámetros en una tabla que resuma los diferentes parámetros para una rápida utilización de los mismos. (Ver tabla III). Los parámetros deberán ser utilizados de acuerdo al orden que presentan.

La tabla III resume los parámetros de clasificación basados en los diversos efectos patogénicos observados *in vivo*, sin embargo la clasificación de las diferentes poblaciones, no sólo puede realizarse empleando dichos parámetros, también puede realizarse empleando resultados observados en estudios realizados *in vitro* los cuales reflejan la rapidez de las diferentes poblaciones para establecerse en cultivos celulares y la rapidez de enquistamiento que presenten; ésto es de gran importancia ya que la ruptura de quistes tisulares presentes en huéspedes infectados crónicamente, ha sido implicada en el desarrollo de lesiones patológicas asociadas a la toxoplasmosis sintomática. ⁴¹

Tabla III.

Parámetros de clasificación basados en:	Parámetros de clasificación
Mortalidad.	Porcentaje de muertes ocasionadas.
	Día promedio de muerte.
Parasitemia.	Magnitud.
	Temperatura.
Histotropismo.	Órgano o sistema parasitado.
	Carga parasitaria por órgano o sistema.
	Número de sistemas parasitados
	Cinética de presencia de pseudoquistes en sistema respiratorio y sistema nervioso central.
	Carga parasitaria de los demás órganos o sistemas.

Los estudios realizados *in vitro* generalmente miden la producción de quistes a diferentes intervalos de tiempo ^{45, 49-51} y la cantidad de taquizoítos presentes en la fase líquida de los cultivos celulares ^{52, 53}. Por lo que para lograr una clasificación con base a este tipo de estudios, deben considerarse los siguientes parámetros de clasificación en el orden que presentan:

- a) Cantidad de quistes producidos: En este caso serán más virulentas aquellas poblaciones que generen una mayor cantidad de quistes.
- b) Día en que se observó la mayor cantidad de quistes, siendo más virulentas aquellas poblaciones que presentan la mayor cantidad de quistes en un tiempo menor.
- c) Día de inicio de parasitación.

Por lo que la población más virulenta será aquella que produzca una cantidad de quistes mayor en menos días y que el día de inicio de parasitación sea rápido.

Tomando en cuenta la cantidad de taquizoitos presentes en la fase líquida de los cultivos celulares serán más virulentas aquellas poblaciones que presenten la mayor cantidad de taquizoitos al menor tiempo, ya que los taquizoitos son los responsables de la fase aguda de la infección.

VI.3 Metodología para clasificar a *Entamoeba histolytica* en función de la virulencia.

Como ya se mencionó, *E. histolytica* es un parásito extracelular que principalmente infecta intestino y se puede diseminar a otros órganos. Dado su poder patogénico a base de enzimas histolíticas secretadas y fagocitosis, el protozoo se puede clasificar en función de la virulencia al tomar en cuenta:

- 1) mortalidad ocasionada a animales de experimentación como hámsters, jerbos y conejos.

Metástasis y lesiones al hígado, cerebro, pulmón u otro órgano cuya transportación del parásito, vía sanguínea partió del intestino.

Mortalidad:

Existen pocos estudios que se han enfocado a la mortalidad ocasionada al huésped, ⁵⁴ y han determinado el porcentaje de mortalidad y el día promedio de muerte. Éstos son dos parámetros que nos sirven para clasificar a las poblaciones de *E. histolytica* en función de la mortalidad y son más virulentas las poblaciones que ocasionan un mayor porcentaje de muertes, en menor tiempo.

Metástasis:

Metástasis es la migración de un organismo patógeno desde un órgano infectado a otro; la migración puede ser por vía linfática, por vía sanguínea o por continuidad. *E. histolytica* es un parásito que en muchas ocasiones provoca metástasis del intestino hacia el hígado ocasionando un absceso hepático amebiano. En pocos casos hay metástasis al pulmón y al cerebro.

La metástasis es observada por la presencia de abscesos en determinados órganos los que pueden ser en uno o estar involucrados varios órganos y los abscesos pueden ser de diferentes tamaños; por lo que para lograr una clasificación de las diversas poblaciones de *E.histolytica* en función de la metástasis. Debe considerarse el porcentaje de animales de experimentación con abscesos, la cantidad de abscesos por órgano, el número de órganos parasitados y el tipo de órganos parasitados.

a) Tipo de órganos parasitados.

El tipo de órganos parasitados es el parámetro de clasificación que debe considerarse en primer lugar; para ello, se ordenaron los sistemas más afectados en función de importancia clínica:

Sistema Nervioso Central	Sistema digestivo	Sistema inmunitario	Sistema respiratorio	Sistema urinario
--------------------------	-------------------	---------------------	----------------------	------------------

Más importante ←————— Menos importante

En el Sistema nervioso central el órgano más afectado es el cerebro, pocos casos se han reportado por abscesos en el cerebro⁵⁵ pero muchos han resultado fulminantes y otros con

perdidas de más del 60% de la memoria⁵⁵ por lo que hace que tenga una mayor importancia clínica. En el aparato digestivo el órgano de mayor importancia es el hígado ya que al presentarse abscesos amebianos en esta glándula, puede haber metástasis al pulmón, bazo, cerebro, etc. y ocasionar daños más severos; en cuanto al intestino grueso, éste es de menos importancia ya que la enfermedad puede ser detectada rápidamente al presentarse los síntomas clínicos y acabar con la infección rápido. En el sistema inmunitario, respiratorio y urinario, los órganos más afectados son el bazo, pulmón y riñón respectivamente.

b) Porcentaje de animales con abscesos.

El porcentaje de animales con abscesos se obtiene dividiendo la cantidad de animales en experimentación con abscesos, entre el número de animales inoculados. En este caso las poblaciones más virulentas son aquellas que presentan un mayor porcentaje de animales con abscesos.⁵⁶

c) Cantidad de abscesos por unidad de tiempo.

En este caso es más virulenta la población que presente una mayor cantidad de abscesos por unidad de tiempo.⁵⁶⁻⁶²

d) Número de órganos parasitados.

El número de órganos parasitados es el último parámetro de clasificación y son más virulentas las poblaciones que parasiten al mayor número de órganos.^{54 y 63}

La tabla cuatro resume los parámetros que deben ser empleados para la clasificación de las poblaciones de *E. histolytica*, y debe utilizarse en el orden presente.

Tabla IV.

Parámetros de clasificación basados en:	Parámetros de clasificación
Mortalidad	Porcentaje de muertes ocasionadas
	Día de muerte
Metástasis	Órgano o sistema parasitado
	Porcentaje de animales con abscesos
	Numero de abscesos por unidad de tiempo
	Número de órganos parasitados

Muchos estudios realizados *in vitro* tratan de observar el comportamiento patogénico de *E. histolytica*, dichos estudios aportan datos que pueden ser ordenados de tal manera que permitan la clasificación de las diferentes poblaciones del parásito.

Muchas funciones de *E. histolytica* son consideradas esenciales en la invasión patogénica e incluyen: actividades proteolíticas, adherencia a las células huésped y citólisis.⁶⁴

Para que *E. histolytica* inicie una infección sintomática, los trofozoitos deben penetrar al epitelio intestinal; para que penetren, primero debe presentarse un reconocimiento y adhesión a las células del tejido del huésped y después destrucción de las membranas celulares y digestión de la matriz extracelular,^{65, 66} estos dos últimos pasos involucran a la actividad proteolítica y por consiguiente la citólisis.

Para que las poblaciones de *E. histolytica* sean clasificadas deben ser ordenadas en primer lugar por la adherencia a las células huésped, en segundo lugar por las actividades proteolíticas y por último por la citólisis.

a) Adherencia a las células huésped:

La adhesión a la mucosa intestinal, epitelio y células inmunes incluyendo neutrófilos y macrófagos, es un paso esencial en la patogenicidad de *E. histolytica*.⁶⁷ La adhesión es reportada en porcentaje de adhesión, y son más virulentas aquellas poblaciones que presentan un porcentaje mayor de adhesión en un tiempo menor.^{61, 67-68}

b) Actividades proteolíticas:

E. histolytica es rica en varias enzimas incluyendo hidrolasas, lisosomasas, colagenasas, estereasas hialuronidasas, mucinasas y proteasas, estas últimas han sido descritas por ser responsables de la digestión de proteínas de la matriz extracelular. Las actividades proteolíticas son reportadas en unidades enzimáticas, las cuales expresan la cantidad necesaria de enzima para consumir un microgramo de substrato por minuto, por lo que las poblaciones que presenten un menor número de unidades enzimáticas son más virulentas.⁶²

y 66

c) Citólisis:

La citólisis es provocada por enzimas o productos citotóxicos liberados en el lumen por los trofozoitos. La lisis celular es cuantificada por porcentaje de células lisadas, y las poblaciones más virulentas lisan un número mayor de células en un tiempo menor.^{57, 56, 68 y 69}

VII. Discusión de resultados:

Analizando la virulencia de *T. cruzi* se puede decir que los parámetros que permiten determinar su poder patogénico son la parasitemia y la mortalidad ocasionada a ratones inoculados, y que el histotropismo sólo permite conocer la infectividad de una población del parásito, sin embargo la infectividad no necesariamente conduce a virulencia, ya que como se mencionó anteriormente (capítulo IV.4), esta última se refiere al grado de patogenicidad, es decir, al grado en que produce daño al huésped, e infectividad sólo se refiere a la capacidad de un microorganismo para establecerse y multiplicarse en un tejido aunque esto no conduzca a un daño del huésped. Lo que si se puede decir es que el histotropismo sólo indica que el huésped está infectado, y por ese hecho hay un riesgo en su salud. En cambio la parasitemia si es indicativa de daño, o vehículo que conduzca a daño del huésped ya que se refiere a presencia extracelular del parásito. ¿El porqué, pronostica daño su presencia en sangre? Es una cuestión que aún no se aclara, pero se puede dar el siguiente argumento:

Los antígenos liberados por el parásito en fase de tripomastigote después de la ruptura de la célula huésped y por la lisis de parásitos circulantes por el sistema inmune, son adsorbidos en las superficies de células no infectadas que despiertan una agresiva respuesta inmunológica contra células del huésped, destruyéndose células propias y liberando antígenos que pueden producir respuestas autoinmunes.^{70, 71}

La existencia de antígenos de reacción cruzada entre el parásito y las células del huésped que despiertan una respuesta autoinmune.

En pacientes con enfermedad de Chagas crónica se han demostrado autoanticuerpos anti-EVI (antígenos endoteliales, vasculares e intersticiales), anti-laminina, anti-tejido nervioso, anti-antígenos cardiacos como la miosina y la desminina.^{71,72, 73} También se han demostrado la presencia de células T autorreactivas que al transferirse a ratones no infectados, presentan reacciones autoinmunes de citotoxicidad en células del miocardio.⁷³

Quizá los mecanismos anteriores, sean los responsables de la virulencia de *T. cruzi* no obstante otros factores que sólo indiquen infectividad como serían: moléculas de reconocimiento por células del huésped que conduzcan a histotropismo, moléculas que actúan como señales de trasducción para el acercamiento a un determinado tejido, factores que favorecen su establecimiento intracelular y reproducción, entre otros.

En relación a *T. gondii*, la infección a un tejido pronostica una alta probabilidad de daño tisular; la explicación a esto es que mientras que *T. cruzi* se reproduce en 24 h, *T. gondii* lo hace en 4-8 h. lo que conducirá a necrosis tisular. En este sentido es importante determinar el histotropismo que presente una población del coccidio. La mayor parte de los estudios indican como primer parámetro para determinar la virulencia a la mortalidad, en segundo lugar al histotropismo, que principalmente se basa en la infección a tejidos del Sistema Nervioso Central y por último la parasitemia, sin embargo no con tanta importancia; la razón de esto último es que la parasitemia se presenta en breve lapso de la infección y en fase aguda; en cambio para *T. cruzi* la parasitemia es persistente hasta en cuatro meses para algunas cepas.

Entamoeba histolytica es un parásito extracelular cuya virulencia es manifestada en tejidos por abscesos, gracias a que liberan enzimas histolíticas y fagocitosis que realiza. Por lo que para clasificar las poblaciones en función de la virulencia, se necesita determinar la mortalidad y grado de metástasis. Esta última parte se refiere a la facilidad de desplazarse y establecerse en tejidos, sin embargo esto sólo indica infectividad, aunque en el caso de esta ameba, la infectividad conducirá forzosamente a daño tisular el cual se mide en la presencia o ausencia de abscesos, número de éstos y su tamaño. Por lo que al clasificar las poblaciones por su virulencia, se tienen que tomar en cuenta por prioridad:

- 1) mortalidad
- 2) Número de tejidos infectados
- 3) Número de abscesos en cada tejido
- 4) Tamaño de los mismos, o bien diferencia de cantidad de tejidos destruido por el protozoo.

De manera general se puede observar que, definitivamente, el primer parámetro que permite evaluar la virulencia de un parásito es la **mortalidad** que ocasiona a animales de experimentación. El segundo parámetro depende del mecanismo de patogenicidad de cada parásito, así, para *T. cruzi* es importante el **grado de parasitemia**; en *T. gondii* el **histotropismo**, en el que la magnitud, esta dada por la necrosis tisular dada por la rápida reproducción del protozoo. Aunque en *E. histolytica* también el histotropismo es el segundo parámetro para evaluar la virulencia, el mecanismo de patogenicidad es distinto: a base secreción de enzimas histolíticas.

De este modo, para evaluar la virulencia de un parásito, después de determinar la mortalidad que ocasiona, se mide el daño que produce dependiendo de su mecanismo patogénico. Lo anterior también se puede aplicar a otros parásitos.

Por ejemplo:

En *Plasmodium*, dado que el parásito es intracelular obligado como *T. gondii*, pero infecta a glóbulos rojos, la medición de la virulencia sería: en primer lugar midiendo la mortalidad en ratones, en segundo lugar midiendo el daño a glóbulos rojos y sus consecuencias: anemia, elevación térmica corporal, etc.

En el caso de *Leishmania*, dado que es un flagelado intracelular que se establece en tejido subcutáneo produciendo úlceras, su virulencia se mediría con: la mortalidad y al igual que *E. histolytica*, midiendo la cantidad y el tamaño de las úlceras, o bien las nodulaciones en las extremidades infectadas.

El problema se complica si queremos aplicarlo a helmintos, sin embargo hay que conocer su mecanismo de patogenicidad. Por ejemplo, en la cisticercosis, una población virulenta de *T. solium* sería: 1) aquella que produce una mayor cantidad de muertes al cerdo y 2) el histotropismo con el número y tamaño de cisticercos, ya que el daño a un huésped depende de estos tres factores.

De modo general, se tiene que pensar primeramente en el tipo de mecanismo patológico de un parásito y graduar la magnitud de los daños al huésped al conocer las causas que los producen en diferente grado de magnitud.

Los ectoparásitos también se pueden clasificar en función de su virulencia, al igual que los endoparásitos se pueden clasificar en primer lugar por la muerte que ocasionen, y en segundo lugar por la magnitud de las lesiones que produzcan. Por ejemplo, existen artrópodos cuya saliva es tan inmunogénica que produce reacciones de hipersensibilidad que conducen a eritemas, pápulas u otro tipo de lesión cutánea que difieren en tamaño e intensidad.

En el caso de artrópodos que producen toxinas, también podría graduarse su poder toxigénico por la muerte de animales de experimentación y lesiones como necrosis locales (en el caso de *Laxosceles*) o lesiones sistémicas como en el caso de los escorpiones cuyo veneno actúa a nivel de Sistema Nervioso.

VIII. Conclusiones

- ◆ Para clasificar a las diferentes poblaciones de *T. cruzi*, en primer lugar se debe considerar la mortalidad y en segundo lugar la parasitemia.
- ◆ En el caso de *T. cruzi*, el histotropismo sólo refleja la infectividad de las poblaciones por lo que no puede ser empleado para una clasificación en función de la virulencia.
- ◆ Los parámetros para la clasificación de *T. gondii* en función de la virulencia son la mortalidad, el histotropismo y la parasitemia.
- ◆ Las poblaciones de *E. histolytica* pueden ser clasificadas con base a la mortalidad y a la metástasis, indicando el número y el tamaño de abscesos , así como el tipo de órgano parasitado.
- ◆ Todos los parásitos pueden ser clasificados por la mortalidad que ocasionan y por el daño que producen en función de sus mecanismo patogénicos.
- ◆ Los ectoparásitos también pueden ser clasificados en función de la magnitud del daño que ocasionan a nivel local o sistémico, por causa de las toxinas que eliminan o secreciones salivales que producen.

Bibliografía:

- 1.- Tay, Zavala, J.; Velasco C. O.; Lara A. R.; y Gutiérrez Q. M. 1995. Quinta edición. Capítulo de Amibiasis, Toxoplasmosis y Pneumocistosis, y Tripanosomiasis. En: Parasitología médica. Editores Méndez. México.
- 2.- Markell, E. K.; Voge, M.; John, D.T. 1990. Sexta edición. Capítulo 3 y 5. En: Parasitología Médica. Editorial Interamericana Mc. Graw Hill. Madrid.
- 3.- Harold, W.B.; Franklin, A.N. 1991. Quinta edición. Capítulo 3. En: Parasitología clínica. Editorial Interamericana. México D.F.
- 4.- Wyler, D.1990. Chapter 8. Ravdin, J. I. Chapter 2. Pfefferkorn E. R.; Chapter 13. Brener Zigman and Krettli, A. U. In: Modern Parasite Biology. Cellular, Immunological, and Molecular Aspects. W.H. Freeman and Company. New York.
- 5.- Faust, E.C.; Russell, P. F. y Jung, R. C. 1984. Capítulo 10, 12 y 14. En: Parasitología Clínica. Salvat Editores. Barcelona.
- 6.- Goldsmith, R. and Heyneman D. 1989. Chapter 12. Botero, D.; Chapter 17. Frenkel J. K. And Chapter 14. Prata A. In: Tropical Medicine and Parasitology. Appleton and Lange. U.S.A.
- 7.- Thomas, C. C. 1986. Second Edition. In: General Parasitology. Academic Press. Inc. U.S.A.
- 8.- Atias, A. y Neghme,. 1993. Capítulo 30. Atias, A. y Werner, APT. En: Parasitología clínica, Volumen III Histoparasitosis y Hemoparasitosis.

- 9.- Wyler, D. J.; Agabian, ; Basch, F. P. 1993. Chapter 4, Cell Biology of *Trypanosoma cruzi* . Pereira , M. E. A.. W.H. Freeman and Company. New York.
- 10.- Plessmann, Camargo, E. 1964. Growth and Differentiation in *Trypanosoma cruzi*. Origin of metacyclic trypanosomes in liquid media. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo., 6(3):93-100.
- 11.- Velasco, C. O. y colaboradores. 1991. En: La enfermedad de Chagas, Una revisión histórica sucinta y parcial de lo que ocurre en México y en el mundo. Secretaría de salud, Dirección general de epidemiología. Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicas. " Dr. Manuel Martínez Báez " . Publicación Técnica del I.N.D.R.E. # 8 . México. D.F.
- 12.- Shofield, C. J. 1994. *Triatominae*, Biología y control . Eurocomunica publications. Zeneca.
- 13.- Meeting Reports. 1995. Chagas Disease-A Recent Meeting on Practical Aspects Applied Meeting of Chagas Disease 4-6 November 1993, Uberaba, Brazil. International Journal for Parasitology, 25(7):869-874.
- 14.- Cetron, M. S.; Basilio, F.P.; Moraes, A. P.; Sousa, A. Q.; et. al.1993. Humoral and cellular immune response af adults from Northeastern Brazil with chronic *Trypanosoma cruzi* infection: Depressed cellular immune response to *T. cruzi* antigen among Chagas' disease patients with symptomatic versus indeterminate infection.Am. J. Trop. Med. Hyg.,49(3):370-382.
- 15.- Brener, Z. 1971. Life cycle of *Trypanosoma cruzi*. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo., 13(3):171-178.

- 16.- Zingales, B. and Colli, W. 1985. *Trypanosoma cruzi*: Interaction with Host Cells. In: Current Topics in Microbiology and Immunology, Vol. 117. Spinger-Verlag Berlin-Heidelberg, Sao Paulo, Brazil.
- 17.- Brener, Zigman. 1973. Biology of *Trypanosoma cruzi*. Departamento de parasitología, I.C.B., Universidade Federal de Minas Gerais and Instituto de Endemias Rurais, Belo Horizonte, Brasil.
- 18.- Smyth, J. D. 1962. Introduction to Animal Parasitology. The english universities press LTD. U.S.A.
- 19.- Petry, K. And Eisen, H. 1989. Chagas Disease: A Model for the Study of Autoimmune Diseases. Parasotology Today,. 5(4):111-116.
- 20.- Hudson, L. 1981. Immunobiology of *Trypanosoma cruzi* infection and Chagas's disease. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene,.75(4):493-498.
- 21.- Bua, J. E.; Bontempi, E. J.; Ruíz, A. M. y Segura, E. L. 1990. Antígenos en *Trypanosoma cruzi* . Rev. Arg. Microbiol.; 22:47-66.
- 22.- Pumarola, A.; Rodríguez Torres, A.; García Rodríguez, J. A.; Piedrola, Angulo, G.1994. Segunda edición. En: Microbiología y parasitología médica. Ediciones científicas y técnicas, S.A. Salvat medicina. Barcelona España.
- 23.- Sherris, J. C. 1993. Introducción a las enfermedades infecciosas. En: Microbiología médica. Ediciones Doyma. Barcelona España.
- 24.- Joklik, Wolfgang, K.; Willett, H. P.; Wilfert, C.M.; Amos D.B. 1995. 20ª edición. Microbiología de Zinsser. Editorial médica panamericana. Buenos Aires.

- 25.- Bernanrd, D. D.; Dulbecco, R.; Eisen, H. N.; Ginsberg, H. S.; y colaboradores. 1985.3ª edición. Tratado de microbiología con inclusión de inmunología y genética molecular. Salvat editores. Barcelona.
- 26.- Freeman, Bob, A. 1985. 22ª edición. En: Microbiología de Burrows. Editorial Interamericana Mc. Graw Hill. México. D.F.
- 27.- Lima, M. T.; Jansen, A. M.; Rondinelli, E. & Gattass, C. R. 1990. *Trypanosoma cruzi*: properties of a clone isolated from CL strain.
- 28.- Lauria-Pires, L. & Teixeira, A.R.L. 1996. Virulence and pathogenicity associated with diversity of *Trypanosoma cruzi* stocks and clones derived from Chagas' disease patients. Am. J. Trop. Med. Hyg., 55(3): 304-310.
- 29.- Postan, M.; Dvorak, J. A. & McDaniel, J.P. 1983. Studies of *Trypanosoma cruzi* clones in Inbred Mice. Am. J. Trop. Med. Hyg., 32(3): 497-506.
- 30.- González, J.; Muñoz, S.; Ortiz, S.; Anacona, D.; et. al. 1995. Biochemical, Immunological, and Biological Characterization of *Trypanosoma cruzi* Populations of the Andean North of Chile. Experimental Parasitology. 81:125-135.
- 31.- Bice, D. E. & Zeledon, R. 1970. Comparison of Infectivity of stains of *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909). J. Parasitol., 56(4): 663-670.
- 32.- Melo, R.C. & Brener, Z. 1978. Tissue Tropism of Different *Trypanosoma cruzi* strains. J. Parasitol., 64(3):475-482.
- 33.- Añache, J. M.; Devissaguet, J.; Guyot-Hermann, A.M. 1989. Cap.2 . En: Biofarmacia.

Technique el documentation. París Francia.

34.- Ross, M. H.; Reith, E. J.; Romrell, L. J. 1992. 2ª edición. En: Histología. Texto y Atlas Color. Editorial médica paramericana. México D. F.

35.- Schmidt, R. F. y Thews, G. 1993. 24ª edición. En: Fisiología humana. Editorial Interamericana Mc. Graw Hill. Madrid España.

36.- Gazzinelli, R. T.; Hakim, F. T.; Hieny, S.; Shearer, G. M. and Sher, A. 1991. Synergistic role of CD4⁺ and CD8⁺ T Lymphocytes in IFN- gamma production and protective immunity induced by Attenuated *Toxoplasma gondii* vaccine. The Journal of Immunology. 146:286-92.

37.- Ferguson, D. J. P. and Hutchison, W. M. 1987. An ultrastructural study of the early development and tissue cyst formation of *Toxoplasma gondii* in the brains of mice. Parasitol Res. 73: 483-91.

38.- Frenkel, J. K.; Pfefferkorn, E. R.; Smith, D. D. and Fishback, J. L. 1991. Prospective vaccine prepared from a new mutant of *Toxoplasma gondii* for use in cats. American Journal of Veterinary Research, 52(5): 759-63.

39.- Sims, T. A.; Hay, J. And Talbot, I. C. 1988. Host-parasite relationship in the brains of mice with congenital toxoplasmosis. Journal of Pathology. 156: 255-61.

40.- Buxton, D. and Innes, E. A. 1995. A commercial vaccine for ovine toxoplasmosis. Parasitology 110: S11- S16.

41.- Ferguson, D. J. P.; Hutchison, W. M. and Pettersen, E. 1989. Tissue cyst rupture in mice chronically infected with *Toxoplasma gondii*. Parasitol Res. 75: 599-603.

- 42.- Carrof, B.; Levacher-clergeot, M.; Chau, F.; Pocidalo, J. et. al. 1994. *Toxoplasma gondii*: Kinetics of Lymphocyte Subsets in Blood and Spleen of Perorally Infected Mice. *Experimental Parasitology* . 78:410-17.
- 43.-Kaneto, C. N.; Costa, A. J.; Paulillo, A. C.; Moraes, F. R. et. al. 1997. Experimental Toxoplasmosis in broiler chicks. *Vet. Parasitol.* 69(3-4): 203-10.
- 44.- Elwell, M. R. & Frenkel, J. K. 1983. Immunity to Toxoplasmosis in hamsters. *Am. J. Vet. Res.* 45(12): 2668-2674.
- 45.- Shimada, K.; O'connor, R. & Yoneda, Ch. 1974. Cyst Formation by *Toxoplasma gondii* (RH Strain) *in vitro*. *Arch Ophthalmol.* 92:496-500.
- 46.- Ferguson, D. J. P.; Hutchison, W. M. & Pettersen, E. 1989. Tissue cyst rupture in mice chronically infected with *Toxoplasma gondii*. *Parasitol Res.* 75: 599-603.
- 47.- Frenkel, J. K. & Escajadillo, A. 1987. Cyst rupture as a Pathogenic mechanism of Toxoplasmic Encephalitis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 36(3):517-522.
- 48.- Cornelissen, A. W. C. A.; Overdulve, J. P. & Hoenderboom, J. M. 1980. Separation of *Isospora* (*Toxoplasma*) *gondii* cyst and cystozoites from mouse brain tissue by continuous density-gradient centrifugation. *Parasitology.* 83: 103-108.
- 49.- Hoff, R. L.; Dubey, J. P.; Behbehani, A. M. & Frenkel, J. K. 1977. *Toxoplasma gondii* Cyst in Cell Culture: New Biologic Evidence. *The Journal of Parasitology.* 63(4): 1121-24.
- 50.- Lindsay, D. S.; Dubey, J. P.; Biagburn, B. L. & Toivio-Kinnucan, M. 1991. Examination of Tissue Cyst Formation by *Toxoplasma gondii* in Cell Cultures Using Bradizoites, Tachizoites, and Sporozoites. *J. Parasitol.* 77(1): 126-32.

- 51.- Jones, T. C.; Bienz, K. A. & Erb, P. 1985. *In vitro* Cultivation of *Toxoplasma gondii* Cyst in Astrocytes in the Presence of Gamma Interferon. *Infect. Immun.* 51: 147-56.
- 52.- Canessa, A.; Pistoia, V.; Roncella, S.; Merli, A. et. al. 1988. An *In vitro* model for *Toxoplasma* Infection in man. *The Journal of Immunology* . 140 (10): 3580-88.
- 53.- Soète, M.; Camus, D. & Dubremetz, J. F. 1994. Experimental Induction of Bradyzoite-Specific Antigen Expression and Cyst Formation by the RH Strain of *Toxoplasma gondii* *in vitro*. *Experimental Parasitology*. 78:361-70.
- 54.- Tobie, J. E. 1949. Experimental infection of the rabbit with *Entamoeba histolytica*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 29:859-870.
- 55.- Ohnishi, K.; Murata, M.; Kojima, H.; Takemura, N.; et. al. 1994. Brain Abscess Due to Infection with *Entamoeba histolytica*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 51(2): 180-2.
- 56.- Bos, H. J.; Van de Griend, R. J. 1977. Virulence and toxicity of axenic *Entamoeba histolytica*. *Nature* Vol. 265 January 27 pp. 341-43
- 57.- Chadee, K. & Meerovitch, E. 1985. *Entamoeba histolytica*: Early progressive pathology in the cecum of the Gerbil (*Meriones Unguiculatus*). *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 34(2) pp. 283-291.
- 58.- Zhang, T.; Cieslak, P.; & Stanley, S. L. 1994. Protection of Gerbils from Amebic Liver Abscess by Immunization with a recombinant *Entamoeba histolytica* Antigen.
- 59.- Zhang, T. & Stanley, S. L. 1994. Protection of Gerbils from amebic Liver Abscess by Immunization with a recombinant Protein Derived from the 170 Kilodalton Surface Adhesin of *E. histolytica*. *Infection and Immunity*, June P: 2605-8.

- 60.- Sherchand, J. B.; Thammapalerd, N.; Riganti, M. et. al. 1994. Monoclonal antibody based immunohistochemical demonstration of *Entamoeba histolytica* in liver tissues of Experimentally infected hamster (*Mesocricetus Auratus*). *Int. J. for Parasitol.* 24 (6): 909-916.
- 61.-Stanley, S.; Blanchard, J. L. Johnson, N.; Foster, L.; et. al. 1995. Immunogenicity of the recombinant serine rich *Entamoeba histolytica* protein (SREHP) amebiasis vaccine in the African Green Monkey. *Vaccine* 13(10):947-55.
- 62.- Takeuchi, A. & Phillips, B. P. 1975. Electron microscope studies of Experimental *Entamoeba histolytica* Infection in the Guinea Pig1. Penetration of the Intestinal Ephilium by Trophozoites. *The Amer. J. of Trop. Med. And Hyg.* 24(1):34-47.
- 63.- Ghadirian, E. & Meerovitch, E. 1977. Behavior of Axenic IP-106 Strain of *Entamoeba histolytica* in the golden Hamster. *The Am. J. of Trop. Med. And Hyg.* 27(2):241-6.
- 64.- Föster, B.; Ebert, F.; & Horstmann, R. D. 1994. Complement sensivity of *Entamoeba histolytica* and various nonpathogenic amoeba species. *Trop. Med. Parasitol.* 45: 355-6.
- 65.- Eckmann, L.; Reed, S. L.; Smith, J. R. & Kagnoff, M. F. 1995. *Entamoeba histolytica* Trophozoites Induce an Inflammatory Cytokine Response by Cultured Human Cells Through the Paracrine Action of Citolytically Released Interleukin-1 alfa. *The Am. Soc. For Clin. Inv.* 96:1269-79.
- 66.- Scholze, H. & Tannich, E. 1994. [35] Cysteine Endopeptidases of *Entamoeba histolytica*. *Methods in Enzimology.* Vol 244:512-23.

- 67.- Kain, K. C. & Ravdin J. I. 1995. [35] Galactose-specific Adhesion Mechanisms of *Entamoeba histolytica*: Model for study of Enteric Pathogens. *Methods in Enzimology*. Vol 253:424-439.
- 68.- McCoy, J.; Mann, B. J. & Petri W. A. 1994. Adherence and Citotoxicity of *Entamoeba histolytica* or How Lectins let Parasites Stick Around. *Infection and Immunity*. Aug.: 3045-50.
- 69.- González, R. A.; Haque, R.; Rehman, T; Aguirre, A ;, et. al. 1994. Diagnosis of Amebic Dysentery by Detection of *Entamoeba histolytica* Fecal Antigen by an Invasive Strain-Specific, Monoclonal Antibody-Based Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *J. of Clin. Microbiol.* Apr:964-70.
- 70.- Miles, M. A. 1983. The Epidemiology of South American Trypanosomiasis- Biochemical and Immunological Approaches and their Relevance to Control. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 77:5-23.
- 71.- Hudson, L & Britten, V. 1985. Immune Response to South American Trypanosomiasis and its Relationship to Chagas' Disease. *British. Med. Bull.* 41:175-180.
- 72.- Tanowitz, H. B.; Kirchoff, L. V.; Simon, D.; Morris, S. A.; et. al. 1992. Chagas' Disease. *Clin. Microbio. Rev.* 5:400-19
- 73.- Santos-Buch, A, & Acosta, A. 1992. Pathology of Chagas' Disease. En: Tizarol, I. (Ed). *Immunology and Pathogenesis of Trypanosomiasis*. C.R.C. Press, U.S.A. pp 149-183