aak7770

TESIS
ED993
V4

UNIVERSIDAD CATOLICA ANDRES BELLO
FACULTAD DE HUMANIDADES Y EDUCACION
ESCUELA DE EDUCACION

INVESTIGACIONES SOBRE LA INFLUENCIA DE LA ESPECIE DEL MAMIFERO EN LA INFECCION EXPERIMENTAL POR *Trypanosoma cruzi*

Universidad Católica Andrés Bello
BIBLIOTECA
Caracas

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO PRESENTADO
POR LA Br. FLOR MINERVA VERGEL
CARACAS, **MAYO** DE 1993

INVESTIGACIONES SOBRE LA INFLUENCIA DE LA ESPECIE DEL MAMIFERO EN LA INFECCION EXPERIMENTAL POR TRYPANOSOMA CRUZI

TRABAJO DE INVESTIGACION PRESENTADO

P O R

Br. FLOR MINERVA VERGEL

TUTOR: Dr. SERVIO URDANETA MORALES

A LA

ESCUELA DE EDUCACION, ESPECIALIDAD CIENCIAS BIOLOGICAS

COMO UN REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER

EL TITULO DE

LICENCIADA EN EDUCACION, MENCION CIENCIAS BIOLOGICAS

UNIVERSIDAD CATOLICA ANDRES BELLO

CARACAS

Mayo , 1993

- Pitella, H.J.E. 1991: Central nervous system involvement in experimental Trypanosoma cruzi. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Río de Janeiro, **86**: 141 - 145.

- Pittella, J.E.H.; Meneguette, C.; Barbosa,A.J.A. & Bambirra, E.A. 1990: Histopathological and immunohistochemical study of the brain in the acute and chronic phases of experimental Trypanosoma cruzi in dogs. Ann. Trop. Med. Parasitol., **84**: 615 - 621.

- Postan, M.; Dvorak, J.A. & Mc Daniel, J.P., 1983: Studies of Trypanosoma cruzi clones in inbred mice. I. A comparison of the course of infection of C3H/HEN^{-} mice with two clones isolated from a common source. Am J. Trop. Med. Hyg., **32**: 497-506.

- Revelli, S.; Moreno, H.; Berra, H.; Valenti, J. L.; Nocito, A. L.; Amerio N. & Morini, J.C. 1987: Influencia de la edad de la rata en la evolución de la infección con Trypanosoma cruzi. Médicina, Buenos Aires, **47**: 360-366.

- Ryckman, R.E. 1954: A method of collecting large quantities of feces from Triatominae infected with Trypanosoma cruzi. J. Econ. Entomol., **47**: 170 - 171.

- Sampson-Ward, L. & Urdaneta-Morales, S. 1988: Urban Trypanosoma cruzi:Biological characterization of isolates from Panstrongylus geniculatus. Ann. Soc. Belge. Med. Trop., **68**: 95 - 106.

- Scorza,C. & Scorza, J.V. 1972: Acute miocarditis in rats inoculated with Trypanosoma cruzi,: Study of animals sacrified between the fourth and twenty- nineth day after inoculation. Rev. Inst. Med.Trop. São Paulo, **14** : 171 - 177.

- Sherlock, I.A. 1979: Vetores. **En**:Trypanosoma cruzi e Doenca de Chagas (Eds. Brener, Z. & Andrade, Z.A.) pp. 42-88, Guanabara Koogan, Brasil.

- Segura,E. 1992: New initiative will halt Chagas's disease in six years, says Argentine health official. T.D.R. News., **Agosto:** pp. 3-5.

- Silva, L.H.P. & Nussenzweig, V. 1953: Sobre una cepa de Trypanosoma cruzi altamente virulenta para o camundongo branco. Folha Clin. Biol., **20**: 191-208.

- Tibayrenc, M. & Ayala, F.J. 1988: Isoenzyme variability in

Trypanosoma cruzi, the agent of Chagas's disease: genetical, taxonomical, and epidemiological significance. Evolution, **42**: 277 - 292.

- Urdaneta-Morales, S. 1983: Pleomorphism in trypomastogotes of Trypanosoma cruzi from blood and cell culture. Tropenmed. Parasitol., **34**: 225 - 228.

- Urdaneta-Morales, S. & McLure, I. 1981: Experimental infections in Venezuela lizards by Trypanosoma cruzi. Acta Trop.,**38**: 99 - 105.

- Urdaneta-Morales, S. & Rueda. G.I. 1977: A comparative study of the behavior of Venezuelan and Brazilian strains of Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi en the venezuelan invertebrate host (Rhodnius prolixus). Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, **19**: 241 - 250.

- Vianna, G.D. 1911: Contribuicao para o estudo da anatomia patológica da molestia de Carlos Chagas. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 3: 176 - 294.

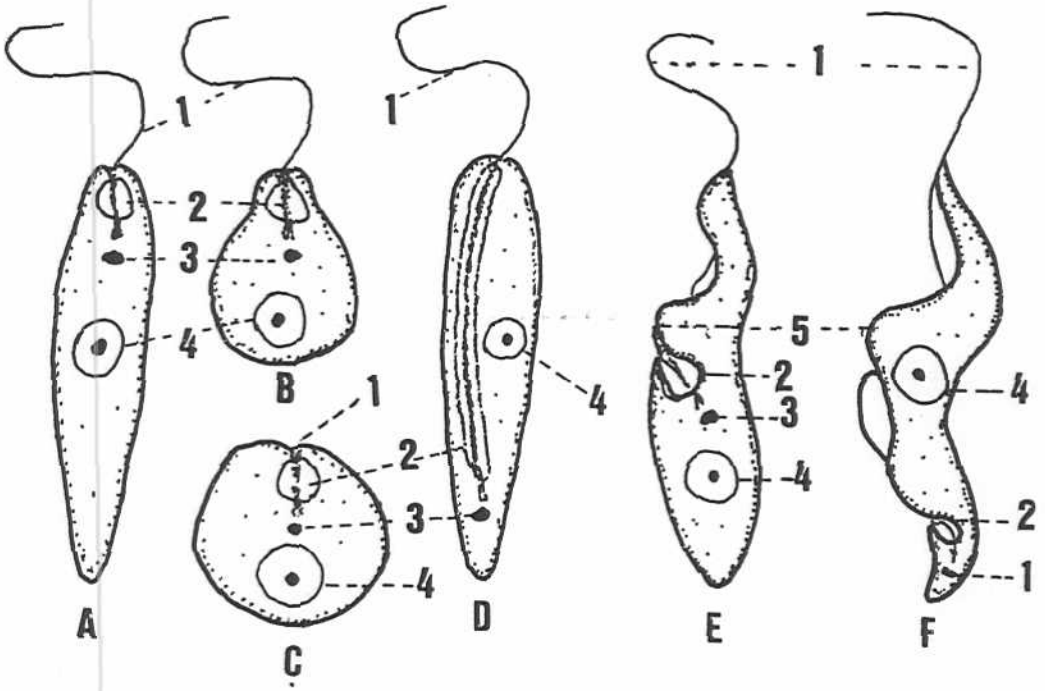


Figura No. 2. Diagramas de estadios representativos del polimorfismo de la familia Trypanosomatidae.

A.- Promastigote; B.- Coanomastigote; C.- Amastigote; D.- Opisthomastigote; E.- Epimastogote; F.- Tripomastigote.

(Tomado de McGhee & Cosgrove, 1980)

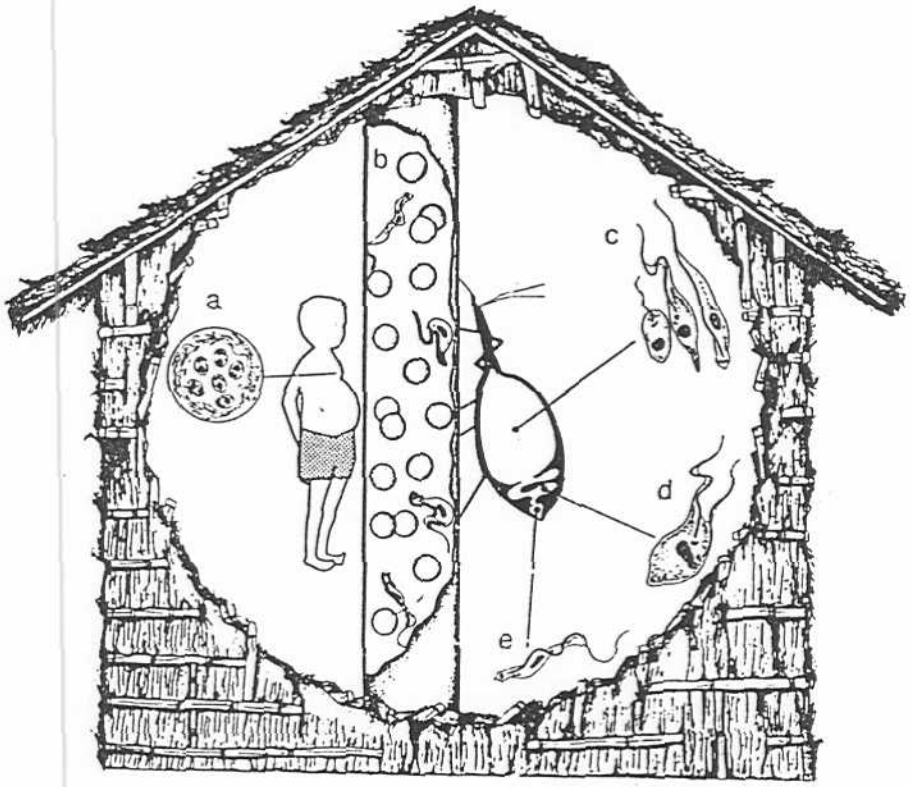


Figura No. 3. Ciclo doméstico del **Trypanosoma cruzi.**

a.- pseudoquiste con amastigotes en corazón del humano; b.- tripomastigote sanguícola en un vaso sanguíneo del humano; c.- estadios flagelados en el instestino anterior del chipo; d.- multiplicación de estadio epimastigote; e.- metacíclico en el intestino medio y posterior del chipo, respectivamente.

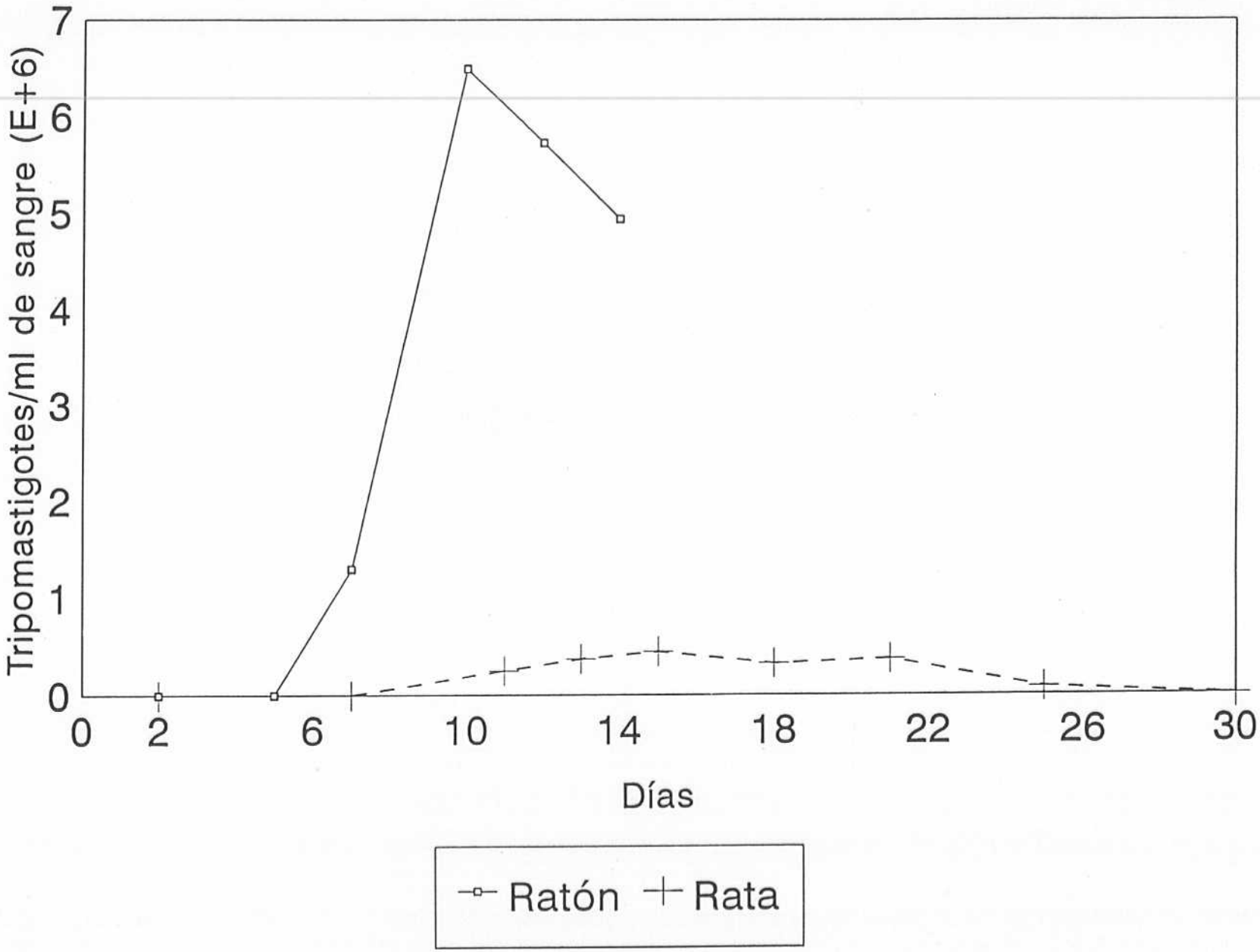
(Tomado de García y Azambuja, 1991).

G R A F I C O S

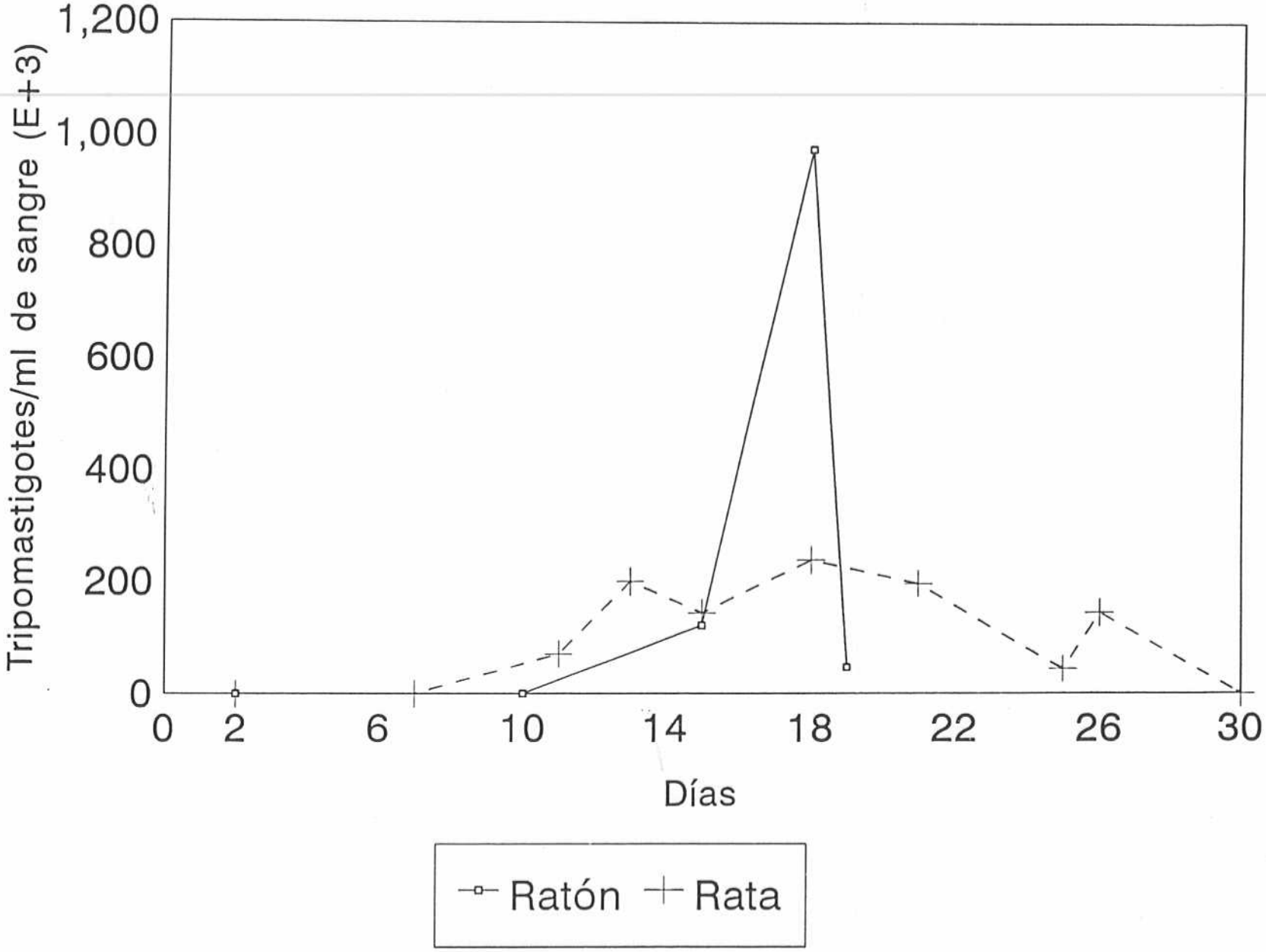
- Parasitemias por **Trypanosoma cruzi** producidas en ratones y ratas experimentalmente infectados por las cepas "Trujillo", "Turumo" y "Y", respectivamente (**Gráficos Nos. 1, 2 y 3**).

($E + 6 = 10^6$; $E + 3 = 10^3$).

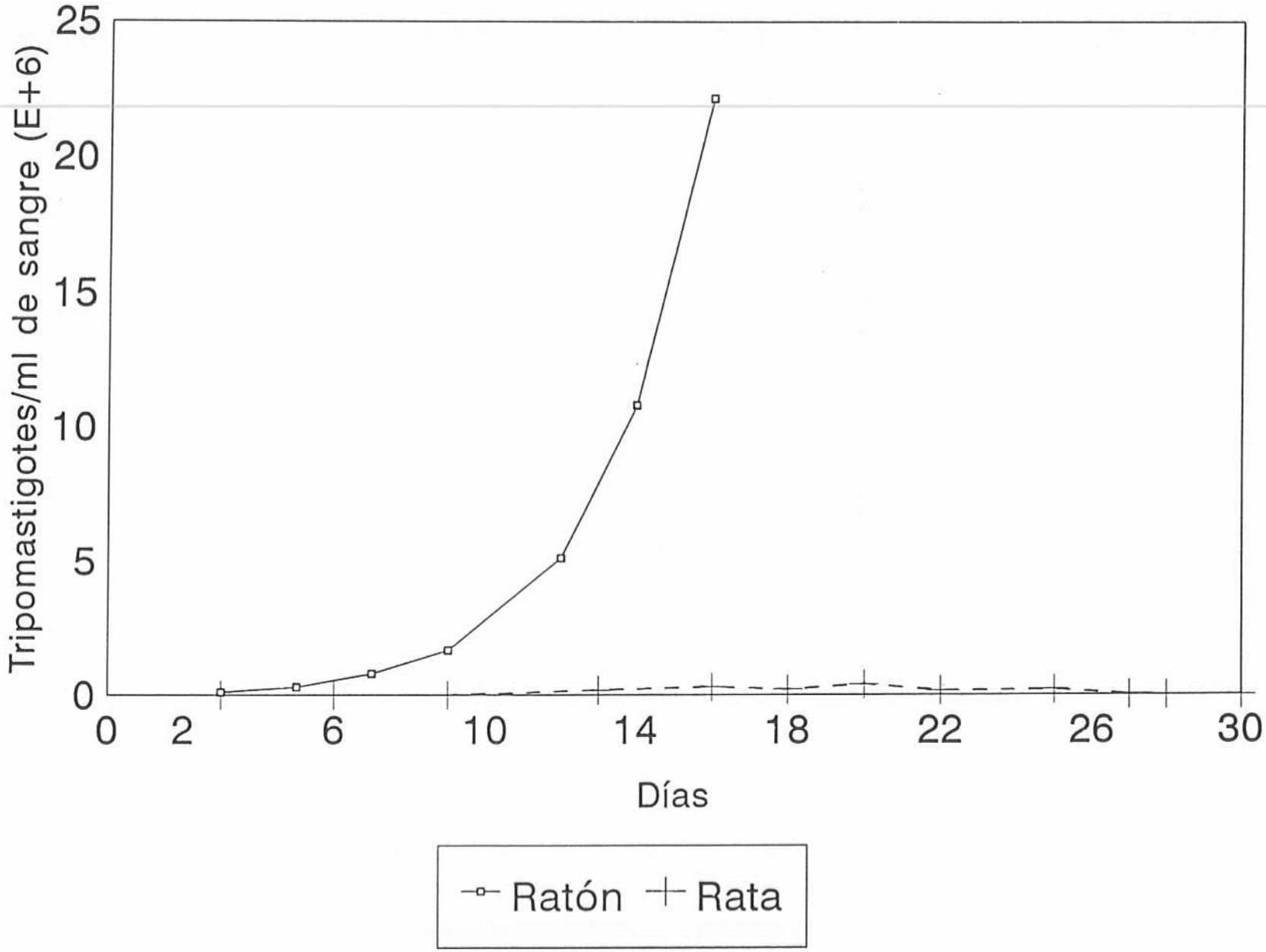
Parasitemia T. cruzi Cepa Trujillo



Parasitemia T. cruzi Cepa Turumo

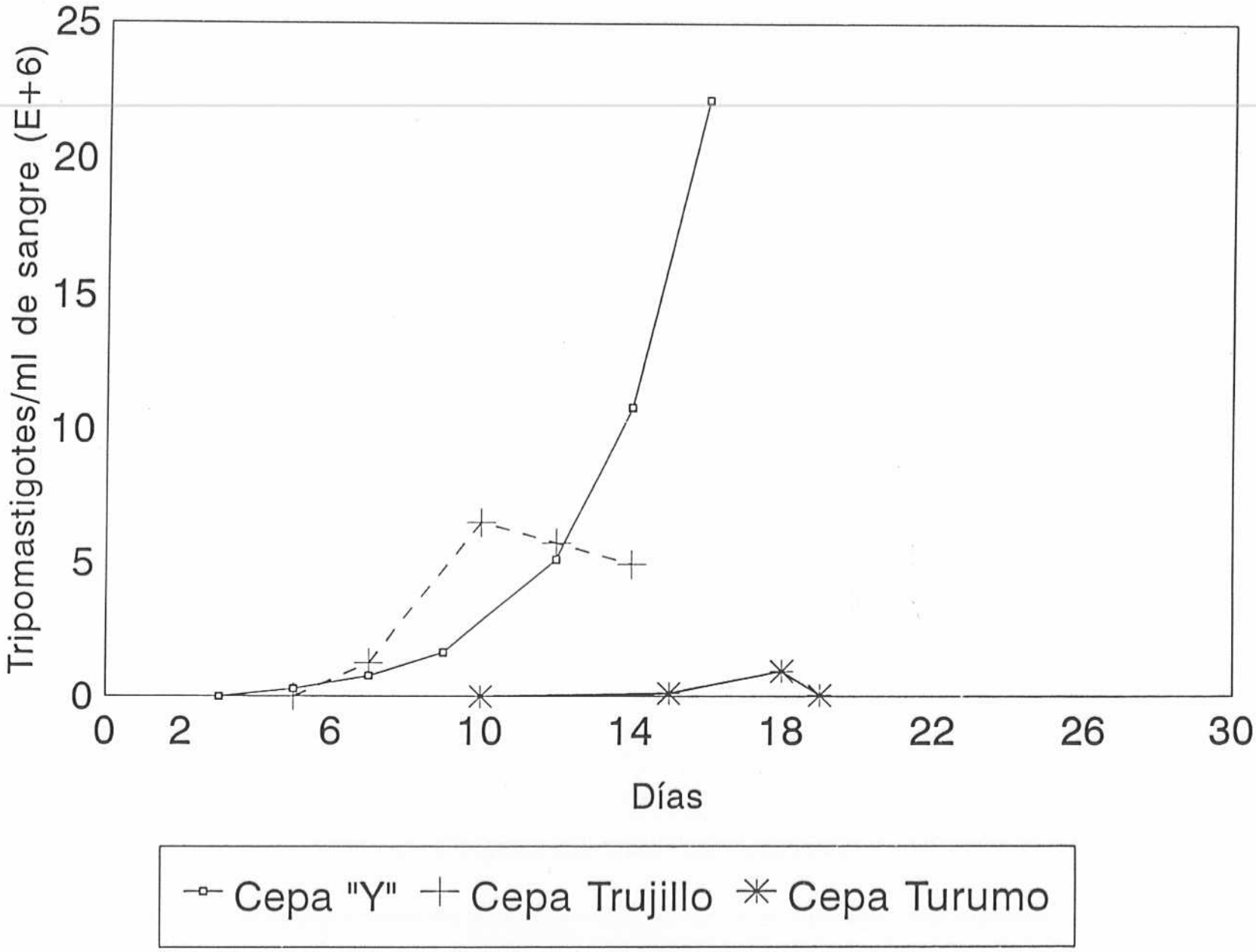


Parasitemia T. cruzi Cepa Y



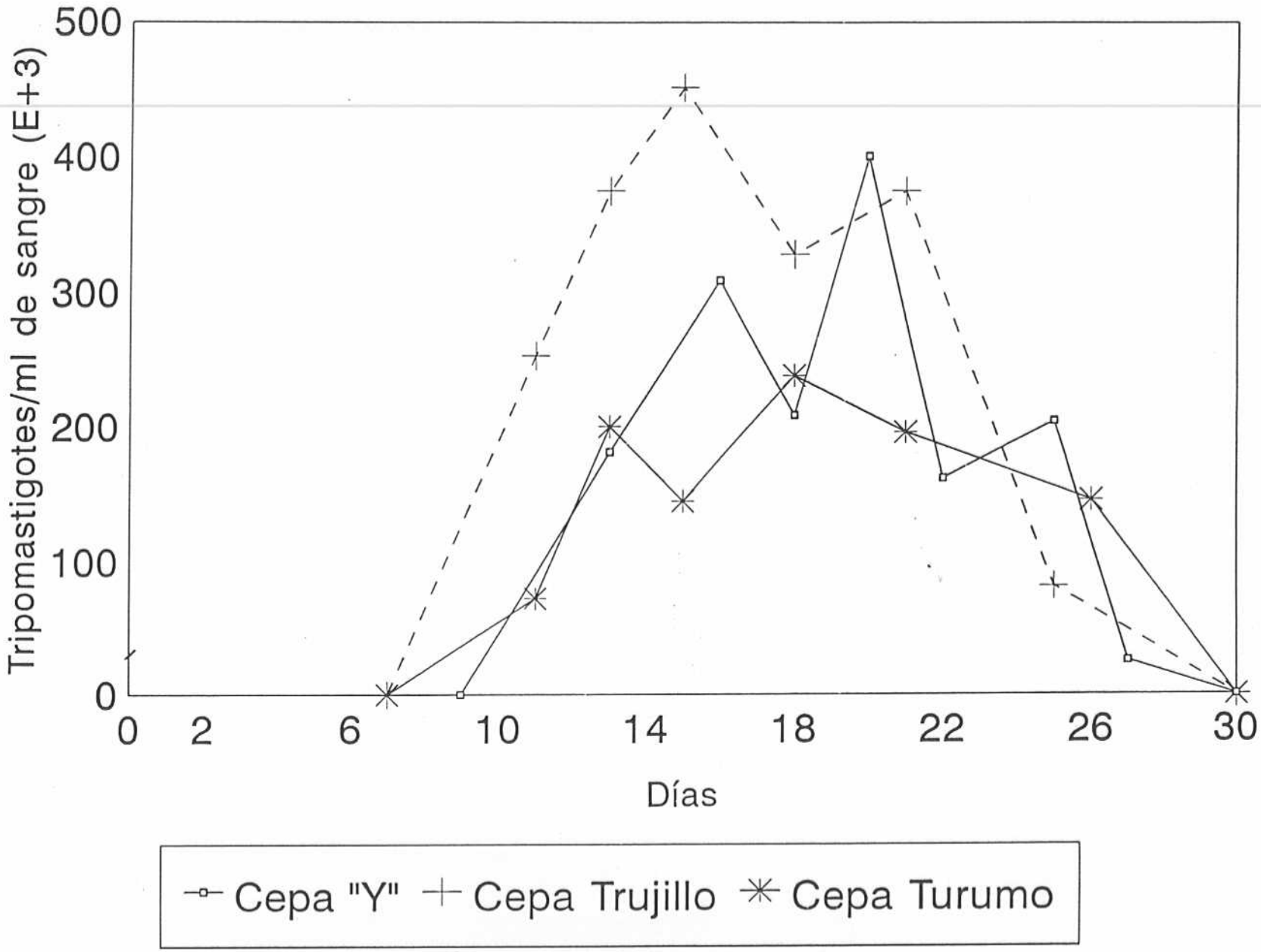
- Parasitemias por **Trypanosoma cruzi** producidas en ratones infectados por las tres cepas en estudio (**Gráfico No. 4**).

Parasitemia T. cruzi Ratón

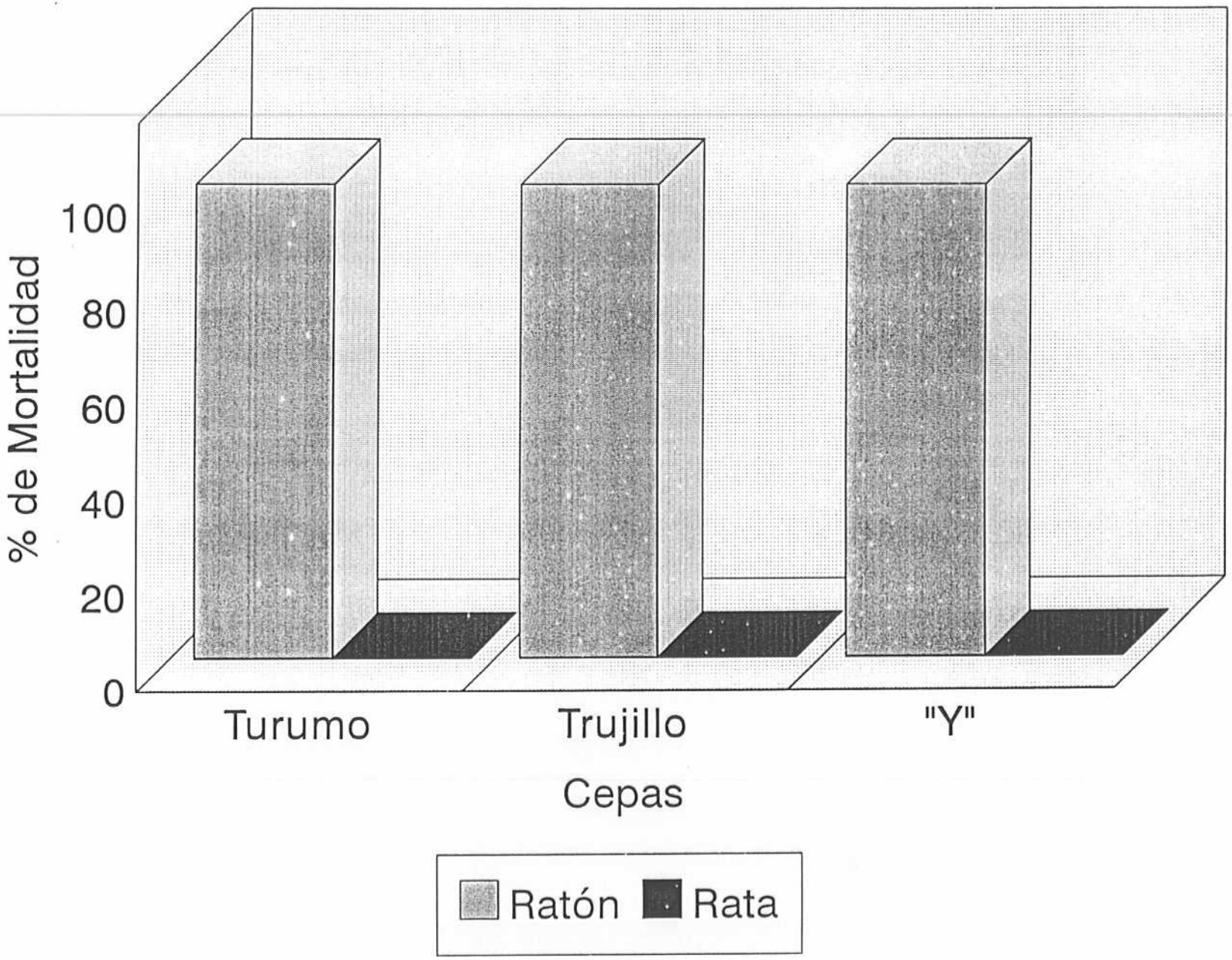


- Parasitemias por **Trypanosoma cruzi** producidas en ratas infectadas por las tres cepas en estudio (**Gráfico No. 5**).

Parasitemia T. cruzi Rata



Mortalidad de mamíferos infectados experimentalmente



T A B L A S

TABLA # 1

Parasitismo Tisular por T. cruzi en Rata

Organos y Visceras / Cepa	Corazón	Pulmón	Intestino Grueso	Intestino Delgado	Bazo	Hìgado	Mùsculo Esquelètico
"Trujillo"	+	—	—	—	—	—	—*
"Turumo"	+	—	—	—	—	—	+
" Y "	+	—	—	—	—	—	+

+= Escaso

—= Ausente

*= Infiltrado celular sin paràsitos

TABLA # 2

Parasitismo Tisular por T. cruzi en Ratón

Organos y Vísceras / Cepa	Corazón	Pulmón	Intestino Grueso	Intestino Delgado	Bazo	Hígado	Músculo Esquelético
"Trujillo"	++	+	++	+	–	–	++
"Turumo"	++	–	+	–	–	+	+
" Y "	+++	+	–	++	+	+	+++

+= Escaso

++= Abundante

+++= Intenso

–= Ausente

A mis hijas Jasinka y Julimar, por su especial confraternidad, amor y apoyo demostrado en todo momento.

AGRADECIMIENTOS

- Al DR. SERVIO URDANETA MORALES, por su constante dedicación, apoyo y esmero en la tutoría del presente trabajo.

- A la Lic. LEIDI HERRERA C, por sus buenos consejos y desinteresada ayuda.

- A la Sra. ESTEFANIA FLORES, por su aporte en la elaboración del trabajo histológico.

- Al Sr. IAN McCLURE, por su asitencia en el manejo de los insectos y cuido de animales.

- A la Sra. ANTONIA DELGADO, por su valiosa asistencia técnica.

- A todas las personas que han colaborado en la realización del presente trabajo, **MUCHAS GRACIAS.**

- Al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de Universidad Central de Venezuela por la ayuda económica que se nos prestó a través del proyecto No. C-03-31-1926-91 del Dr. Servio Urdaneta Morales.

!MI PROFUNDA GRATITUD!

RESUMEN

El Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi Chagas, 1909 protozoario hemoflagelado ubicado en la familia Trypanosomatidae, es el agente etiológico de la tripanosomiasis americana, conocida como la enfermedad de Chaga. Este parásito utiliza mamíferos exclusivamente americanos e insectos Hemiptera (Reduviidae, Triatominae) comúnmente llamados chipos, para desarrollar su complejo ciclo de vida, y debido a esta propiedad se le considera un flagelado heteroxénico.

Los hospedadores mamíferos entre los cuales se incluye al ser humano, pertenecen a siete órdenes cuyos representantes utilizan una variedad de habitats silvestres y domésticos. Estos reservorios al asociarse con triatominos que proliferan en tales habitats, mantienen focos de la parasitosis en una extensa área geográfica que se extiende desde el sur de los E.E.U.U. hasta el norte de Argentina, incluyendo las islas del Caribe y coincidiendo con la distribución de los insectos vectores. En Venezuela, esta parasitosis ha alcanzado niveles endémicos en una superficie de 750.000 Km^2, representativa de las tres cuartas partes de la extensión geográfica del país, por lo cual está enfermedad se considera un grave problema de salud pública.

El curso de esta infección es influído por parámetros propios de las poblaciones del parásito, así como por características inherentes a los hospedadores vertebrados y a los vectores. Por ello se presentan variaciones notables en relación con las diferentes fases de la parasitosis, a saber: período pre-patente, modalidades en las fases agudas y crónica, así como en los grados de mortalidad y del tropismo tisular producidos en el mamífero.

Este parasitismo ha sido investigado utilizando un número elevado de cepas del protozoario asi como de especies de mamíferos experimentales. Estos estudios han sido realizados, sin embargo, en la mayoría de los casos, caracterizando el comportamiento de una determinada cepa del parásito en un determinado hospedador; estudios comparativos con diferentes hospedadores son necesarios. Por ello en este trabajo nos propusimos realizar investigaciones sobre la influencia de la especie del mamífero en la infección experimental por T. cruzi, en las cuales se determinaron y analizaron las diferencias presentadas en paralelo con relación a la parasitosis sanguícola, porcentaje de mortalidad, tropismo tisular y virulencia provocadas por tres cepas aisladas de diferentes fuentes (humano, reservorio y vector) en dos especies de animales de laboratorio (ratón - cepa NMRI; rata -cepa Winstar).

Estas investigaciones permitieron determinar que el hospedador vertebrado modula el comportamiento de la infeccón por T. cruzi, ya que, independientemente de la cepa del parásito,en el ratón se desarrollaron parasitemias de niveles altos (x 10^6), la mortalidad fue del 100% con elevada invasión tisular. En comparación, en los lotes de las ratas los niveles de parasitismo sanguícola y tisular fueron muy bajos y no se presentó mortalidad en ningún grupo infectado, pasando a la fase crónica de la infección.

INDICE

		Página
	DEDICATORIA	ii
	AGRADECIMIENTOS	iii
	RESUMEN	iv
I.-	INTRODUCION	1
II.-	HIPOTESIS Y OBJETIVOS	8
III.-	MATERIALES Y METODOS	13
-	Aislamiento de los parásitos	13
-	Mantenimiento de las cepas	14
-	Infección de los mamíferos experimentales	16
-	Estudio de las parasitemias	16
-	Determinación de la mortalidad	17
-	Estudio del tropismo tisular	17
IV.-	RESULTADOS	19
-	Parasitemias obtenidas con las cepas aisladas	20
-	Mortalidad	24
-	Tropismo tisular	24
V.-	DISCUSION	25
VI.-	CONCLUSIONES	35
VII.-	BIBLIOGRAFIA	37

Página

VIII.- ANEXOS:

- Figuras 49
- Gráficos 53
- Tablas 64
- Microfotografías 68

INTRODUCCION

El *Trypanosoma cruzi* es un protozoario hemoflagelado ubicado en la familia Tripanosomatidae, por poseer un solo flagelo, del orden Kinetoplastida porque característicamente autoreplica el ADN no solo en el núcleo sino en una organela propia de estos flagelados, el kinetoplasto, el cual está relacionado íntimamente con su aparato mitocondrial (Fig. 1).

El *T. cruzi* es un miembro de los tripanosomatídeos considerados superiores, que se diferencian por necesitar dos hospedadores, un vertebrado y un invertebrado, para desarrollar su complejo ciclo de vida. Estas propiedades califican a estos microorganismos en la categoría de heteroxénicos, es decir, capaces de realizar todas las actividades que les son necesarias para sobrevivir (nutrición, multiplicación y diferenciación), pero utilizando microambientes tan diferentes como los que les proporcionan los dos tipos de organismos que se comportan como sus hospedadores. En estos hospedadores, los tripanosomatídeos superiores sufren complejos procesos de diferenciación celular mediante los cuales se produce los estadios típicos de estos flagelados, amastigotes, epimastigotes, tripomastigotes, promastigotes y esferomastigotes

(Fig. N°. 2),lo cual les confiere la propiedad adicional de ser protozoarios que realizan el fenómeno del polimorfismo (Mc Ghee y Cosgrove, 1980).

Dentro de estos Trypanosomatidae, el T. cruzi es una especie que presenta una alternancia de hospedadores, mamíferos exclusivamente americanos y hospedadores invertebrados, insectos Hemíptera de la familia Reduviidae, subfamilia Triatominae, cuyos miembros son obligatoriamente hematófagos.

La hematofagia de estos insectos, comúnmente conocidos como chipos, es la propiedad que permite que este parásito sea vehiculado en la naturaleza entre ambos tipos de hospedadores. En efecto, el T. cruzi utiliza como microhabitat en el mamífero el torrente circulatorio, en donde se encuentran los estadios tripomastigotes que son ingeridos por los chipos al tomar su comida sanguínea. Estos flagelados se transforman en la parte anterior del tubo instestinal de los triatominos. (Fig. N°. 3), en estadios amastigotes, en parásitos semejantes a esferomastigotes y en tripomastigotes morfológicamente diferenciables de los tripomastigotes presentes en los mamíferos (Hoare 1972; Garcia y Azambuja 1991). Así mismo se transforman en epimastigotes, los cuales, al pasar a la parte intestinal media de los chipos se multiplican mediante

división binaria longitudinal, por lo tanto se garantiza la constante infección de los insectos. La migración de los estadios epimastigotes los lleva a la porción terminal del tubo digestivo de los chipos, donde se encuentran los tubos de Malpighi y la ampolla rectal, en cuyo interior se produce el fenómeno de metaciclogénesis, mediante el cual los epimastigotes se tranforman en los estadios fisiológicamente infectantes para los mamíferos, los llamados tripomastigotes metacíclicos o metatripomastigotes. La infección de los hospedadores mamíferos se da cuando los chipos infectados evacúan orina y heces como resultado de estímulos provocados en el momento de su alimentación, la cual por realizarse mediante la introducción en la piel y mucosas del aparato picador-chupador de los insectos, facilita el contacto entre los metacíclicos presentes en aquellos fluídos infectantes y las superficies expuestas de los mamíferos, los cuales les sirven de alimento a los triatominos. Por esta razón, la transmisión del T.cruzi es de tipo contaminativa por lo cual se produce, de hecho, una contaminación de los tejidos de los mamíferos con las eyectas de los chipos. Esta propiedad llevó a Hoare (1972) a ubicar al T. cruzi dentro de la Sección Stercoraria que comprende a aquellas especies de Trypanosoma parásitos de mamíferos que culminan su ciclo vital en la parte posterior del intestino de

sus vectores y por ello, su trasmisión se realiza mediante el contacto de las excretas infectantes de estos artrópodos con tejidos apropiados del animal, cuando son evacuadas en el momento de su alimentación. Esta contaminación permite que los metatripomastigotes penetren la piel y las mucosas de los vertebrados, trayendo como consecuencia que los parásitos se hagan intracelulares en diferentes tipos de células iniciando así el llamado ciclo intracelular del parásito, esto se evidencia por la transformación de los metacíclicos en estadios amastigotes; los cuales proliferan en el lecho citoplasmático por originar numerosas y continuas divisiones longitudinales que duplican sucesivamente el número de parásitos, abarrotando la célula, para diferenciarse posteriormente en tripomastigotes del tipo sanguícola. El ciclo intracelular culmina cuando la membrana de la célula hospedadora se rompe, lo cual libera los tripomastigotes quienes poseen dos posibilidades para continuar el ciclo vital del T. cruzi: reinfectan a otras células para iniciar nuevos ciclos intracelulares semejantes al descrito, o bien pasan al torrente sanguíneo, lo cual les permite llevar a cabo el fenómeno del pleomorfismo (Lom 1979), mediante el cual se producen varios tipos de tripomastigotes morfológica y fisiológicamente diferentes (Urdaneta-Morales,1983), convencionalmente conocidos como estadios delga-

dos, anchos y rechonchos.

La presencia de estos flagelados en la sangre, conocida como parasitemia, garantiza dos hechos importantes en la biología del T. cruzi: los parásitos llevados por el torrente sanguíneo producirán, mediante metástasis, nuevos ciclos intracelulares en diferentes tejidos y vísceras del mamífero infectado, produciéndose una parasitosis grave conocida como Tripanosomiasis Americana o enfermedad de Chagas, que en numerosas casos, es fatal. Por otra parte, la permanencia de los tripanosomas en la sangre durante períodos prolongados facilita, obviamente, la infección de los chipos cuando éstos obligatoriamente se alimentan sobre animales. La parasitemia, entonces, es un estado de la infección del mamífero que permite que el T. cruzi sea vehiculado entre poblaciones de animales (que pueden incluir al ser humano) con el compromiso de insectos triatominos.

El carácter heteroxénico de este protozoario se evidencia por la multiplicidad de mamíferos y de insectos triatominos que están involucrados en su complejo ciclo de vida. En efecto, mas de cien especies de estos hematófagos, ubicados en 16 géneros (Sherlock, 1979), se comportan como hospedadores invertebrados con carácter de vectores biológicos que infectan a unas 200 especies de hospedadores mamíferos (Barretto, 1979), que cumplen el papel de

reservorios del parásito. La distribución geográfica de ambos tipos de hospedadores, la cual se superpone como es de esperar, se extiende desde el norte de los Estados Unidos hasta el noreste de Argentina e incluye algunas islas del Caribe, debido a ello, esta tripanosomiasis puede producir zonas éndemicas en numerosas áreas del Neotrópico. En esta vasta extensión, alrededor de 90 millones de personas se encuentran en riesgo de infectarse, en tanto que al menos 16 millones de seres humanos estan afectados por esta tripanosomiasis por lo cual la enfermedad de Chagas es considerada un grave problema de salud pública en el nuevo mundo (Segura, 1992). En Venezuela, esta parasitosis ha alcanzado niveles endémicos en una superficie de 750.000 Km^2, representativa de las tres cuartas partes de la extensión geográfica del país (División de Endemias Rurales, M.S.A.S.,1975). Como ya hemos señalado, este flagelado infecta en condiciones naturales, además de al humano, a numerosos reservorios pertenecientes a los órdenes Edentata, Chiroptera, Carnívora, Lagomorpha, Rodentia, Primates y Marsupialia (Barretto, 1979). La estrecha relación que se desarrolla entre el T. cruzi, sus vectores y reservorios, originó primitivamente, ciclos de transmisión que se establecían entre insectos y mamíferos de hábitats exclusivamente silvestres, con lo cual la tripanosomiasis se encontraba limita-

de mamíferos silvestres, domiciliares (sinantrópicos) y domésticos han servido como modelos para la determinación de los varios parámetros que influyen en el curso de esta protozoosis, tales como la cepa del parásito, el peso del inóculo y la vía utilizada para la inoculación del material infectante. Propiedades inherentes al animal en experimentación como variables importantes tambien han sido investigadas; así según la edad y el sexo del animal, se obtienen desarrollos diferentes en esta tripanosomiasis (para referencias sobre los aspectos señalados, ver Andrade y Andrade, loc. cit.).

Mas recientemente, uno de los reservorios mas importantes de T. cruzi, el rabipelado Didelphis marsupialis, ha venido siendo utilizado intensamente como animal experimental en la determinación de una novedosa vía de transmisión del protozoario, mediante la contaminación de la piel y mucosas así como por ingestión de alimentos contaminados con el contenido de las glándulas anales de estos marsupiales, que tienen la capacidad de permitir la colonización y diferenciación de este protozoario a metatripomastigotes en el lumen de dichas glándulas (Deane y col., 1984 ; Jansen y col., 1991; Nironi, 1993).

Los trabajos señalados son ejemplos de un problema metodológico

que se ha venido produciendo en las investigaciones con T. cruzi. Es decir, la mayoría de estas investigaciones, han tratado de dilucidar los diferentes parámetros ya señalados, que influyen en el desarrollo del curso de esta parasitosis, pero dándole una importancia menor a la especie del mamífero utilizado. En efecto, las conclusiones a las que se han llegado, han sido obtenidas mediante la infección de animales de una determinada especie con varias cepas del tripanosoma. Pocos investigadores han realizado estudios comparativos (revisado por Mazzotti,1940; Andrade y Andrade,1979; Pittella, 1991; Borges y col., 1992); utilizando una o mas cepas de T. cruzi para infectar, en paralelo, a varias especies de mamíferos y así interpretar el comportamiento, y con ello, la importancia del hospedador animal en la infección y desarrollo de la tripanosomiasis americana experimental con el propósito de extrapolar con respecto a lo que posiblemente sucede en condiciones naturales.

Es un hecho establecido que el fenómeno de la heterogeneidad del T. cruzi (Miles, 1979), expresado en las características biológicas diferentes que presentan las poblaciones del parásito, obtenidas en distintas áreas geográficas del Neotrópico, sería uno de los parámetros mas importantes envueltos en las conocidas dife-

rencias clínicas y patológicas producidas por este tripanosoma. En efecto, varios investigadores han propuesto que las numerosas especies de vectores y de hospedadores mamíferos, entre las que circula el protozoario en la naturaleza, provocan aquellas diferencias que son marcadas a nivel regional, a lo largo del continente americano (Miles y col., 1981 ; Dvorak y col., 1988).

Tomando esta proposición como HIPOTESIS de trabajo, nos propusimos alcanzar los siguientes OBJETIVOS :

- Determinar la influencia que especies distintas de mamíferos conocidos como reservorios del T. cruzi (Barretto,loc.cit.), el ratón y la rata, provoca en la infectividad de cepas del parásito aisladas de un reservorio, de un vector y de un humano y cuyos grados de virulencia para determinados hospedadores mamíferos experimentales, ha sido comprobado que son sucesivamente crecientes (Herrera y Urdaneta-Morales,1992; Sampson - Ward y Urdaneta-Morales, 1988; Silva y Nussenzweig, 1953, respectivamente);

- Analizar el comportamiento de estos hospedadores infectados experimentalmente, en relación con las fases que constituyen el parasitismo sanguícola, a saber: período pre- patente, fase aguda y fase crónica;

- Investigar las diferencias en los grados del parasitismo tisular, expresado como la invasión de los tejidos y vísceras de las especies de animales utilizados;

- Determinar si el animal utilizado influye en la virulencia del parásito, expresada como el porcentaje de mortalidad alcanzado por la inoculación de metacíclicos de las poblaciones de *T. cruzi* ya señaladas.

MATERIALES Y METODOS

Aislamiento de los parásitos

Se utilizaron tres cepas de *Trypanosoma cruzi* que provinieron de un reservorio (*Didelphis marsupialis*; Marsupialia,Didelphidae), de un vector (*Rhodnius prolixus*) y de un ser humano.

La cepa aislada del vector (cepa "Trujillo"), fue obtenida de un ejemplar adulto capturado en el área de "Tres Matas", zona endémica para la enfermedad de Chagas del Edo. Trujillo. Para ello, las heces del insecto, expulsadas espontáneamente, fueron inoculadas en ratones albinos (cepa NMRI) de 8 a 12 grs., procedentes del bioterio de la Escuela de Biología, Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela. La cepa obtenida del reservorio (cepa "Turumo "), se aisló mediante xenodiagnóstico practicado sobre un rabipelado adulto, trampeado en la zona de Turumo del Estado Miranda; con 10 *R. prolixus* limpios del 3er estadio, criados en el insectario del laboratorio de Tripanosomiasis de la Sección de Parasitología, Instituto de Zoología Tropical, Facultad de Ciencias , U.C.V.. Treinta días después de la ingurgitación de los chipos se determinó su infección mediante el examen en fresco de sus heces, las cuales se observaron al microscopio

con el objetivo de 40X ; una vez determinada la presencia de flagelados, se realizaron frotes delgados con este material, que se tiñeron con solución de Giemsa y se inocularon por vía intraperitoneal (i.p.) en ratones albinos de 8 a 12 grs.. La tercera cepa, de origen humano, cepa "Y" (Silva y Nussenzweig,1953) fue obtenida mediante repiques en ratones a partir de ratones donadores; una vez logradas las parasitemias, se realizaron xenodiagnósticos, como ya se ha señalado; esta cepa se utilizó como control de nuestras investigaciones.

Mantenimiento de las cepas

Heces de los tres grupos de insectos experimentalmente infectados, obtenidas en cantidades masivas, mediante la técnica de Ryckman (1954), se diluyeron en solución salina (0.85 %) para ser examinadas en fresco al microscopio (400x) y determinar la presencia e identificación de tripomastigotes metacíclicos del parásito. Esta identificación se corroboró utilizando los criterios de Barretto (loc. cit.), mediante muestras de las preparaciones fecales, que se utilizaron para realizar frotis delgados, según la técnica de Brener (1962), que se fijaron con metanol durante tres minutos y se tiñeron con solución de Giemsa durante

45 minutos. Con estas preparaciones se inoculó i.p. seis ratones con las características antes mencionadas; a partir del 5to día post-infección y luego dos veces por semana, se obtuvo sangre de la vena de la cola de los animales, la cual fue examinada en fresco (400X) para determinar el curso de la parasitemia. Una vez que se determinó un número elevado de flagelados, indicativo de la multiplicación del parásito, se realizó el 1er repique en ratones albinos.

El mantenimiento de las cepas se realizó mediante repiques, practicados entre 1-3 semanas (dependiendo de la cepa en estudio), en lotes de 5 ratones albinos, inoculando i.p. 10.000 tripomastigotes sanguícolas por gramo de peso del animal, determinados según la técnica de Brener (loc. cit.) y cosechados por cardiopuntura en el pico de la parasitemia, utilizando inyectadoras heparinizadas tipo tuberculina.

El mismo procedimiento arriba mencionado se siguió en paralelo con lotes de rata albinas (cepa Winstar), con peso aproximado de 50 grs., procedentes del bioterio de la Escuela de Biología, Facultad Ciencias de la UCV.

Infección de los mamíferos experimentales

Lotes de seis animales (ratones y ratas) se inocularon por la vía i.p. con 10.000 tripomastigotes sanguícolas por gramo de peso de animal, obtenidos por cardiopuntura de animales donadores, en la fase aguda de la infección; la sangre se diluyó con solución salina para obtener el inoculo señalado de parásitos en 0,2 ó 0,9 cc. con los cuales se infectaron ratones y ratas, respectivamente.

Con los animales infectados se estudiaron los siguientes parámetros:

Estudio de las parasitemias

Los niveles de parasitemias provocadas por las tres cepas en estudio fueron determinadas.

El Período Pre-patente se determinó mediante exámenes directos de la sangre periférica, tomada de la vena de la cola de tres animales elegidos al azar, del lote de seis infectados, utilizando el microscopio con el objetivo de 40X. Este examen se efectuó dos veces por semana a partir del momento de la inoculación, hasta que se detectó la presencia de flagelados sanguícolas de T.

cruzi.

Una vez determinado el período pre-patente de la infección se cuantificó, cada dos días, el curso de la parasitemia según Brener (loc.cit.), para precisar las modalidades de las fases aguda y crónica de la parasitosis, lo cual se realizó hasta la desaparición de la parasitemia o la muerte de los animales.

Determinación de la mortalidad

La mortalidad de los animales infectados se registró diariamente desde inicio la infección de los animales, calculando el porcentaje de ratones y ratas muertos con respecto al total de la población infectada.

Estudio del tropismo tisular

De cada uno de los seis grupos de animales infectados con la diferentes cepas de *T. cruzi*, se sacrificó un animal por dislocación cervical, en el momento de la máxima parasitemia, para extraerle los siguientes órganos y tejidos: corazón, músculo esquelético, hígado, bazo, pulmón, intestino grueso e intestino delgado y, ocasionalmente, se tomaron fragmentos de páncreas. Las

muestras se fijaron inmediatamente en formol al 10 %, para ser deshidratadas, embebidas en parafina, y cortadas seriadamente en secciones de 5 micras, para luego ser teñidas con Hematoxilina-Eosina. Las muestras se examinaron al microscopio con el objetivo de inmersión (100 X) para determinar la presencia y ubicación de estadios amastigotes o tripomastigotes aislados o formando pseudoquistes.

Con ayuda de un microscopio binocular "Nikon" y una cámara fotográfica modelo "Microflex HFX", cargada con película "Ilford-Pan-F", se tomaron microfotografías de parásitos provenientes de heces de chipos experimentalmente infectados, de sangre y de tejidos y vísceras de los animales utilizados.

RESULTADOS

La morfología y el movimiento de los parásitos observados al microscopio, en las muestras frescas y en los frotes de sangre periférica de los ratones y ratas infectados experimentalmente, así como los estadios intracelulares encontrados en los cortes histológicos de las vísceras de estos animales, fué típica de tripomastigotes sanguícolas (microfotografía No. 1), así como de amastigotes y tripomastigotes tisulares de T. cruzi (microfotografía No. 2). Por otra parte, los flagelados observados en los frotes y exámenes en fresco de material fecal , obtenido de chipos usados en los xenodiagnósticos y del ejemplar adulto de R. prolixus infectado en forma natural, se correspondieron con las formas intestinales típicas de esta especie de tripanosoma (microfotografía No. 3), a saber, epimastigotes, tripomastigotes metacíclicos y formas aberrantes. Todo ello permitió confirmar la infección de los animales por T.cruzi,por cuanto se confirmaron así los criterios de Hoare (1972) y la Organización Mundial de la Salud (1986).

Los lotes de chipos que se utilizaron en el aislamiento de las cepas, mostraron resultados negativos en los exámenes realizados,

con sus hemolinfas, lo cual nos permitió descartar la presencia de infección natural con Trypanosoma rangeli.

Parasitemias obtenidas con las cepas aisladas

Los gráficos Nos. 1, 2 y 3, nos permiten observar el comportamiento de cada cepa en estudio en cuanto a constrastar la duración de los períodos pre-patentes, de las fases agudas y fases crónicas de las parasitemias. Así como los números máximos de parásitos y las oscilaciones propias de las parasitemias en especie de mamíferos (rata y ratón), infectados experimentalmente.

El gráfico No. 1 muestra la parasitemia que produjo la inoculación de la cepa "Trujillo" en ambos hospedadores. El período prepatente promedio, fué de 5 y 7 días, en los lotes de ratones y ratas experimentales, repectivamente. Las fases agudas presentaron diferencias marcadas: en los ratones el número de parásitos se incrementó en una forma intensa, hasta llegar a alcanzar el nivel máximo de $6,5 \times 10^6$ tripomastigotes /ml de sangre el día 10 , sin llegar a producirse la fase crónica debido a que los animales infectados murieron durante la fase aguda. En cuanto a

las ratas, la fase aguda de la infección ascendió en una forma extremadamente moderada, llegando a una parasitemia máxima de 452 x 10^3 tripomastigotes/ml de sangre el día 15, cayendo a una fase crónica a partir del día 29, por cuanto no se observaron parásitos, mediante el examen de gota gruesa ni por el método de Brener.

En la **gráfica No. 2** se aprecia la parasitemia que produjo la cepa "Turumo" de T. cruzi. El período pre-patente observado en las ratas, tuvo una duración de 7 días, en tanto que los ratones mostraron parasitemia, a partir de 10 días post-inoculación. La fase aguda presentó un ascenso violento y corto en el ratón, pero evolucionó produciendo un número de parásitos moderado, 976 x 10^3 tripomastigotes / ml de sangre para el día 18, cuando se obtuvo el nivel máximo, para descender también violentamente, llegando a números tan bajos como 48 x 10^3 tripomastigotes /ml de sangre. Esta fase llegó a tener una duración de solo 8 días, pero produjo 100 % de mortalidad por lo cual, de nuevo, no se presentó la fase crónica. En el experimento con las ratas, la fase aguda presentó un crecimiento lento, que se extendió durante 24 días, período en el cual el número de parásitos se mantuvo ligeramente constante, llegando a un nivel máximo de 238 x 10^3 tripomastigotes / ml

de sangre, el día 18 de infección; durante la fase crónica, se mantuvieron vivas todas las ratas.

El gráfico No. 3 evidencia el comportamiento de la cepa "Y" en los animales en estudio, los cuales mostraron una variabilidad muy marcada, en el curso de la parasitemia. En el ratón hubo un crecimiento exponencial de la parasitemia producida, en tanto que en la rata se presentó una parasitemia poco evidente; los períodos pre-patentes promedios fueron de 3 y de 9 días, en los lotes de ratones y ratas, respectivamente. La fase aguda se caracterizó por un aumento violento de parásitos, logrando niveles hasta de 22×10^6 tripomastigotes/ml de sangre el día 16 post infección, que coincidió con el momento en el cual todos los animales habían muerto, por lo tanto no se presentó la fase crónica. Con respecto a la rata, el día 10 post-inoculación, comenzó la fase aguda de la parasitosis que logró apenas 4×10^5 flagelados/ml de sangre, para luego iniciar la fase crónica.

En los gráficos No. 4 y 5 se resume la manera como se desarrollaron en ratón y rata, respectivamente, las distintas fases de las parasitemias originadas por las tres cepas en estudio .

Los períodos pre-patentes originados en los ratones fuerón de 3, 5 y 10 días para las cepas "Y", "Trujillo" y "Turumo", respectivamente, lo cual se correlacionó directamente con los niveles máximos de las parasitemias provocadas por las tres cepas; es decir, los números mas elevados de parásitos fueron mostrados por los animales inoculados con la cepa "Y", en tanto que la cepa "Turumo" provocó las parasitemias mas atenuadas. Esto se vió reflejado, así mismo en forma inversa, por los días que transcurrieron para originar la muerte de los animales. Los parásitos de la cepa "Turumo" se demoraron más en ocasionar el 100 % de mortalidad **(gráfico No. 4)**.

El comportamiento de las cepas, fué relativamente mas homogéneo en los experimentos realizados con las ratas **(gráfico No. 5)**. En efecto, los períodos de la patencia de las parasitemias por las cepas fue similar, y los niveles máximos de las fases agudas no tuvieron las diferencias marcadas que mostraron en los ratones. Debemos hacer notar que la magnitud de las parasitemias en las ratas no se acercó, en ninguna cepa , al medio millón de parásitos /ml.. En tanto que en los ratones, éstas fueron de 1,7 y 22 millones, cuando inoculamos con las cepas "Turumo", "Trujillo" y

"Y", respectivamente.

Mortalidad

El gráfico No. 6 muestra la consecuencia de lo aquí discutido, es decir 100 % de mortalidad en los ratones experimentales y ninguna muerte en las ratas.

Tropismo tisular

En la tabla N°. 1 y 2 se evidencian los resultados obtenidos en el examen de la invasión tisular, provocada por las cepas de *T. cruzi* que hemos utilizado en estas investigaciones, en los mamíferos infectados experimentalmente.

Se detalla el espectro de órganos y tejidos invadidos, así como la intensidad del parasitismo.

DISCUSION

Los organismos aislados de numerosos mamíferos e insectos americanos y que son ubicados taxonómicamente en la especie *Trypanosoma cruzi*, son morfológicamente indistinguibles (Hoare, 1972). A través de estudios parasitológicos, inmunológicos, bioquímicos e histopatológicos se ha venido demostrando que constituyen un grupo heterogéneo de parásitos. Esta marcada diversidad en los microorganismos provoca, como es de esperar, una enorme variedad de formas, bajo las cuales se presenta la tripanosomiasis que este protozoario causa (Miles y col., 1981; Dvorak, 1984; Andrade y Andrade, 1976); por ello, la enfermedad de Chagas se considera actualmente un complejo de enfermedades y no una entidad simple, que presentan algunos atributos comunes (Dvorak, loc. cit.).

En efecto, investigaciones realizadas con cepas de *T. cruzi*, de diferentes áreas geográficas para determinar la susceptibilidad a la infección, el curso de la parasitemia, el comportamiento en tejidos y vísceras, las alteraciones histopatológicas, la respuesta inmunológica que desarrolla el mamífero, para enfrentar la agresión del flagelado así como los resultados que se obtienen como consecuencia de la actividad parasitaria, que puede conducir

a la muerte del hospedador (para referencias ver Brener, 1979 y Andrade y Andrade, 1979) han concluído en demostrar, repetidamente, que una de las características inherentes al T. cruzi es su heterogeneidad natural.

Esta propiedad se manifiesta, así mismo, por las implicaciones que tiene con respecto, a la variabilidad regional que se observa a lo largo de América Latina, en los síndromes y en la patogénesis que provoca este protozoario (Andrade y Andrade, loc. cit.).

Como consecuencia de estos estudios, está bien establecido que las cepas de T. cruzi, se presentan con virulencia y tropismo tisular muy diferentes, lo cual ha llevado a que algunos autores (Brener, 1979 y Andrade, 1979) hayan propuesto clasificaciones de cepas, que tienen buena aceptación entre los parasitólogos y en las cuales se enmarcan las cepas que van siendo aisladas, de animales y de triatominos en las diferentes áreas geográficas, donde se ha evidenciado la presencia del parásito.

El objetivo básico que se persigue, con aquellas investigaciones es tratar de correlacionar la mencionada heterogeneidad del protozoario, con la gama de formas descritas de la tripanosomiasis americana, con el propósito de explicar los mecanismos que

producen la variabilidad del parásito y cómo esta variabilidad provoca la diversidad de formas locales de la tripanosomiasis.

El T.cruzi al circular en la naturaleza, lo hace adaptándose a los habitats tan diferentes, que le proporcionan los hospedadores mamíferos y los insectos vectores. Una consecuencia de ello es el hecho bien establecido que los mejores resultados, cuando se realiza el xenodianóstico, se logran al utilizar especies de triatominos, que son vectores en aquellas áreas geográficas de donde se han aislado las cepas del parásito, que se quieren diagnosticar. Es decir, la mayor probabilidad de que los chipos utilizados, en un xenodiagnóstico se infecten y permitan el desarrollo instestinal del T. cruzi, es cuando se les alimenta sobre mamíferos infectados que pertenecen a la misma área (Urdaneta-Morales y Rueda, 1977 ; Minter y col., 1978). Estas observaciones han permitido deducir que existen diferencias intrínsecas interespecíficas, entre los múltiples vectores, en cuanto a su susceptibilidad a la infección por este protozoario.

Resultados similares también se producen cuando se analizan comparativamente, las especies de reservorios de los cuales se ha aislado al parásito; es decir, las cepas de T. cruzi que se

aislan de marsupiales, presentan generalmente, una virulencia atenuada, cuando se las inocula en animales convencionales de laboratorio (Perruolo, 1979; Deane y col., 1984), en tanto que los aislados de origen humano son, por el contrario, altamente agresivos (Brener, loc. cit.).

Desde un punto de vista mas general aún, se ha determinado que las cepas que se aislan de seres humanos de Brasil y Chile se caracterizan por producir las mas graves alteraciones histopatológicas, en contraste por ejemplo, con cepas venezolanas y mas aún al compararlas, con cepas centro y norteamericanas. De nuevo, una deducción a la que podemos llegar es la de que diferencias en susceptibilidad al T. cruzi puedan estar ocurriendo, entre las especies de mamífero en las cuales circula el flagelado.

Las diferencias interespecíficas discutidas, pueden ser un parámetro importante cuando se tratan de determinar las causas que ocasionan las ya mencionadas diferencias en la expresión de la tripanosomiasis americana y los posibles mecanismos responsables de la heterogeneidad de esta parasitosis.

Estudios recientes han demostrado que el fenómeno de la heterogeneidad en T. cruzi es la expresión del conjunto de poblaciones naturales, genéticamente diferentes que componen la especie T. cruzi (Miles y col., 1981; Tibayrenc y col., 1986). De acuerdo con estos autores, este fenómeno puede deberse, al menos en parte, a la adaptación antigua que ha venido produciendo en forma constante, mediante la selección natural en este microorganismo, en los diferentes ciclos de trasmisión silvestre y doméstico, que vienen ocurriendo en el Neotrópico. Estos ciclos son extremadamente variados, por cuanto los eslabones que los constituyen, vectores y reservorios, son así mismo extremadamente diferentes (Barretto, loc. cit.).

Los numerosos estudios realizados, para caracterizar cepas aisladas de triatominos y mamíferos, han determinado que entre éstas existen diferencias relacionadas con el curso de los cambios morfogenéticos que dan origen a los estadios pleomórficos (Brener, 1965). Así como con los variados grados de infectividad (Bice y Zeledón, 1970) y de tropismo tisular (Melo y Brener, 1978) para animales de laboratorio, como consecuencia de estos estudios, se ha intentado agrupar a las diferentes cepas estudiadas, en un número limitado de tipos o patrones que comparten las

propiedades morfológicas ya citadas (Brener, 1979 y Andrade, 1985). Estos grupos de cepas coinciden, en forma general, con aquellos patrones que han sido identificados mediante estudios bioquímicos y genéticos ya mencionados.

Esta última caracterización (Miles y Cibulskis, 1986) ha definido la presencia de poblaciones naturales de T. cruzi, aisladas de muy diferentes áreas geográficas del continente americano, que han sido catalogadas en tres grupos de cepas distinguibles, por características que les son propias.

Un grupo posee una distribución muy amplia que comprende Venezuela, Colombia, Perú, América Central, Bolivia, Brasil, Guayana Francesa, Paraguay y Chile. El segundo grupo de cepas ha sido aislado solamente al sur de la cuenca del Amazonas, especialmente del sur del Brasil, así como de Bolivia, Chile, Paraguay y Argentina; en tanto que un tercer grupo ha sido encontrado esporádicamente y en regiones ubicadas al norte del Amazonas.

Estas investigaciones asocian la presencia de estos grupos de cepas, con determinados ciclos de transmisión en los cuales tienden a prevalecer determinadas especies de animales. Así el

grupo 1 de cepas está relacionado en forma particular con mamíferos arborícolas entre los cuales destacan los marsupiales, entre estos el D. marsupiales; los grupos 2 y 3 estan relacionados respectivamente, con murciélagos que frecuentemente viven en nichos dentro de las habitaciones humanas y animales que cavan cuevas, principalmente cachicamos de la especie Dasypus novemcinctus. Estudios previos realizados en diferentes áreas del Brasil por Barrett y col. (1980) concluyen que los tres grupos de cepas citados reflejan la expresión de poblaciones de T. cruzi que circulan, en forma independiente, en ciclos de transmisión, que representan sistemas vector-resevorio silvestres y domésticos, así el grupo 1 fue aislado de marsupiales (D. albiventris y Metachirus nudicaudatus) y de chipos asociados a estos animales (P. geniculatus, Triatoma tibiamaculata); el grupo 2 lo fue del hombre y de animales domésticos o domiciliados (perro, gato, acure, rata, Rattus rattus) en tanto que cepas ubicadas en el grupo 3 se aislaron unicamente del cachicamo (D. novemcinctus) y el triatomino que cohabita frecuentemente con este mamífero (P. geniculatus).

Los trabajos hasta ahora discutidos, enfatizan así los resultados y muestran la influencia que ejerce el insecto vector (Lammel y

col., 1985) y el hospedador mamífero (referencias en Andrade, loc. cit.) en la selección natural de poblaciones del parásito y en la modulación de su virulencia, como consecuencia del constante pasaje, a través de ciclos en los cuales predominan determinadas especies vectoras y de mamíferos reservorios.

Parece evidente entonces que los hospedadores entre los cuales se vehicula el T. cruzi en la naturaleza, deben modificar las características que, rutinariamente, se toman en cuenta para diferenciar las cepas de este parásito y que en definitiva, son los responsables de su notable heterogeneidad y de las marcadas diferencias regionales en la clínica y en la patología bajo las cuales se presenta la tripanosomiasis americana. Nuestras investigaciones aportan resultados que apoyan lo discutido ; es decir la especie del mamífero que sirve de hospedador del parásito influye marcadamente en el comportamiento de este protozoario.

En efecto, cuando comparamos las parasitemias provocadas por inóculos similares de cepas con virulencias tan diferentes como las utilizadas por nosotros, se observó que el ratón permitió que la virulencia fuese expresada a niveles superiores ($x\ 10^6$), incluso en una cepa que como la "Turumo", que por ser aislada de un marsupial, se le consideraba como atenuada, en cuanto a su

agresividad para los animales de laboratorio, cuando el constraste se hace utilizando los niveles de tripomastigotes sanguícolas alcanzados por cada cepa individual en los modelos de roedores empleados, la influencia de la especie de mamífero sobre el parasitismo sanguícola, se observa mas claramente.

Por cuanto como está bien determinado, en T. cruzi el parasitismo sanguícola es una consecuencia y una expresión del parasitismo tisular, y éste a su vez lo es de la multiplicación intracelular del protozoario, los resultados obtenidos por nosotros muestran también que el ratón moduló, de manera diferente a la rata, la virulencia expresada, en el medio celular de los tejidos y vísceras estudiadas. En el ratón se obtuvieron los niveles mas elevados de invasión tisular, los cuales se expresaron mediante la producción de números mas altos de pseudoquistes, así como de parásitos incluídos en estos nidos.

Se acepta que en general, un número elevado de parásitos sanguícolas y tisulares tiende a originar fases agudas intensas, que provocan la muerte del animal infectado, sin la producción de estados de cronicidad; nuestros resultados también mostraron estos hechos, por cuanto todos los ratones inoculados con las

tres cepas, murieron durante los períodos de ascenso de las parasitemias, en tanto que no hubo mortalidad en ninguno de los lotes de ratas experimentales, pasando todas a la fase crónica de la infección, aún en aquellas que fueron inoculadas con una cepa tan altamente virulenta como la cepa "Y".

CONCLUSIONES

- Las tres cepas de Trypanosoma cruzi, aisladas de fuentes tan diferentes como un humano, un mamífero reservorio (D. marsupialis) y un insecto vector (R. prolixus) lograron infectar a especies de mamíferos de laboratorio como fueron ratones y ratas albinas;

- las virulencias de las cepas, cuyos grados de infectividad ya eran conocidos como iendo de un nivel de mayor agresividad (la cepa de origen humano) al de una virulencia muy atenuada (la cepa aislada del rabipelado) y una virulencia intermedia (la cepa aislada del chipo), fueron alteradas cuando inoculadas en las dos especies de mamíferos utilizados;

- los parámetros que caracterizan la virulencia de poblaciones de T. cruzi a saber, período pre-patente, modalidades y niveles de las fases aguda y crónica del parasitismo sanguícola, tropismo tisular y grados de mortalidad fueron persistentemente demostrativos de una mayor agresividad por parte del parásito cuando las tres cepas fueron inoculadas en los lotes de ratones, independientemente de la cepa utilizada del parásito;

- resultados propios de una virulencia atenuada fueron obtenidas cuando los lotes de ratas fueron utilizadas como animales experimentales;

- la comparación de la conducta de las tres cepas de T. cruzi en los animales de laboratorio empleados, nos conduce a afirmar que la especie del mamífero es un parámetro suficientemente importante por cuanto altera la virulencia del parásito y, con ello, la relación protozoario-hospedador al modificar las consecuencias de esta relación parasitaria.

BIBLIOGRAFIA

- Andrade,S.G. 1985: Morphological and behavioural characterization of Trypanosoma cruzi strains. Rev. Soc. Brasil. Med. Trop., **18:** 39 - 46.

- Andrade, Z.A. & Andrade, S.G. 1979: Patologia. **En:** Trypanosoma cruzi e Doenca de Chagas (Eds. Brener, Z. & Andrade,Z.A.) pp. 199 - 248, Guanabara Koogan, Brasil.

- Barr,C.; Brown, C.C.; Dennis, V.A. & Klei,T.R. 1990:Infections of inbred mice with three Trypanosoma cruzi isolates from Lousiana mammals. J. Parasitol., **76:** 918 - 921.

- Barr,S.C.;Schmidt,S.P.; Brown,C.C. & Klei,T.R. 1991:Pathologic features of dogs inoculated with North American Trypanosoma cruzi isolates. Am. J. Vet. Res., **52:** 2033 - 2039.

- Barret, T.V.; Hoff, R.H.; Mott, K.E.; Miles, M.A.; Godfrey, D.G.; Teixeira,R.; Almeida De Souza, J.A.& Sherlock, I.A. 1980: Epidemiological aspects of three Trypanosoma cruzi zymodemes in Bahia state, Brazil. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., **74:**84 - 90.

- Barretto, M.P. 1979: Epidemiologia. En: Trypanosoma cruzi e Doenca de Chagas. (Eds. Brener, Z.& Andrade, Z.A.) pp. 89-151. Guanabara Koogan, Brasil.

- Bice, D. & Zeledon, R. 1970: Comparison of infectivity of strains of Trypanosoma cruzi (Chagas, 1909). J. Parasitol., 56: 663-670.

- Borges, M.; Andrade, S.; Pilatti, C.; Prado, J.& Kloetzel,J. 1992: Macrophage activation and histopathological findings in Calomys callosus and swiss mice infected with several strains of Trypanosoma cruzi. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 87: 493 - 502.

- Brener,Z. 1962: Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with Trypanosoma cruzi. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo, 4: 389 - 396.

- Brener, Z. 1965: Comparative studies of diferents strains of Trypanosoma cruzi. Ann. Trop. Med. Parasit., 59: 18 - 25.

- Brener, Z. 1979: O parásito En: Trypanosoma cruzi e Doenca de Chagas. (Eds. Brener, Z. & Andrade, Z) pp. 1-41. Guanabara

- **Microfotografía No. 1**.- Tripomastigotes sanguícolas: a.- delgado; b.- ancho; c.- rechoncho, de ratones experimentalmente infectados con *Trypanosoma cruzi*.
(Giemsa, 1400 X).

- **Microfotografía No. 2** .- Secciones histológicas de ratones y ratas albinas infectadas experimentalmente con cepas de *Tripanosoma cruzi*.

a.-Pseudoquistes en músculo esquelético de ratón (cepa "Trujillo") con formas en transición (400 X).

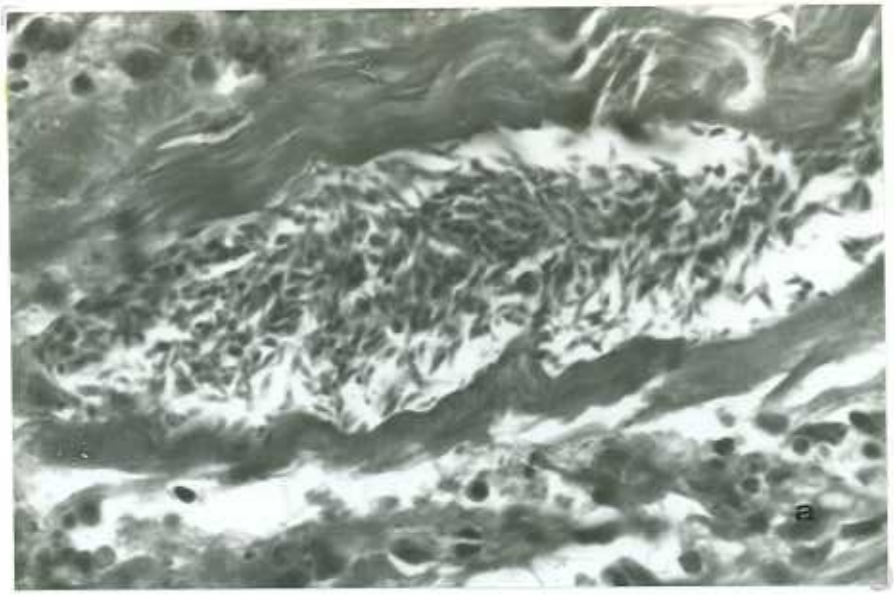
b.-Fibra cardíaca de rata que muestra un pseudoquiste con amastigotes (cepa "Turumo"; 1000X).

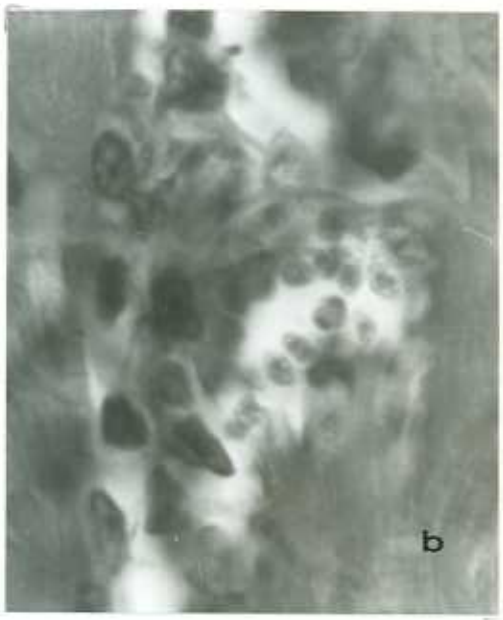
c.-Vista panorámica del corazón de un ratón; se observan numerosos nidos con amastigotes y tripomastigotes (flechas); (cepa "Turumo"; 200X).

d.-Corte de pulmón con un pseudoquiste (flecha) con amastigote (cepa "Trujillo"; 200X).

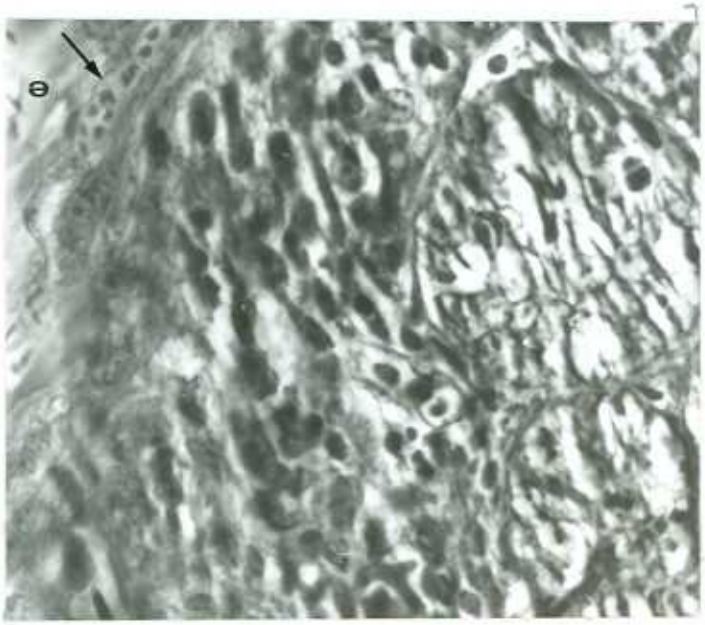
e.-Amatigotes en un pseudoquiste (flecha) de instestino grueso de ratón (cepa " Trujillo"; 400X).

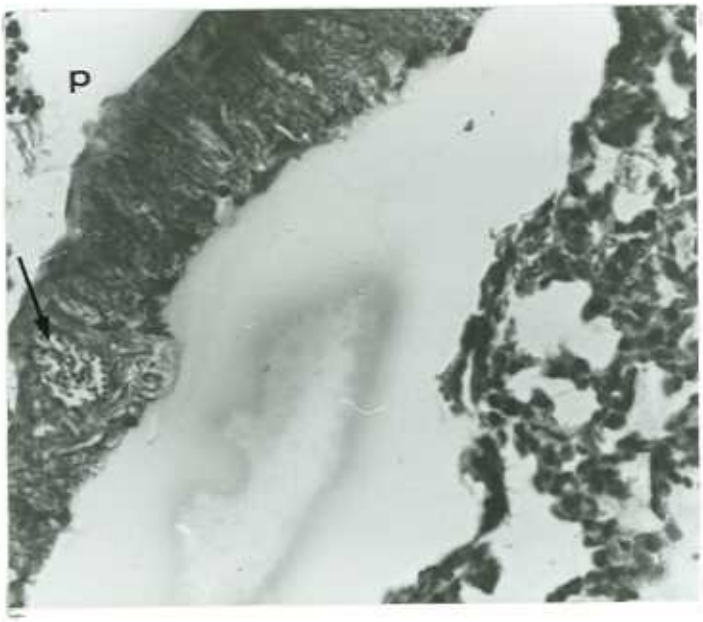
(Hematoxilina - eosina).


a

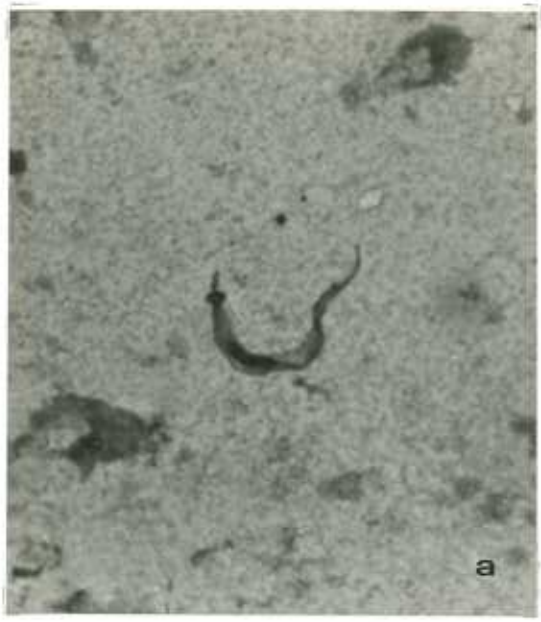

b

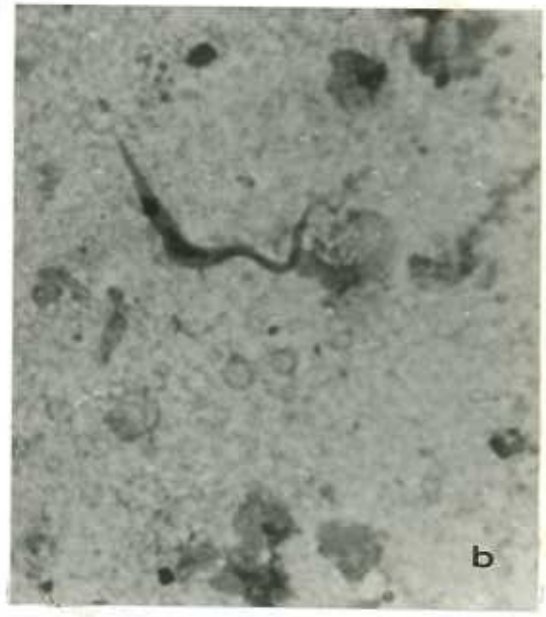
c


e


p

Microfotografía No. 3.- Flagelados fecales de Rhodnius prolixus experimentalmente infectados con Trypanosoma cruzi: a.- metatripomastigote; b.- tripomastigote; c.- epimastigote.
(Giemsa; 1400 X).


a


b

c