TES15 ED2004 C3

REPÚBLICA BOLIVARIANA DE VENEZUELA UNIVERSIDAD CATÓLICA ANDRÉS BELLO FACULTAD DE HUMANIDADES Y EDUCACIÓN ESCUELA DE EDUCACIÓN, ESPECIALIDAD BIOLOGÍA Y QUÍMICA

"INFECCIÓN EXPERIMENTAL DE OVINOS CON TRES AISLADOS DE

Trypanosoma evansi".

Trabajo especial de grado para optar a título de Licenciado en Educación, Mención Biología y Química



Autor: Carmen Victoria Carpio

Tutor: Trina Perrone

Cotutor: Armando Reyna

Caracas, 28 de Julio del 2004.

En mi carácter de Tutor del Trabajo Especial de Grado titulado: "Infección Experimental de Ovinos con Tres Aislados de *Trypanosoma Evansi*" realizado por Carmen Victoria Carpio Rondón para optar al Título de Licenciado en Educación, Mención Biología y Química, considero que dicho trabajo reúne los requisitos y méritos suficientes para ser sometidos a su defensa oral y evaluación por parte del Jurado examinador designado.

En Caracas a los 28 días del mes de julio de 2.004

Dr. Trina Perrone

meal I hust

C.I. 6.892.528

En mi carácter de Cotutor del Trabajo Especial de Grado titulado: "Infección Experimental de Ovinos con Tres Aislados de *Trypanosoma Evansi*" realizado por Carmen Victoria Carpio Rondón para optar al Título de Licenciado en Educación, Mención Biología y Química, considero que dicho trabajo reúne los requisitos y méritos suficientes para ser sometidos a su defensa oral y evaluación por parte del Jurado examinador designado.

En Caracas a los 28 días del mes de julio de 2.004

Dr. Armando Reyna

C.I. 6.563.449

ÍNDICE GENERAL

CONTENIDO	pp.
DEDICATORIA	IV
AGRADECIMIENTOS	V
ÍNDICE DE FIGURAS	VI
ÍNDICE DE TABLAS	VIII
RESUMEN	IX
INTRODUCCIÓN	1
Clasificación del Trypanosoma evansi	7
Morfología de Trypanosoma evansi	8
Ciclo de Vida y Transmisión del Trypanosoma evansi	9
Patogenicidad	11
Variación Antigénica del Tripanosoma	12
Justificación e Importancia de la Investigación	14
Objetivos de la Investigación	15
Objetivo General	15
Objetivos Específicos	
Sistema de Hipótesis	16
Hipótesis de Trabajo	16
Hipótesis de Nula	16
Hipótesis de Alterna	16
Sistema de Variables	16
Variables Independientes	16
Variables Dependientes	16
Variables Intervinientes	16

MARCO METODOLÓGICO	17
Infección Experimental	17
Determinación de las Variables Hematológicas	18
Concentración de Hemoglobina	19
Hematocrito	20
Número total de glóbulos rojos	20
Número total de glóbulos blancos	21
Determinación de Parasitemia	22
RESULTADOS	23
Parasitemia	23
Hematocrito	26
Temperatura	28
Hemoglobina	31
Glóbulos Blancos Totales (GBT)	32
Glóbulos Rojos Totales (GRT)	33
DISCUSIÓN	35
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	40
RIBI IOGRAFÍA	12

DEDICATORIA

Este trabajo de investigación está dedicado a mi familia y a todas aquellas personas que siempre me han apoyado a lo largo de mi vida y de mi carrera.

AGRADECIMIENTOS

A Dios ante todo por darme siempre la fuerza y el apoyo que necesitaba, lo cual me ayudó a seguir a pesar de todos los tropiezos.

A mis padres y mi hermano por toda la confianza que siempre me han brindado, por su apoyo incondicional y por todos los consejos que siempre me han dado.

A mis Tutores por todo lo que he aprendido de ellos, por la alegría que los caracteriza y por toda la paciencia que han tenido a lo largo de todo éste proceso. A Trina mil gracias.

A mis amigos por llenarme siempre de entusiasmo y contagiarme de energía en todo momento, por regalarme mil sonrisas y brindarme abrazos cuando más lo necesitaba.

A mis amigos y compañeros de clase por aguantarme siempre, por ser condescendientes y colaboradores conmigo.

A mis inolvidables compañeras de laboratorio con las cuales aprendí y me divertí muchísimo.

A todos los profesores que fueron y seguirán siendo ejemplos en mi vida y de los cuales me siento sumamente honrada y orgullosa de haberlos tenido como docentes.

A todos Gracias.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA	p.
1 Morfología del <i>T. evansi</i>	
2 Extracción de sangre	
3. Muestra de sangre	
4. Milton Roy Spectronic 1201	
5 Capilar con muestra de sangre	
6 Microcentrífuga	
7 Cuantificación de GRT y GBT21	
8 Trypanosoma evansi en sangre	2
9. Curso de la Parasitemia en ovinos infectados experimentalmente con tres	
aislados de T. evansi: Teva 1, R-38 y Mantecal	5
10 Curso de la Parasitemia (vinotinto) y valores de hematocrito (azul) en el	
ovino infectado experimentalmente con el aislado Teva 1, durante el transcurso	
de la infección	5
11 Curso de la Parasitemia (vinotinto) y valores de hematocrito (azul) en el	
ovino infectado experimentalmente con el aislado R-38, durante el transcurso	
de la infección	,
12 Curso de la Parasitemia (vinotinto) y valores de hematocrito (azul) en el	
ovino infectado experimentalmente con el aislado Mantecal, durante el	
transcurso de la infección	3
13 Curso de la Parasitemia (vinotinto) y Temperatura corporal (azul claro)	
en el ovino infectado experimentalmente con el aislado Teva 1, durante el	
transcurso de la infección)
14 Curso de la Parasitemia (vinotinto) y Temperatura corporal (azul claro)	
en el ovino infectado experimentalmente con el aislado R-38, durante el	
transcurso de la infección)

15 Curso de la Parasitemia (vinotinto) y Temperatura corporal (azul claro)	
en el ovino infectado experimentalmente con el aislado Mantecal, durante	
el transcurso de la infección	31
16 Concentración de Hemoglobina en ovinos infectados experimentalmente	
con los aislados Teva 1, R-38 y Mantecal durante el curso de la infección	32
17 Número de Glóbulos Blancos Totales en ovinos infectados	
experimentalmente con los aislados Teva 1, R-38 y Mantecal, durante el curso	
de la infección	33
18 Número de Glóbulos Rojos Totales en ovinos infectados	
experimentalmente con los aislados Teva 1, R-38 y Mantecal, durante el curso	
de la infección	34

LISTA DE TABLAS

TABLA	pp.
1 Ficha de datos de los tres aislados de Trypanosoma evansi	.17
2 Registro de la Parasitemia en los tres aislados de T. evansi durante los	
80 días de infección	24

UNIVERSIDAD CATÓLICA ANDRÉS BELLO FACULTAD DE HUMANIDADES Y EDUCACIÓN ESCUELA DE EDUCACIÓN ESPECIALIDAD BIOLOGÍA Y QUÍMICA

"INFECCIÓN EXPERIMENTAL DE OVINOS CON TRES AISLADOS DE Trypanosoma evansi".

Autor: Carmen Victoria Carpio Tutor: Trina Perrone Cotutor: Armando Reyna

Fecha: julio de 2004

RESUMEN

Las hemoparasitósis de interés veterinario son enfermedades ampliamente difundidas en las regiones ganaderas tropicales y subtropicales del mundo y se señalan como uno de los principales obstáculos para el desarrollo y mejoramiento de la ganadería en estas partes del mundo. Una de las principales enfermedades causada por los parásitos de la sangre es la Tripanosomosis, la cual es causada por protozoarios hemotrópicos de ubicación extracelular agrupados dentro del género Trypanosoma spp. En la presente investigación se trabajó con tres aislados venezolanos de Trypanosoma evansi (Teva 1, R-38 y Mantecal), los cuales fueron inoculados a tres ovinos(a razón de uno por aislado). El hospedador elegido fue el ovino porque representa un factor importante en la economía nacional, además de esto es un pequeño rumiante y los resultados obtenidos pueden ser extrapolados a otros rumiantes. Es importante mencionar que es la primera investigación realizada en Latinoamérica con ovinos infectados con T.evansi. Se inocularon los ovinos y se siguió el curso de la infección durante 80 días, en los cuales se registraron valores de manera interdiaria tanto hematológicos (Parasitemia, Hematocrito, Hemoglobina, Glóbulos Blancos Totales y Glóbulos Rojos Totales); como no hematológicos (Temperatura). Se comparó la Parasitemia y las variables hematológicas y las no hematológicas para buscar si existía alguna relación entre ellas. Los resultados arrojaron que los tres aislados se comportaron de manera similar entre ellos y que no hubo diferencias significativas entre los valores encontrados durante los 80 días de la infección. Gracias a los resultados obtenidos se llegó a la conclusión que los aislados de T.evansi (Teva 1, R-38 y Mantecal) son capaces de infectar experimentalmente ovinos. Además de esto se pudo observar que no existió diferencias significativas en los valores hematológicos y no hematológicos reportados. Por otro lado se observó que los tres aislados mostraron picos de parasitemia en las 3 primeras semanas de la infección y hacia los últimos días de la misma no se registraron picos, lo que señala que la enfermedad se caracterizó por desarrollar un estado crónico.

Palabras claves: Trypanosoma evansi, ovinos, Tripanosomosis, Estado crónico, Valores Hematológicos y no Hematológicos.

INTRODUCCIÓN

Las hemoparasitósis de interés veterinario son enfermedades ampliamente difundidas en las regiones ganaderas tropicales y subtropicales del mundo y se señalan como uno de los principales obstáculos para el desarrollo y mejoramiento de la ganadería en estas partes del mundo (Rivera, 1996).

Las pérdidas económicas ocasionadas por la hemoparasitósis se atribuyen principalmente a: retardo en el crecimiento, pérdida de peso, reducción en la producción, muertes y costos derivados de la utilización de medicamentos y asistencia veterinaria. Estas pérdidas son difíciles de cuantificar debido a la asociación natural en la cual se presentan estas parasitosis, situación que se hace más compleja en nuestro país por falta de registros sanitarios y de programas de control (Rivera, 1996).

Una de las principales parasitosis es la **Tripanosomosis**, causada por protozoarios hemotrópicos de ubicación extracelular agrupados dentro del género *Trypanosoma spp.* (Losos 1986, citado en Rivera 1996), entre los cuales se encuentran *Trypanosoma evansi (T. evansi)* y *Trypanosoma vivax (T. vivax)*. En Venezuela la Tripanosomosis es considerada la principal enfermedad por protozoarios de equinos y bovinos en explotaciones ganaderas de manejo extensivo.

Trypanosoma evansi (T. evansi) es un parásito que afecta principalmente a los equinos en América tropical, ocasionando una enfermedad denominada Derrengadera, entre cuyos síntomas principales se encuentran: fiebre, anemia, edemas, pérdida de peso, trastornos locomotores y muerte.

La Tripanosomosis causada por *T. evansi* es una enfermedad de carácter endémico, con una gran significación económica, causante de brotes con alta mortalidad de caballos y con una amplia distribución geográfica en importantes regiones de Sudamérica dedicadas a la explotación de ganadería bovina extensiva, entre las que se encuentran: los llanos de Colombia y Venezuela (180.000 km²), el Pantanal de Peroné en el Mato Grosso, Brasil (140.000 km²) y la región norteña de

Argentina (900.000 km²). Éstas regiones tienen como características en común las siguientes: alta humedad, amplias regiones anegadas y enmarcadas entre grandes ríos, topografía plana, con explotación de búfalos en ranchos o hatos en los cuales los equinos juegan un papel importante en el manejo y conducción del ganado (García y col, 2.000).

La incidencia y severidad de la enfermedad varía en diferentes localidades, de acuerdo a la cepa del parásito y a la especie del hospedador. Se asocia con brotes severos y con una incidencia que puede alcanzar el orden de 50 a 70%, con una mortalidad comparable (García y col, 2000).

La Tripanosomosis causada por *T. evansi* puede tener distintos hospedadores, tanto domésticos como salvajes, entre ellos se encuentran: caballos, búfalos, camellos, cabras, ovinos, ciervos, venados, asnos y chigüires. Algunos son susceptibles a la enfermedad y otros actúan como reservorio.

En nuestro país se ha encontrado que los ovinos son susceptibles al *Trypanosoma vivax*, mientras que se desconoce en la actualidad, si éstos pequeños rumiantes son susceptibles a aislados venezolanos de *Trypanosoma evansi*. De allí que el presente trabajo tenga como objetivo fundamental infectar experimentalmente ovinos con aislados de *Trypanosoma evansi* con la finalidad de poder determinar su susceptibilidad a éste parásito.

Los hemoparásitos del ganado y otros animales domésticos son microorganismos que tienen como hábitat el torrente sanguíneo y se pueden desarrollar dentro o fuera de las células de la sangre, causando generalmente su destrucción. Evolutivamente hablando, es posible que estos microorganismos que existían en el tubo digestivo del vector y que se alimentaban de la sangre del mismo, se adaptaron a las células sanguíneas del hospedador vertebrado (Soulsby, 1987).

Existen diferentes tipos de enfermedades hemoparasitarias, las cuales son causadas por distintos tipos de microorganismos pertenecientes a grupos que se diferencian taxonómicamente. Las enfermedades principales que se diferencian en animales domésticos son: La Babesiosis, la Anaplasmósis y la Tripanosomosis.

En nuestro país la Tripanosomosis animal es causada fundamentalmente por *Trypanosoma vivax* y *Trypanosoma evansi*, siendo éste último el agente causal de la Tripanosomosis equina conocida como "Derrengadera" (Venezuela), "Murrina" (Panamá) y "Surra" (India). (Hoare,1.972).

La cría caballar en los llanos de Venezuela es víctima de dos enfermedades principales, clínicamente muy similares pero distintas desde el punto de vista etimológico: una es la Anemia Infecciosa Equina (AIE), conocida como "Peste Boba", y la otra es la "Derrengadera", de mayor difusión pero de carácter esporádico.

En animales como: búfalos, cerdos, cabras, mulas, chigüires y ganado, es muy común observar que éstos padezcan de dicha enfermedad, pero en equinos, el caso es diferente, la enfermedad es más aguda y puede llegar a ser fatal. Éste parásito se caracteriza por presentar sólo la forma tripomastigota ubicándose en sangre y linfa de sus hospedadores y además tiene la particularidad de evadir la respuesta inmunológica expresando glicoproteínas variables de superficie (VSG) (Perrone, 2003).

Según la Oficina Internacional De Epizootias (2000), la Tripanosomosis causada por *Trypanosoma evansi* es considerada como una enfermedad perteneciente a la lista B, en donde se agrupan aquellas enfermedades transmitibles que se consideran importantes desde el punto de vista socio - económico y/o sanitario a nivel nacional y cuyas repercusiones en el comercio internacional de animales y productos de origen animal son considerables (Citado en Belmar y Reinhold 2.001).

La Tripanosomosis causada por *T. evansi* puede encontrarse en distintos hospedadores, los cuales pueden ser susceptibles al parásito o simplemente actuar como reservorios. Se ha encontrado que el ganado ovino es susceptible al *Trypanosoma vivax*, pero por otro lado se desconoce si éstos son susceptibles o no a aislados venezolanos de *Trypanosoma evansi* o si los mismos actúan como reservorios ante dicho parásito.

Por esto, consideramos importante estudiar poblaciones de *Trypanosoma* evansi y determinar el comportamiento infectivo en ovinos, de allí poder determinar si estos pequeños rumiantes pueden ser susceptibles a la enfermedad o bien funcionar como potenciales reservorios.

La siguiente investigación representa un aporte importante para el estudio de la Tripanosomosis, ya que el comportamiento de diferentes aislados en ratones pudieran también ser reflejados en ovinos, lo que conlleva a plantearnos las siguientes interrogantes:

¿Son los aislados venezolanos de *Trypanosoma evansi* capaces de infectar ovinos?

¿Cuáles son los niveles de parasitemia de los ovinos infectados experimentalmente con los tres aislados de *Trypanosoma evansi*?

¿Cuáles son los cambios en los valores hematológicos observados en los ovinos infectados experimentalmente?

¿Cuál es la relación existente entre el grado de parasitemia y las variables hematológicas de los ovinos infectados experimentalmente?

Como se había nombrado anteriormente, son muchas las enfermedades de interés veterinario a nivel mundial, pero sin duda alguna son las enfermedades hemoparasitarias las que constituyen el foco principal en las regiones tropicales y neo-tropicales del mundo, ya que se caracterizan por ser uno de los principales obstáculos para el desarrollo y mejoramiento de la ganadería (Rivera, 1.996).

En Venezuela, algunos estudios han demostrado que la Tripanosomosis (causada tanto por *T. evansi* como por *T. vivax*) está ampliamente distribuida en todas las regiones geográficas, afectando animales de diferentes tipos de explotaciones, raza, edad y sexo.

Para el año de 1.998, en Venezuela se reportó un promedio de seroprevalencia de la Tripanosomosis bovina causada por *T. vivax* de 20.98%, que se reparte de la siguiente forma: Zulia 19%; Trujillo 21.1%; Falcón 20.8%, Apure

39.9%; Bolívar 23.9%, Monagas 3.4%, Guárico 6.2% y Aragua 33.5% (Giardina y García, 1.990).

Es importante recalcar que en lo que respecta a la Tripanosomosis equina, Reyna-Bello y col. (1.998), reportan para *T. evansi*, una seroprevalencia de 81.7% en caballos del Estado Apure, 42.9% en caballos de establo en el Estado Miranda y 0% en caballos de carrera en el Distrito Federal.

Por otro lado y pasando a otro aspecto importante de nuestra introducción es importante mencionar los antecedentes del *Trypanosoma evansi*, por lo cual comenzaremos diciendo que fue el primer tripanosoma patógeno descubierto, observado por Evans en 1.880 en sangre de camellos y caballos afectados por una enfermedad endémica conocida en el viejo mundo (India) como "Surra" (Hoare, 1.972).

En América del Sur es probable que el *T. evansi* haya sido introducido cerca del siglo XVI por los conquistadores españoles al traer caballos de Arabia. A comienzos del siglo XIX fue observado el parásito en la isla Marajo, en 1.847 fue descrito en Paraguay; unos años más tarde entre 1.850 y 1.860 fue observado en Brasil (Pantanal y Matto Grosso). Subsecuentemente el parásito se expandió a través de Bolivia, Guyana, Venezuela y Colombia (Hoare, 1.972).

El desarrollo y el establecimiento de *T. evansi* se dio gracias a los movimientos de los caballos a través de la parte baja de continente Americano y por la existencia de hospedadores silvestres y domésticos, de los cuales los vectores han jugado un papel determinante en la dispersión (Well, 1.977, citado en Desquesnes, 1.996).

En Venezuela, fue observado por primera vez por Rafael Rangel en 1.905, quien lo descubre en sangre de caballos afectados por una enfermedad llamada "Derrengadera", que presentaba como síntomas principales: fiebre, debilitamiento, extenuación, anemia, edemas y parálisis de los cuartos traseros del animal, por lo que lo denominó *Trypanosoma venezuelense* (Hoare, 1.972).

Rangel (1.905) consideraba que la epizootia conocida como "Derrengadera" de los equinos era lo mismo que la "Peste Boba". Rangel envió frotis de sangre a Mesnil, quien los estudió y le encontró semejanzas con el *Trypanosoma evansi*, causante de la "Surra" de los équidos; pero Mesnil lo propone bajo el nombre de *Trypanosoma venezuelense* en vista de sus diferencias con estos tripanosomas, pero no especifica si se trata de una nueva especie o de una variedad de *T. evansi* (Arcay, 1.976).

En 1.929 Tejera y Leger concluyen que *Trypanosoma venezuelense* es una especie diferente a *Trypanosoma evansi*, haciendo comparaciones en cuanto al comportamiento inmunológico cruzado, así como reactividad ante diferentes fármacos. Sin embargo, Hoare (1.972) establece que *Trypanosoma venezuelense y Trypanosoma evansi* son indistinguibles.

Como ya se ha nombrado anteriormente éste parásito está ampliamente distribuido en las regiones de África, Asia, Centroamérica y Sudamérica. En nuestro país se encuentra principalmente en los estados Guárico y Apure (Rivera, 1.996).

El *Trypanosoma evansi* presenta gran cantidad de hospedadores, incluyendo tanto animales salvajes como animales domésticos. Sus principales hospedadores son: Camellos, equinos y caninos. Además, puede infectar asnos, bovinos, búfalo, elefante, tapir, tigre y venado (Hoare, 1.972).

Onah y col (1.996) infectaron experimentalmente seis ovinos con un aislado africano de *Trypanosoma evansi*. Los resultados mostraron que los ovinos infectados producían una forma crónica de la enfermedad caracterizada por bajos niveles de parasitemias y parasitemia críptica, con recuperación espontánea (autocuración) en dos de los casos estudiados. También en algunos casos se observó anemia leve y linfocitosis; concluyendo que, en algunos de ellos, *Trypanosoma evansi* indujo cambios patológicos en sangre periférica de ovinos.

Singh (1.998) reveló la presencia de este parásito en 100 de 119 frotis sanguíneos obtenidos a partir de ovinos y cabras. Aun cuando los ovinos no son muy susceptibles a la enfermedad, son considerados en África y en Asia como reservorios importantes de la Tripanosomosis causada por *Trypanosoma evansi*.

Posteriormente Belmar y Reinhold (2.001), en Venezuela, mostraron que el comportamiento infectivo y el grado de patogenicidad, de distintos aislados venezolanos de *Trypanosoma evansi* sobre ratones susceptibles, era diferente entre los mismos. Teva 1 resultó ser el aislado más virulento al inducir la mortalidad de todos los ratones infectados, 8 días post infección, a pesar de esto, los ratones no manifestaron síntomas de anemia típicos de la infección por dicho parásito. Por otro lado, los ratones inoculados con Mantecal tuvieron un tiempo de sobrevida de 15 días y si manifestaron signos evidentes de anemia.

Por otro lado, en investigaciones anteriores se ha reportado que los ovinos son susceptibles al *Trypanosoma vivax* y que funcionan como hospedadores naturales, tal cual como lo corroboró Rojas en 2.003, al infectar un ovino experimentalmente con *T. vivax*. Con estos resultados se puede tener la posibilidad de que los ovinos también sean susceptibles al *T. evansi*.

Clasificación del Trypanosoma evansi.

Dentro del género *Trypanosoma*, se agrupan varias especies entre las cuales las más estudiadas son aquellas de importancia en el campo médico y veterinario. Entre las especies de mayor importancia veterinaria por ser los agentes causales de la Tripanosomosis animal están: *Trypanosoma brucei, Trypanosoma evansi, Trypanosoma vivax, Trypanosoma equinum, Trypanosoma equidermun y Trypanosoma congolense.* Estos hemoparásitos son los responsables de la Tripanosomosis animal en el continente africano, sin embargo especies como *Trypanosoma equinum, Trypanosoma equiperdum, Trypanosoma vivax y Trypanosoma venezuelense* (sinónimo de *Trypanosoma evansi*) se asocian con la Tripanosomosis que afecta diferentes tipos de ganado y animales domésticos en el

continente americano (Hoare, 1.972).

La ubicación taxonómica del *T. evansi* de acuerdo a Levine et al., (1.980) y Soulsby (1.987) (citado en Rivera, 1.996), es la siguiente:

Reino Animalia

Subreino Protozoa

Phylum Sarcomastigophora

Subphylum Mastigophora

Clase Zoomastigophora

Orden Kinetoplastidae

Suborden Trypanosomatina

Familia Trypanosomatidae

Género Trypanosoma

Morfología de Trypanosoma evansi

En cuanto a la morfología es importante mencionar que *T. evansi* es indistinguible de *T. equiperdum*, de las formas alargadas (slender) de *T. brucei brucei* y de las subespecies patógenas a humanos *T. brucei rhodesiense* y *T. brucei gambiense* (Brun y col. 1.998).

Sin embargo y a pesar de que en ciertos casos se puede observar pleomorfismo en algunos aislados (formas regordetas o "stumpy" y formas intermedias), el *Trypanosoma evansi* es considerado como un parásito monomórfico tripomastigote, con una longitud entre 14-33 µm y 1.5-2.2 µm, la región anterior es cónica con núcleo en posición central, redondeado y compacto, posee una membrana ondulante bien desarrollada, con flagelo libre, largo y un kinetoplasto pequeño subterminal. (Figura 1)



Figura 1. Morfología del T. evansi

Formas diskinetoplásticas se han encontrado en animales salvajes como en chigüires (Stevens y col. 1.989) y en coatíes (Nunes y Oshiro, 1.990). Por otro lado al igual que *T. vivax*, el *T. evansi* se multiplica en el hospedador vertebrado por fisión binaria longitudinal (Soulsby, 1.987).

Ciclo de Vida y Transmisión del Trypanosoma evansi.

Debido a que *T. evansi* no posee los genes necesarios para el desarrollo mitocondrial (Borst y col, 1.987) este no es capaz de sufrir crecimiento y diferenciación en el insecto vector, lo que explica que la transmisión se realice de manera mecánica por insectos succionadores de sangre. Por tanto, mientras el intervalo de tiempo entre los dos períodos de alimentación del vector sea más corto, aumenta la eficiencia de la transmisión ya que los tripanosomas están restringidos a vivir por corto tiempo en el aparato bucal del insecto hematófago (Brun y col, 1.998).

La transferencia mecánica de los tripanosomas de un hospedador parasitado a otro susceptible, depende, entre otros factores, del tiempo que transcurra entre la alimentación del vector en el animal infectado y la subsecuente alimentación del vector en el hospedador susceptible, ya que la infectividad se pierde rápidamente. En el caso de *T. evansi* se señala que la infectividad es alta inmediatamente luego de la toma de sangre, disminuye y se pierde en unas ocho horas (Foil 1.989, citado en Rivera 1.996).

T. evansi es transmitido en forma mecánica por ciertos vectores, estos insectos se caracterizan por ser dípteros, medianos a grandes en tamaño, de cuerpo alargado y robustos, entre ellos se encuentran los tábanos, angoletas, mosca del caballo o del ciervo (Román 1.989, citado en Rivera 1.996). La hembra requiere de sangre para la maduración y la viabilidad de los huevos (anautogenia), por lo que fisiológicamente están obligados a procurarse alimento en huéspedes animales o humanos. La hembra ya fertilizada y con huevos maduros ovipone en las plantas que crecen en el agua, en piedras o en lugares pantanosos. En la mayoría de los climas, las especies generalmente producen una generación al año y otras pueden reproducirse dos veces al año (Lancaster y Meisch, 1.986; School y Petersen, 1.985; citado en Rivera, 1.996).

En el trópico, el período de actividad de las hembras tabánidas varía con las especies durante todo el año, siendo mayor en los días calurosos. Estos insectos al atacar a los animales lo hacen volando rápidamente, picándolos en determinadas regiones del cuerpo. Además presentan piezas bucales picadoras muy fuertes capaces de succionar cantidades considerables de sangre, alimentándose de forma intermitente y volando rápidamente de un hospedador a otro, comportamiento que aumenta la posibilidad de transmisión de tipo mecánico de agentes patógenos. El contacto de las piezas bucales del vector con el hospedador facilita su transmisión (Harwood y James, 1.979; citado en Rivera, 1.996).

Krinsky ,1.976 (ciatado en Rivera, 1.996) señaló que se pueden discutir cinco adaptaciones biológicas de los tabanidae que incrementan las posibilidades y probabilidades de la transmisión mecánica:

- 1. Anautogenia, es decir el requerimiento de una comida de sangre para la maduración de sus huevos. Por otro lado, también es importante mencionar que el macho también es hematófago, debido a que requiere de la ingestión de sangre para el desarrollo y completo funcionamiento de los órganos sexuales.
- 2._ Telmofagia, se refiere a la alimentación en lagunas de sangre, lo cual es la regla principal de éstos insectos.

- 3._ Toma de comidas relativamente grandes, que pueden contener un mayor número de patógenos.
 - 4. Períodos largos de alimentación
 - 5. Alimentación intermitente.

Sintetizando lo anteriormente expuesto se puede decir que una mosca que interrumpe su alimentación sobre un individuo, que puede moverse rápidamente a otro animal, de manera que animales enfermos y sanos puedan ser atacados sucesivamente por el mismo insecto, presenta una gran capacidad vectorial (Rivera, 1.996).

En Centro y Sur América, *T. evansi* también puede ser transmitido por murciélagos vampiros (*Desmodus rotundus*) los cuales pueden actuar como vectores y hospedadores reservorios (Luckins, 1.998). Además se ha reportado que los cánidos (lobos y zorros) pueden contraer la infección al alimentarse de animales muertos que posean dicho parásito (Brun y col, 1.998).

Patogenicidad.

T. evansi es patógeno a la mayoría de los mamíferos domésticos y salvajes. Su efecto sobre el hospedador varía acorde a la virulencia del parásito, a la especie del hospedador, a factores inespecíficos que afectan al animal tales como infecciones simultáneas y estrés general así como de las condiciones epizootiológicas (Hoare, 1.972).

Los signos clínicos de esta Tripanosomosis se caracteriza por fiebre y anemia, seguida de emaciación, edema, caquexia y aumento de tamaño de los nódulos linfáticos y del bazo. Posteriormente aparecen síntomas neurológicos característicos de la enfermedad. Pueden ocurrir abortos durante la preñez. En caballos y camellos se desarrolla una forma aguda de la enfermedad la cual es fatal y los animales mueren en pocas semanas o meses (Luckins, 1.999). En hospedadotes como ovinos y caprinos se ha encontrado que la infección se presenta de manera crónica y puede persistir por muchos años (Onah y col, 1998).

En 1.988 estudios histopatológicos revelaron que en caballos infectados experimentalmente se observaban infiltrados de células mononucleares en cerebro, corazón, pulmón, hígado y riñón (García, 1.988).

Herrera y col. en 2002, infectaron experimentalmente con *T.evansi* a coatíes (Nasua nasua), y siguieron el curso de la infección durante 262 días. El análisis hematológico reveló una marcada disminución en los valores de hemoglobina, hematocrito y contaje total de glóbulos rojos. También lograron observar una anemia intensa durante el primer pico de parasitemia, la cual logró persistir hasta los últimos días de la infección. Posteriormente al realizar análisis bioquímicas se visualizó un incremento en los niveles de alanina y aspartato aminotransferasa y una disminución de los niveles de albúmina. El principal rasgo histopatológico consistió en miocarditis con presencia de fibras cardíacas degeneradas y meningoencefalitis. Esta investigación mostró que los coatíes infectados con *T.evansi* desarrollaron una infección del tipo crónica. Por otro lado, hasta el momento los chiguires son considerados como reservorios a la tripanosomosis ya que no se han evidenciado signos clínicos de la enfermedad (Arias y col.,1.997).

Variación Antigénica del Tripanosoma.

La naturaleza de los antígenos de los tripanosomas salivarios se caracteriza por ser compleja y por representar un ejemplo clásico de la Variación antigénica, la cual la han utilizado como evasión ante la respuesta inmune del hospedador.

Los antígenos de los tripanosomas se dividen sobre la base de su especificidad inmunológica en estables y variables.

Los estables son comunes en diferentes especies de tripanosomas, en cepas de una misma especie y en diferentes formas fisiológicas de una misma cepa. Estos antígenos están representados por componentes estructurales, proteínas y enzimas, los cuales permanecen estables a lo largo de infecciones de curso ondulante.

Los antígenos variables se van expresando a lo largo de una infección continua y sirven para caracterizar las poblaciones de cada onda de parasitemia. Estos antígenos son muy importantes en el desarrollo de una inmunidad protectiva y en la obtención de anticuerpos que puedan ser altamente específicos.

Una de las principales adaptaciones de los tripanosomas es su capacidad de evadir la respuesta inmune del hospedador a través de un proceso denominado variación antigénica, el cual es una consecuencia de los cambios en la composición química de las glicoproteínas que cubren la superficie del tripanosoma (VSG).

La cubierta del VSG (glicoproteínas variables de superficie) es visible a microscopía electrónica como una capa electrón densa de 12 - 15 nm de espesor, la cual está externa a la bicapa lipídica de la membrana plasmática y está compuesta de una monocapa de aproximadamente 10⁷ moléculas de un peso molecular de 55-65 Kda y que bloquea el acceso a antígenos invariantes (Turner, 1988).

La Variación Antigénica es un proceso que consiste en variar las VSG, la cual está caracterizada por la aparición de un número de poblaciones de tripanosomas antigénicamente diferentes, denominados Tipos de Variantes Antigénicos (VATs). La aparición de los distintos VATs es la causa de la parasitemia ondulante del mamífero infectado. Las ondas de la parasitemia en la sangre son generadas por la rápida multiplicación de los parásitos hasta que el sistema inmune produce suficientes anticuerpos circulantes para lisar la mayoría de los tripanosomas (Turner, 1.988).

A pesar de ello, algunos parásitos son capaces de sobrevivir debido a que durante la fase de multiplicación ellos han cambiado la expresión de un diferente tipo de antigénico, el cual no es reconocido por los anticuerpos circulantes. Esta pequeña población es la progenitora del siguiente pico de parasitemia y así sucesivamente. La aparición de nuevos VATs van determinando cada pico de parasitemia (Vickerman y Barry, 1982).

El comportamiento antigénico de un aislado venezolano endémico de *T. evansi* fue estudiado por Perrone (1.992), en donde demostró que aislados Sudamericanos de este tripanosoma utilizan el mecanismo de variación antigénica al igual que sus parientes africanos.

Justificación e Importancia de la Investigación

Como se había mencionado anteriormente, las hemoparasitósis de interés veterinario son enfermedades difundidas a lo largo de todo el globo terráqueo afectando distintas zonas geográficas, y se señalan como uno de los problemas principales para el desarrollo y mejoramiento de la ganadería en estas partes del mundo.

Entre dichas enfermedades se encuentra la Tripanosomosis, específicamente la causada por *Trypanosoma evansi*, su condición de hemoparásito en una gran variedad de animales domésticos alrededor del mundo y el hecho de ser causante de múltiples muertes y pérdidas económicas, lo han hecho foco importante de innumerables investigaciones. Los hospedadores varían geográficamente; por ejemplo en África, el hospedador principal de dicho parásito son los camellos, mientras que en Centro y Sudamérica el hospedador principal es el caballo.

A pesar de los múltiples estudios sobre la presencia del *Trypanosoma evansi* en distintos hospedadores, en nuestro país no se conoce si aislados venezolanos de *Trypanosoma evansi* pueden ser infectivos a ovinos, así como tampoco se conoce si los ovinos pueden ser susceptibles o reservorios a estos parásitos.

Los ovinos forman parte del consumo de carne en el país, y si bien no es uno de los alimentos de la cesta básica es de relevancia para el consumo del venezolano. Por tanto, las enfermedades en los ovinos pueden tener repercusiones sobre la economía de las fincas dedicadas a su explotación. Por otro lado, los ovinos son pequeños rumiantes, de fácil manejo, los cuales pueden ser un hospedador natural, y gracias a esto los resultados de dicha investigación pueden ser extrapolados a otros rumiantes domésticos como el bovino.

Por las razones de impacto económico que ocasiona la Tripanosomosis causada por *T. evansi* sobre la industria ganadera, se hace necesario desarrollar programas de investigación dirigidos a profundizar el conocimiento sobre la parasitosis, de tal manera que la información obtenida a través de ésta investigación permita aplicar técnicas más eficientes para su diagnóstico y la implementación de programas efectivos para su control.

La presente investigación representa un aporte al conocimiento de la Tripanosomosis a nivel nacional e internacional, debido a que no se han realizado estudios similares de dicho parásito en ganado ovino, ni en Venezuela ni en América Latina; los estudios que se han registrado hasta la actualidad con ganado ovino se reportan en el continente africano y asiático. Por lo tanto, el presente trabajo es de gran relevancia ya que contribuye al conocimiento de la biología de los tripanosomas, punto clave para estudios epidemiológicos y de control de la Tripanosomosis.

En función de todo lo anteriormente escrito, la presente investigación se plantea los siguientes objetivos.

Objetivos de la Investigación.

Objetivo General

- Inocular experimentalmente ovinos con tres aislados de *Trypanosoma* evansi.

Objetivos Específicos

- Determinar los niveles de parasitemia en ovinos sometidos a la infección con cada uno de los tres aislados de *Trypanosoma evansi*.
- Determinar los valores hematológicos: Hematocrito (Ht), Hemoglobina (Hb), Glóbulos rojos totales (GRT) y Leucocitos totales (LT); y cambios no hematológico como la Temperatura, durante la infección experimental de ovinos con *Trypanosoma evansi*.
 - Relacionar el grado de parasitemia producida por distintos aislados en

ovinos con variables hematológicas (Hematocrito, Hemoglobina, Glóbulos rojos totales y Leucocitos totales) y no hematológico (Temperatura).

Después de hacer una exhausta revisión bibliográfica y de haber planteado los objetivos, a continuación se propone el sistema de hipótesis y el sistema de variables.

Sistema de Hipótesis

Hipótesis de Trabajo:

- Los aislados venezolanos de *Trypanosoma evansi* son capaces de infectar experimentalmente ovinos.

Hipótesis Nula:

 Los aislados venezolanos de Trypanosoma evansi no son capaces de infectar experimentalmente ovinos.

Hipótesis Alterna:

- Los ovinos infectados experimentalmente son susceptibles a los aislados de *Trypanosoma evansi*.
- Los ovinos infectados experimentalmente con los aislados de Trypanosoma evansi, se comportan como reservorios.

Sistema de Variables

Variables Independientes:

- Infección experimental a ovinos con tres aislados de *Trypanosoma* evansi (Teva 1, R-38 y Mantecal).

Variables Dependientes:

- Infectividad
- Cambios en valores hematológicos

Variables Intervinientes:

- Condiciones ambientales, alimentación (tipo de alimento, cantidad) y el sexo.

MARCO METODOLÓGICO

La metodología que se llevó a cabo en la presente investigación constó de dos etapas:

- 1. La Infección experimental
- 2. La Determinación de las variables Hematológicas

1. Infección Experimental

El material parasitológico inicial comprendió tres aislados de campo de Trypanosoma evansi cuyos datos de identificación se presentan a continuación:

Aislado	Fecha	Hospedador	Lugar
Teva 1	No determinado	Caballo	Estado Apure
R - 38	2.001	Caballo	Hato el Frío, Edo. Apure
Mantecal	1.996	Caballo	Estado Apure

Tabla 1.-Ficha de datos de los tres aislados de Trypanosoma evansi.

Fueron utilizados los siguientes aislados de parásitos criopreservados con Dimetilsulfóxido al 5% en Nitrógeno Líquido a -196° C.

Para reactivar los criopreservados de *T. evansi* se utilizaron ratas albinas Sprague Dawley.

Para las infecciones experimentales se utilizaron ovinos mestizos, de 3 a 6 meses de edad, los cuales se infectaron con los aislados nombrados anteriormente. Estos ovinos fueron evaluados serológicamente y hematológicamente por medio de la Técnica de Microhematocrito (Woo, 1.972) para despistar la presencia de tripanosomas previo infección.

Los Criopreservados de los aislados Teva1, Mantecal y R-38 se inocularon en ratas albinas, vía intraperitoneal a razón de 0.5 ml de criopreservado/rata. El curso de la infección se siguió diariamente y al llegar a la parasitemia a valores de 10^7 parásitos/ml de sangre aproximadamente se sacrificaron los animales por punción cardiaca. La sangre que se obtuvo constituyó el material inicial para las infecciones experimentales en los ovinos; para ello se inocularon por vía intravenosa 3 ovinos con 1×10^6 parásitos totales a partir de la sangre infectada de ratas con cada uno de los aislados de *T. evansi* a razón de un ovino por aislado.

2. Determinación de las Variables Hematológicas

Se tomaron muestras de sangre de manera interdiaria para la evaluación de las variables hematológicas (Figura 2), las cuales se mencionan a continuación



Figura 2. Extracción de sangre



Figura 3. Muestra de sangre

Concentración de Hemoglobina:

Se utilizó el método de la Cianometahemoglobina (O.E.A). Para ello se tomó 10µl de sangre de cada muestra y 10µl de una solución patrón de hemoglobina comercial a una concentración de 20µg/ml. Posterior a esto las muestras de sangre se disolvieron en 2.5 ml de solución Drabkin (Bicarbonato de Sodio 0,1%, Ferrocianuro de Potasio 0,02% y Cianuro de Potasio 0,005%). Se agitaron las soluciones, se incubó la mezcla por 10min a temperatura ambiente y se determinó la absorbancia a 540nm en un espectrofotómetro (Milton Roy Spectronic 1201). La concentración de hemoglobina se calculó a través de la siguiente fórmula:

C / dl = (Abs. de la muestra/ Abs. del patrón) x Concentración del patrón



Figura 4. Milton Roy Spectronic 1201

Hematocrito:

Estos valores se determinaron mediante la Técnica de Microhematocrito (Woo, 1972), utilizando capilares heparinizados, en los cuales se colocaron aproximadamente 60ul de sangre y se centrifugaron a 10.000 x g por 5 min. en una microcentrífuga. Los valores de hematocrito se expresaron como el % de eritrocitos empaquetados en relación al volumen total de sangre.



Figura 5. Capilar con muestra de sangre



Figura 6. Microcentrífuga

Número total de glóbulos rojos:

Se realizó mediante contaje directo en Hemocitómetro. La sangre infectada se diluyó 1:1000 en una solución de Citrato trisódico 3%, formol 1%, se incubó por un minuto, y se colocaron 8µl de la dilución en el Hemocitómetro. Las células fueron observadas con el objetivo 40X en un microscopio y se contaron los eritrocitos. El número de células se calculó mediante la siguiente fórmula:

Glob/dl = No.cel x dilución x 5 x 10

Número total de glóbulos blancos:

Se contaron directo a través del Hemocitómetro. La sangre infectada se diluyó 1:20 en una solución comercial denominada solución de Turk. La mezcla se incubó 1 min., se colocó 8 ul de la dilución en el Hemocitómetro y las células se observaron con el objetivo 10X en un microscopio (Zeiss), se contaron las células y su número se calculó mediante la siguiente fórmula:

Cel/dl = (No. Cel x dilución x 10) / 4



Figura 7. Cuantificación de GRT y GBT

Determinación de Parasitemia:

El curso de la parasitemia se siguió durante 80 días de forma interdiaria los primeros 65 días de la infección y el resto de los días de forma semanal. Los parásitos se cuantificaron siguiendo la metodología descrita por Brener (1.969) modificado. Para ello se colocaron 5 ul de sangre en una lámina portaobjetos, se extendió la muestra utilizando una laminilla cubreobjeto de manera que la sangre cubriera uniformemente el área de la lámina cubreobjeto. Se contaron aproximadamente 100 campos por muestra con la observación del ocular 40X.

El número de parásitos se determinó mediante la siguiente fórmula:

No. De parásitos / ml = Tc x F x 200 x dilución

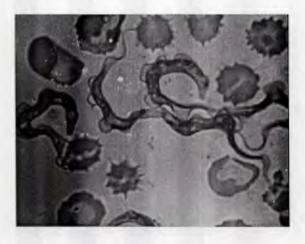


Figura 8. Trypanosoma evansi en sangre.

RESULTADOS

Para el cumplimiento de los objetivos planteados se inocularon tres ovinos con distintos aislados del parásito *Trypanosoma evansi*, dichos aislados fueron Teva 1, R-38 y Mantecal. todos provenientes de caballo, su hospedador natural. El curso de la infección se llevó a cabo por un período de 80 días, es importante mencionar que se tomaron muestras de forma interdiaria los primeros 32 días de la infección, posteriormente el muestreo se realizó cada 3 ó 4 días, y a partir del día 47 fueron tomadas las muestras de forma semanal.

Parasitemia

Los resultados obtenidos mostraron que los inóculos experimentales de los tres aislados de *T. evansi* utilizados en el presente trabajo (1 x 10⁶ parásitos totales) fueron capaces de inducir parasitemia en los tres ovinos inoculados.

La Tabla 2 muestra los valores de la parasitemia obtenida por el método de Brener (1.969) durante el curso de la infección, tomando en cuenta los tres aislados de *T. evansi* (Teva1, R-38 y Mantecal). Como se observa en la tabla los valores de parasitemia se ubicaron en un rango entre 6 a 79 x10³. Es de destacar que los máximos valores de parasitemia fueron obtenidos el día 8 con 30 x 10³ parásitos/ml para Teva 1; el día 12 con 79 x10³ parásitos/ml para R-38 y los días 8 y 12 con 48 x 10³ parásitos/ml para el aislado Mantecal. Es importante señalar que hubo días donde la parasitemia no fue detectada por el método utilizado (Brener, 1.969), lo cual fue representado por el valor 0; sin embargo, en la mayoría de los casos se observaron parásitos por el método de Woo (1.972); excepto los días 6, 39, 61 y 65 para el aislado Teva 1. Los días 39, 47, 61, 65 y 80 para R-38 y finalmente los días 30, 36, 54, 61, 65 y 80 para Mantecal; en los cuales no se detectaron parásitos por ninguno de los dos métodos. Los valores de parasitemia fueron obtenidos hasta el día 80 para Teva 1, mientras que éstas no fueron observables desde los días 47 y 43 para los aislados R-38 y Mantecal respectivamente.

Días de Infección Aislados	0	2	4	6	8	10	12	14
Teva 1	0	6086,38	0	0	30431,9	0	6086,38	6086,38
R-38	0	0	6086,38	0	6086,38	0	79122,94	24345,52
Mantecal	0	0	6086,38	0	48691,04	0	48691,04	0

Continuación Tabla 2

Días de Infección Aislados	16	18	20	22	24
Teva 1	6086,38	24345,52	12172,76	0	12172,76
R-38	12172,76	0	0	12172,76	12172,76
Mantecal	6086,38	6086,38	0	12172,76	0

Continuación Tabla 2

Días de Infección Aislados	26	28	30	32	36
Teva 1	0	12172,76	6086,38	0	6086,38
R-38	12172,76	0	6086,38	12172,76	6 08 6,38
Mantecal	0	0	0	0	0

Continuación Tabla 2

Días de Infección Aislados	39	43	47	54	61
Teva 1	0	6086,38	0	6086,38	0
R-38	0	6086,38	0	0	0
Mantecal	6086,38	0	0	0	0

Continuación Tabla 2

Días de Infección Aislados	65	80
Teva 1	0	12172,76
R-38	0	0
Mantecal	0	0

Tabla 2.-Registro de la Parasitemia en los tres aislados de T. evansi durante los 80 días de infección.

Los valores mostrados en la Tabla 2 fueron graficados y se observan en la Figura 9. En la misma se puede visualizar la parasitemia registrada en los tres ovinos infectados experimentalmente con los aislados de *T. evansi* (Teva 1, R-38 y Mantecal) durante los 80 días de infección.

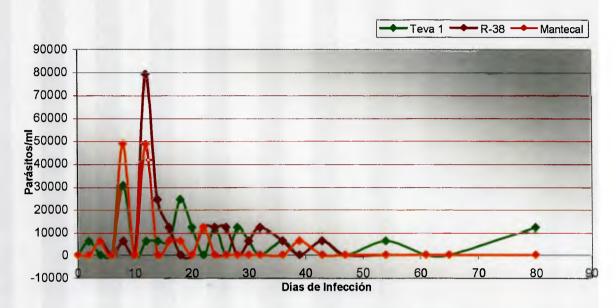


Figura 9.-Curso de la Parasitemia en ovinos infectados experimentalmente con tres aislados de T. evansi: Teva 1, R-38 y Mantecal

Como se observa en la figura los mayores picos de parasitemia se dieron en los tres aislados (Teva 1 representado en verde, R-38 en marrón y Mantecal en naranja) entre la segunda y la tercera semana post-infección; el resto de los días también se encontraron picos de parasitemia cuyos valores fueron más bajos. En algunos días hubo parasitemia no detectable. A partir del día 30 los niveles de parasitemia se mantienen bajos, sin embargo se puede observar una infección activa, determinado por el método de Microhematocrito; lo que indica una tendencia hacia la cronicidad de la enfermedad.

Los resultados obtenidos en ésta figura también mostraron que los ovinos infectados con los aislados venezolanos de *T. evansi*, desarrollaron una parasitemia de tipo ondulante típica de éstos tripanosomas en sus hospedadores naturales.

Hematocrito

El hematocrito se presenta como el porcentaje de glóbulos rojos empaquetados y fue medido como una de las variables indicadoras de la anemia características de las infecciones con *T. evansi*. Los resultados de los valores de hematocrito de los ovinos infectados con Teva 1, R-38 y Mantecal fueron representados en las figuras 4, 5 y 6 respectivamente.

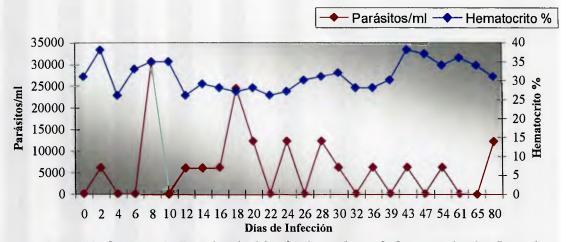


Figura 10.-Curso de la Parasitemia (vinotinto) y valores de hematocrito (azul) en el ovino infectado experimentalmente con el aislado Teva 1, durante el transcurso de la infección.

En la figura 10 se pueden observar los valores de hematocrito junto con la parasitemia medida en parásitos/ml durante el transcurso de la infección. Como esta representado en ésta figura los valores de hematocrito, no muestran grandes fluctuaciones a lo largo del curso de la infección. Los valores de hematocrito se mantiene en un rango de valores aproximados entre 25-30%. Se observa que los dos primeros días se encuentra el porcentaje más alto de hematocrito. Para el día que se

observa el primer pico de parasitemia sus valores comienzan a descender, y entre los días 12 hasta el 39 post-infección, los valores se mantienen relativamente constantes, entre 25% y 30% de hematocrito. En días posteriores al 39 el porcentaje de hematocrito aumenta y se acerca a los valores normales, lo cual coincide con los picos más bajos de parasitemia.

En la figura 11 se observa la parasitemia (parásitos/ml) junto con el porcentaje de Hematocrito, ambos en función de los días de infección, con lo cual se determinó si el aislado de *T. evansi* (R-38), era capaz de infectar a un ovino.

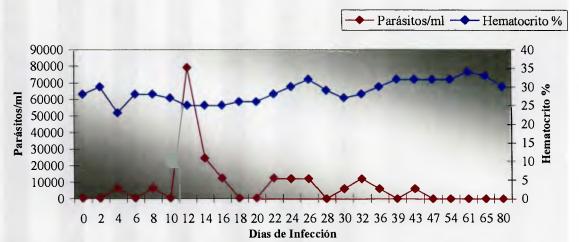


Figura 11.-Curso de la Parasitemia (vinotinto) y valores de hematocrito (azul) en el ovino infectado experimentalmente con el aislado R-38, durante el transcurso de la infección.

Al igual que en el caso anterior, no se observaron cambios significativos en los valores de hematocrito, pero de igual manera es importante mencionar que los primeros 22 días pos-infección los valores se mantuvieron entre 23% y 28%. Posterior a esto hubo un pequeño aumento de 32% de Hematocrito, el cual coincidió con el día 26 de la infección donde la parasitemia no era observable. El resto de los días de la infección se notó un ligero aumento en los valores de hematocrito, siendo el más alto de 34% en el día 61, concordando dichos valores con los picos más bajos; lo cual indica al igual que en el caso anterior una cronicidad de la enfermedad.

Al igual que en las figuras 10 y 11, la figura 12 muestra los valores en porcentaje de hematocrito. Con lo cual se observa similar a los casos anteriores que el aislado de *T. evansi* (Mantecal), aún cuando se observan fluctuaciones en los valores de hematocrito se mantiene entre los valores normales.

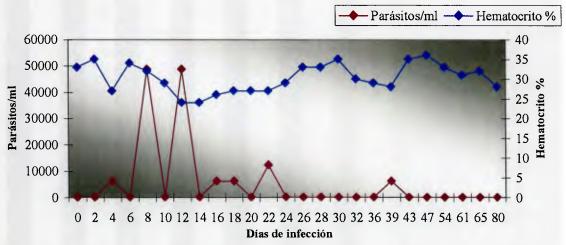


Figura 12.-Curso de la Parasitemia (vinotinto) y valores de hematocrito (azul) en el ovino infectado experimentalmente con el aislado Mantecal, durante el transcurso de la infección.

Sus valores a lo largo del experimento no tuvieron cambios relevantes, sin embargo es importante señalar que los valores más altos se encuentran en los primeros 8 días de infección y en los últimos días a partir del día 43. Después del día 12 post-infección sus valores se mantuvieron entre 24% y un máximo de 36% para el día 47, lo cual coincidió al igual que en la figura anterior, con una parasitemia indetectable al menos por en método de Brener.

Temperatura

En las figuras 13, 14 y 15 se muestran los valores de temperatura corporal registrados durante el curso de la infección con los aislados Teva 1, R-38 y Mantecal respectivamente. Como se muestra en la mayoría de los casos los picos de temperatura coincidieron con los picos de parasitemia o días cercanos a éstos.

En el caso de Teva 1 (figura 13) se observa un aumento de temperatura en los días cercanos al pico de parasitemia obtenido el día 8 post-infección. También se observa otro aumento de temperatura relacionado con el pico de parasitemia obtenido el día 18. A partir del día 24 hasta los últimos días de la infección, se observan valores normales de temperatura a pesar de que también se registran picos de parasitemia pero muchos más bajos que los anteriores.

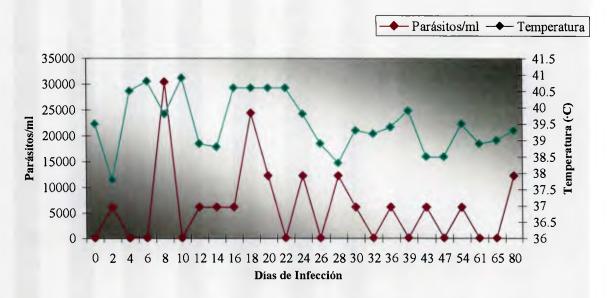


Figura 13.-Curso de la Parasitemia (vinotinto) y Temperatura corporal (azul claro) en el ovino infectado experimentalmente con el aislado Teva 1, durante el transcurso de la infección.

Para el caso de R-38 (figura 14) el aumento de temperatura también estuvo relacionado con el pico más alto de parasitemia, los valores más altos de temperatura se registran hasta el día 20 post-infección, obteniéndose un valor máximo de temperatura de 40,8 °C.

A partir del día 20 se observa que la temperatura vuelve a sus valores normales durante el resto del experimento.

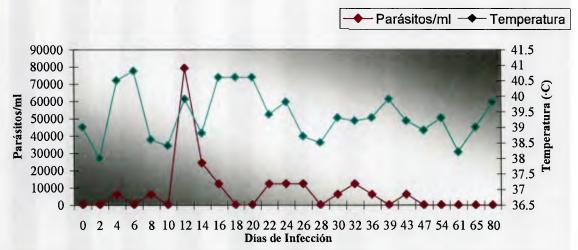


Figura 14.-Curso de la Parasitemia (vinotinto) y Temperatura corporal (azul claro) en el ovino infectado experimentalmente con el aislado R-38, durante el transcurso de la infección.

La misma tendencia puede observarse en la figura 15 con el aislado Mantecal, donde los valores de temperatura más altos fueron observados durante los mayores picos de parasitemia.

Estos resultados mostrados en las figuras 13, 14 y 15 indican que la fiebre registrada en los ovinos infectados experimentalmente con los aislados de *T. evansi* está estrechamente relacionada con los picos más altos de parasitemia, principalmente alrededor de las primeras tres semanas post-infección. Posteriormente cuando aún se registraron picos menores de parasitemia los valores de temperatura se mantuvieron dentro de los valores normales.

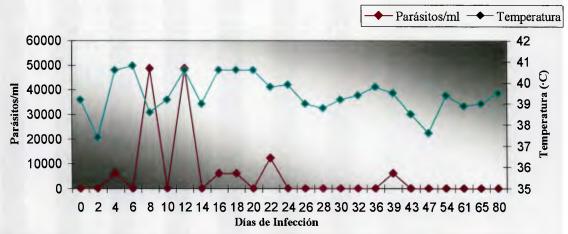


Figura 15.-Curso de la Parasitemia (vinotinto) y Temperatura corporal (azul claro) en el ovino infectado experimentalmente con el aislado Mantecal, durante el transcurso de la infección.

Hemoglobina

En la figura 16 muestra los valores de hemoglobina de los animales infectados experimentalmente con los tres aislados de *T. evansi* Teva 1(verde), R-38 (marrón) y Mantecal (naranja). Como lo muestra la figura la tendencia es muy similar en los tres casos. Según la tabla de los valores sanguíneos normales ganado-ovino (Benjamín, 1.984), el valor estándar de hemoglobina es de 10,0 a 14,0 g/dl, lo cual indica que los ovinos infectados experimentalmente en general mantuvieron sus concentraciones de hemoglobina dentro de los rangos normales. A excepción de los días finales de la infección en la cual la hemoglobina aumentó ligeramente sus valores.

Estos resultados sugieren que los valores de hemoglobina en los ovinos infectados experimentalmente se mantienen dentro de los rangos normales dentro de los días de la infección; indicando que la hemoglobina no se ve afectada por la parasitemia, de igual manera como se observa en las figuras 10, 11 y 12 en las cuales los valores de hematocrito tampoco fueron afectados por la misma.

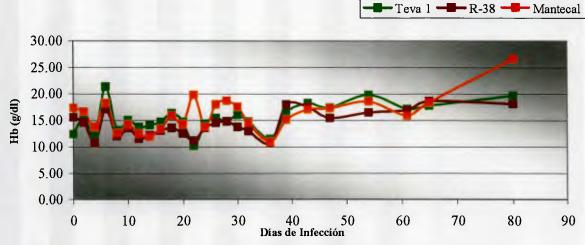


Figura 16.-Concentración de Hemoglobina en ovinos infectados experimentalmente con los aislados Teva 1, R-38 y Mantecal, durante el curso de la infección.

Glóbulos Blancos Totales (GBT)

En la figura 17 se observa el comportamiento del número de glóbulos blancos en función de los días de infección de los tres aislados de *T. evansi* Teva 1 (verde), R-38 (marrón) y Mantecal (naranja). Según la tabla de los valores normales de glóbulos blancos totales en ganado-ovino reportado en la literatura (Benjamín, 1.984), los valores normales o estándares se ubican entre 4.000 a 12.000 cel/ml. Aún cuando se observan fluctuaciones durante el curso de la infección los valores de los ovinos infectados experimentalmente con aislados de *T. evansi* se mantuvieron dentro de los rangos normales.

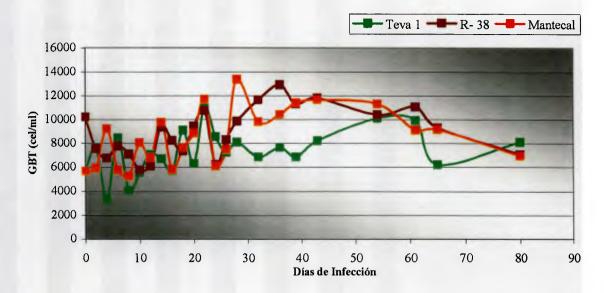


Figura 17.-Número de Glóbulos Blancos Totales en ovinos infectados experimentalmente con los aislados Teva 1, R-38 y Mantecal, durante el curso de la infección.

Glóbulos Rojos Totales (GRT)

En la figura 18 se observa el comportamiento del número de glóbulos rojos en función de los días de infección de los tres aislados de *T. evansi* Teva 1 (verde), R-38 (marrón) y Mantecal (naranja).

En la esta figura se puede observar que el comportamiento de los tres aislados es similar, es decir que no se distinguen diferencias significativas a lo largo del curso del experimento. Tomando en cuenta que el número de glóbulos rojos totales normales en ovinos se encuentra entre 8,5 x 10⁶ y 13,5 x 10⁶ cel/ml según lo reporta la literatura (Benjamín, 1.984) y a pesar de que se observan fluctuaciones durante el curso de la infección, los valores de glóbulos rojos/ml de los ovinos infectados experimentalmente con los aislados de *T. evansi* estudiados, se mantuvieron dentro de los rangos normales al igual que en las variables hematológicas mencionadas anteriormente (hematocrito, hemoglobina y glóbulos blancos normales).

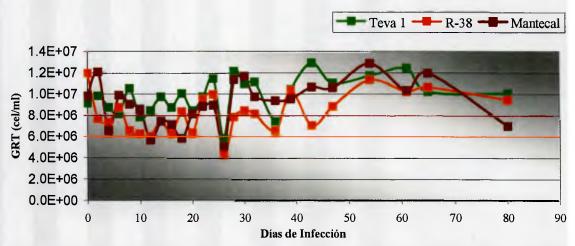


Figura 18.-Número de Glóbulos Rojos Totales en ovinos infectados experimentalmente con los aislados Teva 1, R-38 y Mantecal, durante el curso de la infección.

Finalmente los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran que las variables hematológicas sometidas a éste estudio (hematocrito, hemoglobina, glóbulos blancos totales y glóbulos rojos totales), no se ven afectadas en ovinos infectados experimentalmente con distintos aislados de *T. evansi*, lo cual sugiere que los ovinos pueden comportarse como reservorios mostrando que son poco susceptibles a la enfermedad.

DISCUSIÓN

En 1.986 Losos definió la infectividad como la capacidad que tienen los tripanosomas para invadir y multiplicarse en un hospedador; además de ser el primer criterio que se utiliza a la hora de describir la interacción entre tripanosomas patógenos y sus hospedadores. Los resultados obtenidos a lo largo de ésta investigación muestran que no existen diferencias en el grado de patogenicidad entre los aislados venezolanos de *T. evansi* (Teva 1, R-38 y Mantecal) y el hospedador estudiado (ovino).

Durante los experimentos de infectividad se utilizaron 3 aislados venezolanos de *T. evansi* provenientes de su hospedador natural (el caballo), se infectaron experimentalmente tres ovinos, uno con cada aislado, y se observó en todos los casos una parasitemia de tipo ondulante; describiéndose en las primeras tres semanas picos altos y en los días restantes de la infección se observaron picos más bajos de parasitemia. Caso contrario lo ocurrido con Perrone (2.003), quien trabajo con 6 aislados de *T. evansi*, de los cuales dos de ellos fueron utilizados en la presente investigación (Teva 1 y Mantecal) lo que permite establecer comparación entre ambas investigaciones. Perrone infectó ratones, en donde pudo observar en todos los casos un aumento progresivo de la parasitemia hasta llegar a causar la muerte de los animales; igualmente nuestros resultados difieren con los encontrados en Brasil por Queiroz (1.999), quien observó el mismo comportamiento que el del experimento de Perrone, pero en 3 de 9 aislados estudiados utilizando ratas Wistar como modelo experimental.

En la presente investigación de infectividad se encontró que el inóculo experimental utilizado (1- 2 x 10⁶ parásitos totales) fue capaz de infectar a los tres ovinos para los aislados Teva 1, R-38 y Mantecal provenientes de caballo (Estado Apure) sin embargo la parasitemia descrita en nuestra investigación no fue incrementándose con el transcurso de los días ni condujo a la muerte de los animales

infectados, lo que puede observarse en los otros casos descritos anteriormente donde aislados de *T. evansi* son capaces de desarrollar parasitemias agudas hasta conducir a la muerte en ratones. No obstante es importante destacar que la infectividad del parásito no sólo depende del inóculo sino también del hospedador, es decir de la capacidad que éste tenga para responder inmunológicamente al parásito.

Los resultados obtenidos en éste experimento mostraron que los tres aislados utilizados: Teva 1, R-38 y Mantecal, se comportaron de manera muy similar, lo que quiere decir que en los tres casos se describió una parasitemia de tipo ondulante y que como se había mencionado anteriormente en las tres primeras semanas se registraron los picos más altos de parasitemia y los días subsiguientes se encontraron picos más bajos. En el aislado Teva 1 se describieron los dos picos más importantes de parasitemia en los días 8 y 18 con valores máximos aproximados de 30.000 parásitos/ml y 25.000 parásitos/ml respectivamente. De los tres aislados estudiados el pico más alto de parasitemia registrado fue el de R-38 con un valor aproximado de 79.000 parásitos/ml para el día 12 post-infección. Y por último el aislado Mantecal registró sus dos picos mayores de parasitemia los días 8 y 12 con un valor aproximado de 49.000 parásitos/ml. Estos picos de parasitemia difieren de los encontrados en ratones por Perrone en 2.003, quien encontró que en los aislados Teva 1 y Mantecal se describían parasitemias mucho mayores a las descritas en la presente investigación; para Teva 1 encontró una parasitemia máxima de 4.2 x 109 parásitos/ml y para Mantecal 9.6 x 10⁹ parásitos/ml. Además se encontró en nuestra investigación que en las infecciones con T. evansi las parasitemias son del tipo críptica, características propias de un estado crónico de la enfermedad (es decir, parasitemia no detectable). Estas observaciones concuerdan con los resultados descritos por Onah y col. en 1.996 en infecciones experimentales con T. evansi en 6 ovinos en África, donde se observó un estado crónico de la enfermedad con recuperación espontánea, en dos de los casos estudiados.

La presente investigación representa es el primer estudio en nuestro país donde se determina si aislados venezolanos de *T. evansi* son capaces de infectar ovinos. En Venezuela se ha reportado la infectividad de éstos parásitos en otros hospedadores tales como chigüires, asnos, ratones (como modelo experimental) entre otros Perrone (2.003), pero no en este hospedador el cual ha sido descrito en otros países como un hospedador natural de *Trypanosoma evansi* (Singh, 1.998). Así como también estudios recientes han demostrado que parásitos similares al *T. evansi* como lo es el *T. vivax* si es capaz de infectar a ovinos en nuestro país (Rojas, 2.003). Considerando que los ovinos son pequeños rumiantes capaces de ser infectados con aislados venezolanos de *T. evansi*, los resultados obtenidos en el presente trabajo pueden ser extrapolados a otros rumiantes que también se pueden ver afectados por dichos parásitos, además de esto es importante señalar que los ovinos son capaces de controlar la enfermedad y perdurar en el tiempo con ella e incluso llegar hasta la autocuración o recuperación espontánea como lo señalado por Onah y col. en 1.996, dato de importancia para futuras investigaciones.

Con respecto a los valores hematológicos en infecciones con tripanosomas, los mismos están delimitados por muchos factores como por ejemplo la virulencia del parásito (considerada, en éste caso, como el número de muertes en función del tiempo), la susceptibilidad que presente el hospedador y por supuesto el período de infección durante el cual son tomadas las muestras, entre otros factores. Luckins (1.998) describe que las infecciones en ovinos con *Trypanosoma evansi* del tipo crónico se presentan con síntomas clínicos poco distintivos, entre los cuales se destaca la anemia, fiebres recurrentes, pérdida de peso y pérdida también de la condición física. En el presente trabajo no se observaron casos de anemia en los ovinos infectados, ha pesar de que hubo días en los cuales los valores de hematocrito y de glóbulos rojos disminuyeron levemente en comparación con los valores normales durante los primeros días de la infección. Luego hacia los últimos 30 días del experimento los valores de las variables ya nombradas volvieron a su rango estándar, lo cual indica un estado crónico de la enfermedad en los ovinos infectados

experimentalmente con los tres aislados de *T. evansi*. Audu y col. (1.999) describen valores bajos de hematocrito y glóbulos rojos incluso después del día 70 post-infección, valores con los cuales coinciden los picos más altos de parasitemia en su investigación . Sin embargo en el caso de los ovinos infectados experimentalmente con los aislados Teva-1, R-38 y Mantecal se observa, a diferencia de los resultados obtenidos por Audu y col. (1.990) que los valores hematológicos se mantuvieron en el rango de los valores normales.

Con respecto a los glóbulos blancos registrados en los resultados, se pudo señalar un ligero aumento en sus valores, a pesar de que en general se mantuvieron entre los rangos normales descritos en la literatura (Benjamín, 1.984), sin embargo es probable que ese aumento se haya originado como consecuencia de la infección con el parásito (recordando que los glóbulos blancos o leucocitos son las células del cuerpo encargadas de la defensa del organismo) y por la incapacidad del sistema inmune para eliminar completamente los parásitos del torrente sanguíneo, tal cual como lo señala Onah y col. en 1.996.

Tomando en cuenta el segundo síntoma descrito por Losos en1.986; fiebres recurrentes, se puede decir que en el caso de nuestro estudio los ovinos infectados experimentalmente, en determinadas ocasiones se registraron aumentos relevantes de la temperatura corporal, dichos aumentos de la temperatura coincidieron con los picos de parasitemias registrados y con los días cercanos a ellos. Según Audu y col. (1.999), es posible que éste aumento se genere debido a desordenes metabólicos del hospedador cuando hay parásitos circulantes, o también puede ser ocasionado por la segregación de metabolitos que pueden actuar como agentes piréticos por parte de los tripanosomas en los procesos de hemólisis. Por otro lado se puede decir que en los días finales de la experimentación (donde los picos de parasitemias eran bajos e incluso indetectable) la temperatura corporal de los ovinos se mantuvo entre los valores normales.

Según los resultados descritos y discutidos anteriormente, evaluando las variables hematológicas y no hematológica estudiadas en la siguiente investigación, se puede señalar la posibilidad de que los ovinos pueden comportarse como reservorios mostrándose poco susceptibles a la enfermedad (Tripanosomosis); tal cual como son considerados actualmente tanto en África como en Asia.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

- Los estudios realizados a lo largo de la presente investigación, mostraron que los aislados venezolanos de T. evansi (Teva1, R-38 y Mantecal) son capaces de infectar experimentalmente ovinos generando en los mismos bajas parasitemias y desarrollando un estado crónico de la enfermedad (Tripanosomosis).
- Los resultados arrojados durante el curso de la infección señalaron que la parasitemia descrita en los ovinos infectados experimentalmente con los tres aislados de *T. evansi* (Teva 1, R- 38 y Mantecal) es de tipo ondulante.
- La infección de los ovinos causada por el parásito T. *evansi* generó cambios poco significativo en los niveles registrados de hematocrito, hemoglobina, glóbulos blancos y glóbulos rojos, todo esto ocurrió durante la primera etapa de la investigación, es decir las primeras 3 semanas. Hacia los últimos días se observó que ha pesar de que aún se encontraban parásitos en sangre, los niveles de todas las variables tomadas volvieron a sus valores normales.
- En el modelo ovino, los tres aislados utilizados se comportaron de manera muy similar, desde el punto de vista infectivo; lo cual nos sugiere que la capacidad de infectar del parásito, depende entre otros factores del hospedador y la respuesta de su sistema inmune.

- Debido a que la infección en los ovinos perduró durante los 80 días, manteniendo las dos primeras semanas picos altos de parasitemia y el resto picos bajos y en algunas ocasiones no se registró parásitos, esto lo que nos indica que estos animales (al igual que el Chigüire y otros animales) pueden actuar como reservorios del parásito T. evansi, al menos en nuestro país.
- Las recomendaciones que se pueden ofrecer es que después de ésta investigación son muchos los trabajos que se pueden realizar bajo ésta misma línea, ya que aún queda mucho por descubrir; y que evaluando las proteínas encontradas en suero de ovino, estudiando el sistema inmune de los mismos, se puede llegar a encontrar una posible vacuna contra dicho parásito, para que de ésta forma no siga eliminando animales en los establos y haciendas.

BIBLIOGRAFÍA

- ARCAY DE PERAZA, L. Comportamiento de una cepa de *Trypanosoma* venezuelense, Mesnil 1.910, aislado de *Hidrochoerus hidrochaeris* de los Llanos venezolanos en animales de laboratorio. Acta Científica 27, 131-132. 1.976.
- ARIAS J., García F., Rivera M., López R." *Trypanosoma evansi* in capybara from Venezuela". Journal of Wildlife Disease. 33:359-361. 1.997.
- BELMAR A., Reinhold C ."Infectividad de aislados venezolanos de *Trypanosoma evansi* en ratones NMRI (mus musculus)", trabajo especial de grado para optar a título de Licenciado en Educación, Mención Ciencias Biológicas, Universidad Católica Andrés Bello, Caracas, 2.001.
- BENJAMÍN, Maxine M. "Manual de Patología Clínica en Veterinaria", Editorial Limusa, México. 1.984. pág. 58.
- BORST P., Fase-Fowlr F. Gibson W. "Kinetoplast DNA of *Trypanosoma evansi*". Molecular and Biochemical Parasitology. **23**:31-38. 1.987.
- BRENER, Z. "The behavior of slender and stout forms of *Trypanosoma cruzi* in the blood-stream of normal and immune mice". Ann. Trop. Med. Parasitol. **63**: 215-20. 1.969.
- BRUN R., Hecker H. y Lun Z-R. "Tripanosoma evansi y Tripanosoma equiperum: distribution, biology, treatment and phylogenetic relationship". Vet. Parasitology. **79**: 95-107.1.998.
- DESQUENSES M, Dávila A.M. "Application of PCR-based tools for detection and identification of animal trypanosomes: a review and perspectives". Veterinay Parasitology. **109** (3-4):213-231. 2.002.
- GARCÍA F., Rivera M., Ortiga M., Suárez C. "Tripanosomosis Equina Causada por *Trypanosoma evansi* en Tres Hatos Ganaderos del Estado Apure, Venezuela". Revista de la Facultad de Ciencias Veterinarias- UCV. 41: 91-100. 2.000.

- GIARDINA S. y García F. "Hemoparásitos: Biología y Diagnóstico". Editorial Cuadernos, U.S.B. 1.990.
- HERRERA H., Alessi A., Marques L., Sanana A., Aquino L., Mesezes R., Moraes M., Machado R. "Experimental *Trypanosoma evansi* infection in South American Coati (Nasua nasua): Hematological, biochemical and histopathological changes". Acta Tropica. **81**:203-210. 2.002.
- HOARE C. "The Trypanosomes of mammals". A zoological monographs. Blackell Scientific Publication. Oxford. 1.972.
- LAEMMLI, U.K. "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4". Nature **259**: 680-685. 1.970.
- LEVINE, N.D. "Tratado de Parasitología Veterinaria". Editorial Acribia, Zaragoza.1.991.
- LUCKINS A.G. "Epidemiology of non-tsetse-transmitted Tripanosomosis-Trypanosoma evansi in perspective" Newsletter on Integrated Control of Pathogenic Trypanosomes and their Vectors. 1.999.
- NUNES V., Ohiro E. "*Tripanosoma* (Tryoanozoom) *evansi* in the coati from the Pantanal region of Mato Grosso do Sul State, Brazil". Trans R Soc Trop Med Hyg. **84**(5): 692. 1.990.
- ONAH, D.N., Hopkins, J., and Luckins, A.G. "Hematological changes in sheep experimentally infected with *Trypanosoma evansi*". Parasital Research: 82: 659-663. 1.996.
- PERRONE, T. "Variación Antigénica en un Aislado venezolano de *Trypanosoma evansi*", trabajo final presentado como requisito para optar al título de Magíster en Ciencias Biológicas, Universidad Simón Bolívar, Caracas, 1.992.
- PERRONE T. "Tipificación de aislados venezolanos de *Trypanosoma* evansi", trabajo final presentado como requisito para optar al título de Doctor en Biología Celular especialidad en Bioquímica, Universidad Simón Bolívar, Caracas, 2.003.

- RANGEL, R. "Nota Preliminar sobre la Peste Boba y Derrengadera de los equinos de los Llanos de Venezuela (Tripanosomosis)". Gac. Med. Caracas 12: 105-113. 1.905.
- REYNA-BELLO A., García F., Rivera M., Sanso B., Aso P. "Enzyme-linked inmunoabsorbent assay (ELISA) for detection of anti-*Trypanosoma evansi* equine antibodies". Vet Parasitol. 80(2): 149-157. 1.998.
- RIVERA A., Manuel A." Hemoparasitosis Bovina", Universidad Central de Venezuela, Caracas, 1.996.
- ROJAS, Nereida. "Comparación Clínica, Inmunológica y Molecular de Aislados Venezolanos de *Tripanosoma evansi* y *Tripanosoma vivax*". trabajo especial de grado para optar a título de Licenciado en Biología Molecular. Universidad Central de Venezuela. Caracas, 2.003.
- SINGH, D.P. "Epidemiological Study on *Trypanosoma evansi* Infection among living wild animal in India". Journal of Protozoolgy Research 8: 139-143. 1.998.
- SOULSBY, E.. "Parasitología y Enfermedades Parasitarias en los Animales Domésticos".7^{ma} Edición. Nueva Editorial Interamericana. México.1.987.
- STEVENS J., Nunes V., Lanham S., Oshiro E. "Isozyme characterizaction of *Trypanosoma evansi* isolates" Molecular and Biochemical Parasitology. **43**. 167-180 1.989.
- TEJERA E. y LEGER J. Tripanosomosis animales en Venezuela. Bull. Soc. Path. Exot. 13: 297-305. 1.929.
- TOWBIN H., Staeheling T., Gordon J. "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications". Proc. Natl. Acad. Sci. USA **76**: 4350-4354. 1.979.
- TURNER C.M. "Trypanosome variant surface glycoprotein" *in* "The Biology of Parasitism". MBL Lectures in Biology vol. 9, Alan Liss Inc. Editors Paul T. Englund and Alan Sher. New York. USA. .1.988.

- VICKERMAN K. Y BARRY J. "African Trypanosomiasis. In: Immunology parasitic infection. Edit by Cohen and K. S. Warren. Second Edition Blackwell. 205-260. 1.982.
- WOO P. "The haematocrit centrifuge for detection of trypanosomes in blood". Canadian Journal of Zoology. 1.969.47:921-923.

REPÚBLICA BOLIVARIANA DE VENEZUELA UNIVERSIDAD CATÓLICA ANDRÉS BELLO FACULTAD DE HUMANIDADES Y EDUCACIÓN ESCUELA DE EDUCACIÓN, ESPECIALIDAD BIOLOGÍA Y QUÍMICA

"INFECCIÓN EXPERIMENTAL DE OVINOS CON TRES AISLADOS DE

Trypanosoma evansi".

Trabajo especial de grado para optar a título de Licenciado en Educación, Mención Biología y Química

Autor: Carmen Victoria Carpio

Tutor: Trina Perrone

Cotutor: Armando Reyna