

TESIS
ED 2001
B4

ESCUELA DE EDUCACIÓN
ESPECIALIDAD CIENCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDAD CATÓLICA ANDRÉS BELLO
FACULTAD DE HUMANIDADES Y EDUCACIÓN



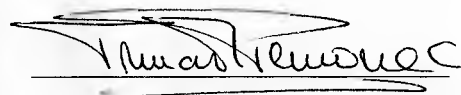
“Infectividad de aislados venezolanos de *Trypanosoma evansi* en
ratones NMRI (*Mus musculus*)”
Trabajo Especial De grado para optar a título de
Licenciado en Educación, Mención Ciencias Biológicas

Nombre de los autores: Ana María Belmar
Carolina Reinhold
Nombre del tutor: Perrone Trina Mercedes

Caracas, Octubre de 2001

En mi carácter de Tutor del Trabajo de Grado titulado: “Infectividad de diferentes aislados venezolanos de Trypanosoma evansi en ratones NMRI (*Mus musculus*)”, realizado por Ana María Belmar y Carolina Reinhold para optar al título de Licenciado en Educación, Mención Ciencias Biológicas, considero que dicho trabajo reúne los requisitos y méritos suficientes para ser sometido a su defensa oral y evaluación por parte del Jurado examinar designado.

En Caracas, a los 8 días del mes de Octubre de 2001.



LIC. TRINA PERRONE
CI. 6892528

AGRADECIMIENTOS

A nuestras familias; por apoyarnos y haber estado junto a nosotras en todo momento.

A nuestra tutora, la Profesora Trina Perrone, por su dedicación y oportunas observaciones para la elaboración del trabajo experimental y escrito.

Al profesor, Pedro Aso, por brindarnos la oportunidad de realizar nuestro trabajo especial de grado en su laboratorio y por su grandiosa colaboración en todo momento.

Al Bachiller Roshman González, por su valiosa colaboración y por su sincera amistad.

Al personal Obrero del Bioterio de la Universidad Simón Bolívar, por su insistente paciencia y colaboración.

Finalmente a la Escuela de Educación de la Universidad Católica Andrés Bello por su influencia en nuestra formación científica y moral, y a la Universidad Simón Bolívar por

proporcionarnos la infraestructura necesaria en la realización del trabajo.

A todas aquellas personas que de una u otra forma han permitido la realización de este trabajo experimental.

ÍNDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS	i
ÍNDICE GENERAL	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	v
ÍNDICE DE TABLAS	ix
INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS	35
MATERIALES Y MÉTODO	36
1. Reactivación de los aislados a <u>T. evansi</u>	36
1.1 Parásitos.....	37
2. Animales experimentales.....	38
3. Infección experimental de los ratones.....	39
3.1 Inóculo suministrado.....	39
3.2 Vía de inoculación.....	39
4. Medición de variables de referencia al día cero y de forma interdiaria hasta la muerte del último animal experimental infectado.....	40
4.1 Tiempo de medición de las variables.....	40
4.2 Toma de muestras.....	40

4.3	Obtención de muestras de sangre.....	41
4.4	Medición de la concentración de Hemoglobina.....	41
4.5	Medición del Hematocrito.....	42
4.6	Conteo de número de Glóbulos Rojos.....	43
4.7	Determinación de la Parasitemia.....	43
4.8	Peso.....	47
4.9	Mortalidad.....	47
5.	Comparación de los aislados.....	47
RESULTADOS.....		48
1.	Parasitemia.....	48
2.	Hematocrito.....	54
3.	Hemoglobina.....	58
4.	Eritrocitos.....	64
5.	Peso Corporal.....	70
DISCUSIÓN.....		79
CONCLUSIÓN.....		93
BIBLIOGRAFÍA.....		96

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1.- Curso de la parasitemia en ratones NMRI infectados con <i>Trypanosoma evansi</i> : Cedral 12.....	48
FIGURA 2.- Curso de la parasitemia en ratones NMRI infectados con <i>Trypanosoma evansi</i> : El Frío.....	49
FIGURA 3.- Curso de la parasitemia en ratones NMRI infectados con <i>Trypanosoma evansi</i> : Mantecal	50
FIGURA 4.- Curso de la parasitemia en ratones NMRI infectados con <i>Trypanosoma evansi</i> : USR.....	50
FIGURA 5.- Curso de la parasitemia en ratones NMRI infectados con <i>Trypanosoma evansi</i> : TeGubTrino.....	52
FIGURA 6.- Curso de la parasitemia en ratones NMRI infectados con <i>Trypanosoma evansi</i> : TeGub323.....	52
FIGURA 7.- Valores de Hematocrito en ratones NMRI infectados con <i>Trypanosoma evansi</i> : Cedral 12.....	55
FIGURA 8.- Valores de Hematocrito en ratones NMRI infectados con <i>Trypanosoma evansi</i> : El Frío.....	55
FIGURA 9.- Valores de Hematocrito en ratones NMRI infectados con <i>Trypanosoma evansi</i> : Mantecal.....	55

FIGURA 10.- Valores de Hematocrito en ratones NMRI infectados con <u>Trypanosoma evansi</u> : USR.....	56
FIGURA 11.- Valores de Hematocrito en ratones NMRI infectados con <u>Trypanosoma evansi</u> : TeGubTrino	57
FIGURA 12.- Valores de Hematocrito en ratones NMRI infectados con <u>Trypanosoma evansi</u> : TeGub323..	57
FIGURA 13.- Valores de Hematocrito en ratones NMRI: Control..	58
FIGURA 14.- Concentración de Hemoglobina en ratones NMRI infectados con <u>Trypanosoma evansi</u> : Cedral 12.....	59
FIGURA 15.- Concentración de Hemoglobina en ratones NMRI infectados con <u>Trypanosoma evansi</u> : El Frío.....	60
FIGURA 16.- Concentración de Hemoglobina en ratones NMRI infectados con <u>Trypanosoma evansi</u> : Mantecal.....	61
FIGURA 17.- Concentración de Hemoglobina en ratones NMRI infectados con <u>Trypanosoma evansi</u> : USR.....	61
FIGURA 18.- Concentración de Hemoglobina en ratones NMRI infectados con <u>Trypanosoma evansi</u> : TeGubTrino.....	62
FIGURA 19.- Concentración de Hemoglobina en ratones NMRI infectados con <u>Trypanosoma evansi</u> : TeGub323.....	62

FIGURA 20.- Concentración de Hemoglobina en ratones NMRI: Control.....	64
FIGURA 21.- Concentración de eritrocitos en ratones NMRI infectados con <i>Trypanosoma evansi</i> : Cedral 12.....	65
FIGURA 22.- Concentración de eritrocitos en ratones NMRI infectados con <i>Trypanosoma evansi</i> : El Frío.....	66
FIGURA 23.- Concentración de eritrocitos en ratones NMRI infectados con <i>Trypanosoma evansi</i> : Mantecal.....	67
FIGURA 24.- Concentración de eritrocitos en ratones NMRI infectados con <i>Trypanosoma evansi</i> : USR.....	67
FIGURA 25.- Concentración de eritrocitos en ratones NMRI infectados con <i>Trypanosoma evansi</i> : TeGubTrino.....	68
FIGURA 26.- Concentración de eritrocitos en ratones NMRI infectados con <i>Trypanosoma evansi</i> : TeGub323.....	69
FIGURA 27.- Concentración de eritrocitos en ratones NMRI: Control.....	70
FIGURA 28.- Determinación de Peso Corporal en ratones NMRI infectados con <i>Trypanosoma evansi</i> : Cedral 12.....	71
FIGURA 29.- Determinación de Peso Corporal en ratones NMRI infectados con <i>Trypanosoma evansi</i> : El Frío.....	71

FIGURA 30.- Determinación de Peso Corporal en ratones NMRI infectados con <u>Trypanosoma evansi</u> : Mantecal.....	72
FIGURA 31.- Determinación de Peso Corporal en ratones NMRI infectados con <u>Trypanosoma evansi</u> : USR.....	73
FIGURA 32.- Determinación de Peso Corporal en ratones NMRI infectados con <u>Trypanosoma evansi</u> : TeGubTrino.....	74
FIGURA 33.- Determinación de Peso Corporal en ratones NMRI infectados con <u>Trypanosoma evansi</u> : TeGub323.....	74
FIGURA 34.- Determinación de Peso Corporal en ratones NMRI: Control.....	75

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA I.- Datos de los aislados de <i>Trypanosoma evansi</i> utilizados en la metodología experimental.....	37
TABLA II.- Porcentaje de infectividad, Número de sobrevivientes y Tipo de Parasitemia de los aislados estudiados.....	77

INTRODUCCIÓN

De todas las enfermedades de interés veterinario y biomédico, las enfermedades parasitarias constituyen una grave problemática en las regiones tropicales y neo-tropicales del mundo.

Las enfermedades hemoparasitarias de animales, constituyen un serio problema económico ya que causan grandes pérdidas en el ganado bovino, ovino, equino, entre otros; en este sentido, representan un obstáculo en la producción de leche, carne, cueros, lanas fibras y otros productos de origen animal, sobre todo en los países del tercer mundo (Palmer y col. , 1985).

En Venezuela, los hemoparásitos flagelados del género ***Trypanosoma*** son los agentes etiológicos de la enfermedad denominada Tripanosomiasis, que afecta tanto animales domésticos y salvajes como al hombre (Honinberg, 1963).

En Venezuela la tripanosomiasis animal es causada fundamentalmente por ***Trypanosoma vivax*** y ***Trypanosoma evansi***, siendo este último el agente causal de la tripanosomiasis

equina conocida como “Derrengadera” (Venezuela), “Murrina” (Panamá) y “Surra” (India) (Soulsby, 1988).

Según la OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES (2000), la tripanosomiasis causada por el *T. evansi* es considerada como una enfermedad perteneciente a la Lista B, en donde se agrupan aquellas enfermedades transmisibles 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. Estas enfermedades son por lo general objeto de un informe anual, aunque en algunos casos, de acuerdo con lo dispuesto en los Artículos 1.1.3.2 y 1.1.3.3 del *Código Zoosanitario Internacional*, pueden ser objeto de informes más frecuentes (http://www.oie.int/esp/maladies/es_classification.htm).

1. *Trypanosoma evansi*:

1.1 Historia y distribución:

El *Trypanosoma evansi* es un protozoo flagelado que fue descubierto por Evans en 1880, quien lo observó en sangre de

camellos y caballos afectados por una enfermedad endémica conocida en el viejo mundo como “Surra”. En Venezuela, fue observado por primera vez por Rafael Rangel en 1905, 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, asignándole el nombre de *Trypanosoma venezuelense* (Hoare, 1972).

Rangel consideraba que la epizootia conocida como “Derrengadera” de los equinos era lo mismo que la “Peste boba”, siendo Kubes (1939) quien separa definitivamente estas dos enfermedades. Rangel envía frotis de sangre a Mesnil (1910), quien los estudia y le encuentra semejanzas con el *Trypanosoma equinum*, agente productor del “Mal de caderas” en Sudamérica y especialmente con *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 específica si se trata de una nueva especie o de una variedad de *T. evansi* (Arcay de Peraza, 1976).

Leger y Tejera (1920) 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 (1950) establece que *Trypanosoma venezuelense* y *Trypanosoma evansi* son indistinguibles.

Este parásito está ampliamente distribuido en las regiones del Norte y Este de África, Asia, Centroamérica y Sudamérica. En Venezuela se les encuentra principalmente en los Estados Guárico y Apure (Rivera, 1996). Esta ubicación no es a causa del clima, que en las regiones tropicales tiene una influencia indirecta sobre la enfermedad al condicionar la producción agrícola y por tanto la nutrición. De una manera más directa, los climas cálidos y húmedos de las selvas tropicales y las regiones pantanosas favorecen el desarrollo de las moscas y mosquitos transmisores de la tripanosomiasis (Luckins, 1988).

1.2 Clasificación:

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 tripanosomiasis animal están: *Trypanosoma brucei* , *Trypanosoma evansi*, *Trypanosoma vivax* , *Trypanosoma equinum* , *Trypanosoma equidermun* y *Trypanosoma congolense*. Estos hemoparásitos son responsables de la tripanosomiasis 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 tripanosomiasis que afecta diferentes tipos de ganado y animales domésticos en el continente americano (Hoare, 1972; Soulsby, 1988).

La ubicación taxonómica del *T. evansi* es Reino Protista, Phylum Sarcomastigophora, Subphylum Mastigophora, Clase Zoomastigophora, Orden Kinetoplastidae, Suborden Trypanosomatina y Familia Trypanosomatidae (Gómez Rodríguez, 1956).

1.3 Enfermedad y Transmisión:

Desde el punto de vista epizootiológico, son parásitos Eurixenos obligatorios ya que infectan a una gran variedad de hospedadores

vertebrados, siendo la condición parasitaria absolutamente indispensable para la vida de los mismos; por otro lado son patógenos para ciertas especies a la vez que producen infecciones crónicas en aquellas especies que funcionan o participan como reservorios naturales (Rossi, 1994)

Entre los principales hospedadores de este parásito se encuentran: Camellos, equinos y caninos. Además, puede infectar asnos, bovinos, búfalo, elefante, tapir, tigre y venado (Hoare, 1972). En Sudamérica se ha identificado el chigüire o capibara como reservorio, con incidencia del 26%, el cual pudiera jugar un papel muy importante en la epidemiología de la enfermedad (Reverón, 1992).

Arias Núñez (1993), estudiando dos poblaciones de chigüire, sugiere que éstos constituyen un elemento importante en la epidemiología de la tripanosomiasis en las regiones enzoóticas, contribuyendo al mantenimiento de la infección de *Trypanosoma evansi* y juega un papel importante en la transmisión entre diferentes especies de animales (equinos, bovinos, vectores y reservorios) que comparten estos ecosistemas.

Trypanosoma evansi se multiplica en el hospedador vertebrado por fisión binaria longitudinal y se piensa que no tiene hospedador intermedio. El parásito se transmite de manera mecánica o acíclica entre hospedadores a través de vectores tales como el murciélago e insectos dípteros, succionadores de sangre, particularmente por tabánidos (mosca del caballo) y *stomoxys calcitrans* (mosca brava de los establos), estos insectos inoculan el parásito a mamíferos sanos en un intervalo de 15 minutos después de que se han alimentado de un animal infectado (Luckins, 1988).

El murciélago hematófago (*Desmodus rotundus*) en Centro y Sudamérica ha sido incriminado como eficiente transmisor de *T. evansi* el cual actúa como vector y hospedador pudiendo adquirir la infección a través de la mucosa bucal cuando se alimenta de animales infectados, ya que el parásito atraviesa la mucosa, y al multiplicarse en su sangre aumenta la posibilidad de transmisión (Hoare, 1965, 1972; Losos, 1980).

Los parásitos sobreviven en sangre ingerida, presente en las piezas bucales de los tábanos, por lo tanto, la eficiencia de la transmisión depende del intervalo entre alimentación (picadura) y densidad de vectores. La capacidad de transmisión disminuye

marcadamente en un tiempo mayor a ocho (8) horas después de alimentarse el vector sobre el hospedador infectado. T. evansi es incapaz de desarrollarse cíclicamente en tabánidos y en la mosca tse-tse (Losos, 1980).

1.4 Morfología:

Este parásito se caracteriza por presentar la forma de tripanosoma o tripomastigote y fusiforme, de 15 a 36 micras de largo y de 3 micras de ancho aproximadamente (Gómez Rodríguez, 1956). Estos tripanosomas se caracterizan por ser células alargadas, con un núcleo en posición central, redondeado y compacto. En una posición subterminal o marginal, se localiza el kinetoplasto, organelo que contiene ácido desoxirribonucleico (ADN) y que forma parte de la mitocondria. La función locomotora es desempeñada por un flagelo libre, que tiene su origen en el extremo posterior, a nivel del cuerpo basal, además presenta una membrana plasmática ondulante bien desarrollada con pliegues pronunciados, la cual mide de 8 a 10 nm. de espesor y sobre ésta se observa una capa uniforme de glicoproteínas variables de superficie (VSG), la cual cubre todo el parásito incluyendo el flagelo (Hoare, 1972).

2. Variación Antigénica:

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. Estos antígenos son importantes para el inmunodiagnóstico. 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 protectora 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 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 10^7 copias de esta glicoproteína (Turner, 1985, 1988).

Donelson y Turner (1985) postularon que el proceso consiste en variar las glicoproteínas variables de superficie (VSG) mediante un proceso denominado variación antigénica, 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 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. Sin embargo, algunos parásitos sobreviven debido a que durante la fase de multiplicación ellos han cambiado la expresión de un diferente tipo 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 (Turner, 1982; Vickerman y Barry, 1985).

Los VAT's originados durante la infección temprana se denominan VAT's predominantes (Gray, 1965). En cada onda de parasitemia existe una población predominante denominada Homotipo o Serotipo principal, mientras que las poblaciones menores se denominan Heterotipos. Los heterotipos aparecen antes que los anticuerpos contra la población homotípica pueda ser detectada. Cada variable antigénica heterotípica puede convertirse en población homotípica en las subsecuentes ondas de parasitemia. Esto sugiere que la variación antigénica es un proceso en el que existe una predisposición genética más que un proceso de selectividad por parte del sistema inmune del hospedador. Los VATs o poblaciones predominantes se consideran característicos de aislados particulares. El repertorio de diferentes VAT's se denomina Serodema. A partir de diferentes aislados de campo se pueden reconocer distintos serodemas, lo cual tiene importancia desde el punto de vista de clasificación de tripanosomas en estudios epidemiológicos (Grav y Luckins, 1976).

Esto sugiere que dicho proceso es una de las estrategias más efectivas desarrolladas por los endoparásitos para evadir la respuesta inmunitaria de sus hospedadores, y se hace presente no sólo en

protozoarios como los tripanosomas, sino también en varias especies bacterianas tales como *Borrelia* y *Neisseria* (Turner y Donelson, 1990; Borst, 1991).

El comportamiento antigénico de un aislado venezolano endémico de *T. evansi* fue estudiado por Perrone (1992), en donde demostró que aislados Sudamericanos de este tripanosoma utilizan el mecanismo de variación antigénica al igual que sus parientes africanos.

A principio de siglo se había reportado que el número de tripanosomas en la sangre de un animal infectado fluctuaba dramáticamente con el tiempo. La mejor caracterización de esas ondas de parasitemia sucesivas fue realizada por Ross y Thomson en 1910 (citado por Turner en 1990). Ellos sistemáticamente examinaron la sangre de un paciente infectado con tripanosomas y demostraron que un pico de parasitemia era seguido por la disminución del número de parásitos y luego por la aparición de un segundo pico dos semanas después. Estos y otros investigadores especularon que una nueva onda de parasitemia estaba compuesta por tripanosomas que, de alguna manera, habían escapado a la acción de anticuerpos dirigidos contra los parásitos del primer pico

de parasitemia. Esto ocurrió 60 años antes de que la relación entre tripanosomas y el sistema inmune pudieran ser bien entendidos (Turner, 1990).

La inadecuada respuesta inmune podría ser el resultado de la habilidad que exhibe el T. evansi para cambiar su carácter antigénico durante el curso de la infección, expresando diferentes VSG's. Los antígenos expresados son predominantemente glicoproteínas. Entre los antígenos de las cepas patógenas, las siguientes variedades son reconocidas:

- a) Antígenos específicos o variante específico, los cuales están presentes en los tripanosomas intactos y estimulan la producción de anticuerpos sólo contra el antígeno homólogo, se consideran de carácter protectorio o inmunogénico y están representados por antígenos externos.
- b) Antígenos internos que son liberados en el torrente sanguíneo después de la disrupción de los parásitos y tiene la capacidad de estimular la producción de anticuerpos dirigidos contra antígenos de diferentes cepas o especies (Perrone, 1992).

Aparentemente dos factores intervienen en el mecanismo de defensa del hospedador:

- Defensa celular representada por la fagocitosis.
- Defensa humoral representada por anticuerpos con actividad tripanolítica (Gómez Rodríguez, 1956; Hoare, 1972 y Boero, 1974).

Cabe destacar que los estudios de variación antigénica se han efectuado con tripanosomas africanos y con aislados de T. evansi de origen africano, mientras que en aislados de estos tripanosomas en América es muy poco lo que se conoce (Hörchner, 1984; Jores y Mc Kinnell, 1984, 1985^a, 1985^b).

Hörchner y col. (1984), mediante la técnica de lisis dependiente de complemento y usando suero mono-específico contra poblaciones variables antigénicas, demostraron en tres conejos infectados con un clon de T. evansi aislado de una cepa de Java, seis poblaciones diferentes. Las poblaciones aisladas fueron heterogéneas, sobre todo en las fases tardías de la enfermedad. Cada onda de parasitemia estuvo formada por una variante antigénica principal y variantes

antigénicas menores que no son afectadas por la acción lítica del suero y contribuyen a formar las nuevas variantes antigénicas principales de las subsiguientes ondas de parasitemia.

Jones y Mc Kinnell (1984) utilizando la técnica de Lisis e Inmunofluorescencia, demostraron que un clon de T. evansi obtenido a partir de un aislado de Sudán, originó 11 variables antigénicas en un conejo infectado con el clon y coincidió con los demás autores en que cada onda de parasitemia estaba formada por una variable antigénica principal y una mezcla de variables menores.

Para efectuar el diagnóstico de la tripanosomiasis los métodos más frecuentemente utilizados son: el diagnóstico clínico, el parasitológico o directo y las técnicas serológicas. Sin embargo, el diagnóstico clínico presenta una gran dificultad, debido a que la enfermedad no muestra signos patognomónicos y por lo tanto es muy difícil poder reconocer el agente etiológico solo por la presencia de síntomas (Reyna, 1991). En cuanto a las técnicas parasitológicas Molyneaux (1975) y Bakos y Bustamante (1982) las dividieron en tres grupos diferentes dependiendo del fundamento de la prueba:

1. Frotis de sangre o ganglios linfáticos, con o sin tinción (Giemsa, Romanoski, Leichman's, etc)
2. Concentración de los tripanosomas presentes en sangre o en linfa, para facilitar su observación al microscopio óptico. Entre ellos la técnica de concentración de hematocrito (Woo, 1979) y centrifugación y purificación por cromatografía de intercambio aniónico (Lanham y Godfrey, 1971).
3. Inoculación de animales susceptibles con sangre del animal sospechoso de tripanosomiasis.

Estos métodos directos, si bien son útiles tienen como principal desventaja la producción de resultados erróneos en un orden del 20 al 25% o más (Weiman, 1963); además, solo son efectivos en los estados agudos de la enfermedad, cuando los parásitos colonizan la sangre ocasionando una alta parasitemia que es fácilmente observable a través de cualquier método directo, pero debido a las oscilaciones de la parasitemia durante el curso de la enfermedad, este tipo de diagnóstico puede resultar poco sensible (Luckins y col.,

1978; International Laboratory for Research on Animal Diseases "ILRAD", 1988).

Por estas razones se ha tratado de diagnosticar la enfermedad con precisión antes que el animal pierda su condición física, para tales fines, se ha acrecentado el uso de pruebas inmunológicas con mayor sensibilidad que las técnicas parasitológicas o directas. Estas técnicas se basan en la identificación de anticuerpos circulantes, específicos contra el agente causal de la enfermedad (Moulyneaux, 1975).

Moulyneaux (1975) y García (1990) hacen una descripción sobre los métodos parasitológicos y los divide en:

I. **Métodos Standard de Detección (MSDT)**: consiste en examinar preparaciones de sangre con la finalidad de detectar la existencia de parásitos en dicha sangre.

I.I **Frotis fresco**: es un método de fácil realización, con la desventaja de que no detecta parasitemias bajas y la morfología del parásito es difícil de observar.

I.II **Frotis coloreado:** es sencillo de realizar y facilita la observación morfológica de los tripanosomas al microscopio.

I.III **Frotis de ganglio linfático:** este método se realiza de forma similar al método de frotis coloreado, con la diferencia de que en este se utiliza linfa extraída mediante la punción de un ganglio linfático.

II **Métodos de Concentración (MC):** estas pruebas tienen la finalidad de aumentar la posibilidad de detectar los tripanosomas, mediante la agrupación en un mayor volumen de sangre comparado con las MSDT.

II.I **Separación de los tripanosomas de las células sanguíneas del hospedador:** consiste en purificar los tripanosomas con la finalidad de obtener una mayor concentración de los parásitos y así facilitar su observación al microscopio.

II.II **Técnica de Microcentrifugación (TMC):** (Woo, 1969). Para realizar esta técnica se utiliza un tubo capilar el cual es llenado con la muestra de sangre y se centrifuga a 12.000 r.p.m. durante cinco minutos, lo que permite una mayor probabilidad de detectar los

tripanosomas, debido a que estos se localizan entre la capa de glóbulos blancos y el plasma, permitiendo su visualización.

García (1988) mediante la TMC observó un curso fluctuante de cinco a seis ondas de parasitemia en caballos infectados experimentalmente con T. evansi.

En caballos infectados naturalmente con el T. evansi se han reportado infecciones activas mediante la técnica de microcentrifugación de 12,14% (García, 1989^a), de 8,4% (García, 1989^b) y de 8,42% (Rivera, 1992).

Stevens (1989) en chigüires silvestres y criados en cautiverios, mediante la TMC encontraron un 27% y 58% de infección activa de T. evansi, respectivamente.

Nunes y Oshiro (1990) utilizaron la TMC en un examen a T. evansi de varias especies de animales silvestres (roedores, carnívoros, edentatas, artiodáctilos) en el Sur de Brasil y Reverón (1992) mediante el uso de la TMC encontró una prevalencia del orden de 13,26% a T. evansi en chigüire del hato El Frío Estado Apure, Venezuela.

III **Inoculación de Animales Experimentales:** esta técnica consiste en inocular sangre de un animal sospechoso en un susceptible con la finalidad de obtener un diagnóstico y además puede ser utilizada para aislar cepas de tripanosomas. En el caso de infecciones de T. evansi puede dar buenos resultados debido a la gran susceptibilidad que presentan los animales experimentales (ratón, rata y cobayo) a esta especie de tripanosoma (García, 1990).

Clark y Dunn (1933) mediante la inoculación en cobayos con sangre de bovinos encontraron una positividad de 4.5% a T. evansi.

Pegram y Scott (1976) mediante la inoculación en animales de laboratorio encontraron un 36,5% de prevalencia a T. evansi en camellos en el sur de Etiopía y Raisanghani y Swarnkar (1992) reportan un 94,44% de positividad a T. evansi de 54 camellos clínicamente sospechosos en Rajasthan, India, mediante la inoculación de sangre en ratas blancas.

Dillman y Townsend (1979) en el Valle de Luangwa encontraron una positividad de 100% a Trypanozoom en animales silvestres mediante el uso de la inoculación de un roedor de laboratorio.

Nunes y Oshiro (1990) en un estudio en animales sospechosos a T. evansi encontraron una prevalencia del orden de 25% de los coatí (***Nasua nasua***) examinados mediante la inoculación en roedores de laboratorio en Mato Grosso, Brasil.

3. Características de las poblaciones:

a) Localización de los parásitos en el huésped:

Iriarte (1941) localizó el T. evansi en fragmentos de órganos: hígado, bazo, pulmón, riñón y páncreas de cobayos infectados experimentalmente con T. evansi mediante frotis por aposición.

En ratones infectados experimentalmente con T. evansi Schroeder y col. (1972) han localizado el parásito en el corazón, pulmón, riñón, bazo y médula ósea, mediante el uso de frotis por aposición coloreados con Giemsa al 10%.

En el roedor silvestre Proechimys (Morales y Carreño, 1976) localizaron el T. evansi en todos los órganos examinados (bazo, hígado, riñón, corazón).

Mediante el empleo de la técnica inmunohistoquímica el T. evansi ha sido localizado en los siguientes órganos: cerebro, hígado, bazo, riñón, pulmón y epidídimo de ratas infectadas experimentalmente y en el cerebro de búfalos infectados naturalmente (Sudarto y col., 1990)

De Stefano y col. (2001) demostraron que la tripanosomiasis causa una serie de desórdenes reproductivos en diversas especies animales, incluyendo daños en las gónadas. Ellos estudiaron por Microscopía Electrónica de Transmisión las posibles alteraciones ultraestructurales del testículo en ratones NMRI infectados con T. evansi (aislado de caballo, 1991. Edo. Apure, Venezuela). Los resultados no mostraron evidencias de alteraciones ultraestructurales en las fases de la espermiogénesis observadas, además la presencia de células de Leydig con una gran cantidad de retículo endoplasmático liso, indican un funcionamiento (esteroidogénesis) normal. La ausencia de alteraciones en el tejido estudiado sugirieron que el parásito no cruza la barrera durante la infección.

4. Curso de la Infección:

Trypanosoma evansi parasita en sangre y linfa de sus hospedadores. La enfermedad natural es casi siempre fatal, la muerte sobreviene desde 1 a 2 semanas hasta 6 meses post-infección (Luckins, 1988).

El curso de la infección por T. evansi depende de varios factores tales como susceptibilidad del hospedador, cepa del parásito, severidad de la enfermedad, condiciones epidemiológicas y diversidad de hospedadores en determinadas regiones. Caracterizándose la enfermedad por presentar un curso agudo y crónico, con sucesión de crisis y relapsos. Luego de un período de incubación de cuatro a nueve días, los tripanosomas invaden la sangre, aumentando la parasitemia con el aumento de la temperatura del hospedador y declina cuando esta desciende (Hoare, 1972; Losos, 1980).

Siguiendo con la sintomatología de la enfermedad, tenemos la fiebre que es del tipo recurrente, puede durar dos o tres días, luego la temperatura se normaliza rápidamente o se hace subnormal. La fiebre aparece con intervalos apiréticos y parece estar asociada con un gran número de tripanosomas en la sangre. Conjuntamente con

las variaciones de la temperatura se van desarrollando distintos tipos de anemia (Woo, 1977; Losos, 1980; García, 1988).

La anemia es una enfermedad caracterizada por una disminución anormal en el número de glóbulos rojos (eritrocitos) o en su contenido de hemoglobina, lo que produce un déficit de oxígeno en los tejidos periféricos de los animales infectados. Las anemias se pueden clasificar en dos grandes grupos: las anemias arregenerativas, que se deben a una disminución en la producción de las células precursoras de eritrocitos o a una alteración de componentes fundamentales de los glóbulos rojos, que es la hemoglobina; y las anemias regenerativas o periféricas, debido a una pérdida excesiva de glóbulos rojos o a un aumento en la destrucción de estas células debido a la infección. Otro tipo de anemia es la ferropénica, que se debe a un déficit de hierro, lo que origina una alteración de la síntesis de hemoglobina (Woo, 1977; Losos, 1980; García, 1988).

Conjuntamente con los síntomas ya descritos, los valores de hemoglobina pueden descender hasta un 25% y el número de glóbulos rojos disminuye hasta aproximadamente $2 \cdot 10^6$ por mm^3 . A pesar de que los animales pueden conservar el apetito, enflaquecen

en forma marcada (emaciación). Luego de un mes de infección, el animal tiene debilidad muscular con manifestaciones nerviosas y trastornos locomotores. Los animales enfermos presentan incoordinación (dificultad para caminar), marcha tambaleante, arrastre de los miembros posteriores, debilidad, caída de la grupa y postración. En etapas finales hay relajamiento del esfínter anal, se mantienen agonizantes y finalmente mueren (Woo, 1997; Losos, 1980; García, 1988).

El curso de la infección experimental y patogenicidad de aislados de *Trypanosoma evansi* fue investigado por Audu y col. (1999) usando 8 ovejas Yankasa infectadas. Los resultados mostraron que todas las ovejas infectadas fueron positivas al parásito y que el período de prepatencia osciló entre los 3 a los 6 días. Dicho parásito produjo parasitemias ondulantes, por lo que describieron dos tipos de enfermedades una aguda (de 4 a 14 días de post-infección) y una crónica (de 43 a 59 días de post-infección).

En un experimento similar, ONAH y col. (1996) analizaron los cambios hematológicos producidos por un aislado de *Trypanosoma evansi* en ovejas. Los resultados de su investigación mostraron que dicho parásito produce una enfermedad de tipo crónica,

caracterizada frecuentemente enigmática parasitemia, con auto-curación en dos casos, a causa de una leucocitosis; resultado de una marcada linfocitosis la cual significa una elevación del conteo de glóbulos blancos; cambios considerados como obvios en animales que se auto-curan.

5. Modelos Experimentales:

Como modelos de laboratorio se incluyen acure, rata, conejo y ratón (Moulineux y Asford, 1983).

Es conocido que cepas de tripanosomas de mamíferos aisladas de animales naturalmente infectados cambian considerablemente su comportamiento cuando son mantenidas en laboratorios por pasajes directos en ratones (Fairban & Culwick, 1947; Willet & Fairban, 1955; Soltys & Woo, 1970).

En nuestro país ha sido estudiado el comportamiento de T. evansi en animales de laboratorio por varios autores (Tejera, 1920; Iriarte, 1941; Escorza, 1955) reportando que el T. evansi se hace menos virulento en ratón después de varios pases a través de conejos.

6. Susceptibilidad de los ratones:

Los animales silvestres han demostrado mayor resistencia a los tripanosomas africanos (T. vivax, T. congolense y T. brucei) en comparación a los animales domésticos (Murray y col., 1982; Mulla y Rickamn, 1988).

Kubes (1939) en un estudio experimental con una cepa de T. evansi logró altas parasitemias en ratas, ratones, cobayos, chigüires y perros. No obstante, en los bovinos, porcinos, conejos y ovinos infectados no observó la presencia del parásito en su sangre. Sin embargo, al inocular sangre de las tres primeras especies en cobayos, ésta resultó infectante. Y así mismo Vogelsang y Armas (1946), inocularon sangre de un equino con T. evansi a un bovino sin lograr la infección, al inocular sangre de este animal en cobayos resultó infectante, comprobando así el carácter de reservorio de los bovinos para la enfermedad en el campo.

En forma experimental, se ha logrado infectar por vía oral con T. evansi, perros y ratones blancos, al suministrárseles sangre y heces de animales positivos mezclados con leche (Díaz Ungría y

Zeuss, 1971; Schroeder y col., 1972) y carnívoros al consumir carne de animales infectados por Tripanosomas salivarios pueden contraer la tripanosomiasis a través de la mucosa oral (Elmasian y Migone, 1904 y Losos, 1980).

Iriarte (1941) observó que los cobayos presentan mayor resistencia al T. evansi que las ratas y los ratones. Arcay de Peraza et al. (1980) observaron diferencias en la susceptibilidad y resistencia en animales de laboratorio (ratón, rata y cobayo) inoculados con una cepa de T. evansi aislada de un chigüire, comportándose menos patógena que la cepa aislada de un equino.

Gill (1971), estudió comparativamente la susceptibilidad a la infección de T. evansi entre diferentes hospedadores, observando que el ratón fue la especie más susceptible, mientras que el acure es algo resistente, pero el perro, caballo y conejo son más resistentes que esta especie.

Previos trabajos en el laboratorio mostraron que al comparar seis cepas de ratones enfrentadas con un aislado de campo encontró que el modelo más susceptible era la cepa de *mus musculus* en NMRI, cepa heterocigota criada en el IVIC . Una vez identificado este

modelo experimental se pudo utilizar para conocer cuales son las características de infectividad de distintos aislados de campo de T. evansi, en función de variables hematológicas, parasitológicas, entre otros (Arvelo, 1999).

En relación a la inmunidad de la tripanosomiasis causada por el T. evansi se ha demostrado que cuando los hospedadores logran recuperarse de la infección, adquieren resistencia contra las cepas homólogas. No obstante son susceptibles a la infección con cepas heterólogas (Arcay de Peraza y col., 1980).

Los mecanismos de defensa contra la tripanosomiasis están representados por factores humorales y celulares, cuya importancia es relativa a la infección. Ambos mecanismos dependen del sistema retículo-endotelial ó del sistema macrófago-linfoide y no pueden ser vistos como independientes. En el caso de la fagocitosis, las células del hospedador actúan como un todo, en tanto que en el caso de las reacciones antígeno-anticuerpo, los elementos reactivos son liberados por estas células y tienen un efecto directo sobre los parásitos ó indirecto si se sensibilizan a éstos para ser fagocitados (Hoare, 1972).

El tipo de inmunidad adquirida por animales que han registrado la infección, se piensa que es concomitante o de tolerancia, estado conocido como premunición. Este tipo de inmunidad protege al hospedador de la reinfección por la cepa homóloga, pero no contra cepas heterólogas, como resultado el parásito no es eliminado, lográndose solo controlar la multiplicación excesiva, resultando así una infección latente (Hoare, 1972).

La susceptibilidad de los ratones blancos a T. evansi ha sido estudiada con aislados provenientes de caballo y de chigüires observando marcadas diferencias respecto a la virulencia, concluyendo que el aislado proveniente de caballo presenta mayor virulencia y agresividad (Arcay de Peraza, 1980).

Los aislados de T. evansi obtenidos de caballo, presentan parasitemias muy altas en los ratones blancos, las cuales por lo general ascienden verticalmente hasta el séptimo día en el cual el número de tripanosomas asciende a un valor infinito y se produce la mortalidad total de los ratones, mientras que un aislado de T. evansi proveniente de chigüire la parasitemia asciende lentamente, presenta picos y desciende hasta la muerte de los ratones con una parasitemia baja (Arcay de Peraza, 1980).

La parasitemia experimental de T. evansi en ratones blancos es un proceso continuo cuyo período de incubación varía con la dosis de parásitos inoculados. El proceso finaliza con la muerte de los ratones cuando la densidad parasitaria es mayor a $12 \cdot 10^5$ tripanosomas por ml de sangre. El aumento del número de tripanosomas en los ratones es un proceso inverso a los parásitos que se multiplican (J.V. Escorza; C.D. Boyer, 1955).

Arcay de Peraza y col. (1980), estudió el comportamiento de una cepa de T. evansi, aislada de chigüire en diferentes animales de laboratorio (ratón, rata y acure) y la compararon con una cepa de origen equino. Observaron diferencias en la susceptibilidad y resistencia en los animales inoculados, lo cual estuvo relacionado con el tipo de cepa. La cepa aislada de chigüire infectado en forma natural fue mucho menos virulenta.

7. Valores Normales de los Ratones:

La sangre del ratón es comúnmente obtenida realizando un corte en la punta de la cola del mismo, aunque puede obtenerse

también realizando una punción cardíaca, bajo anestesia con eter (O.W. Schalm; N.C. Sain; E.J. Carroll, 1975).

Heinecke (1963) concluye que la composición de la sangre de ratón puede cambiar, en algunos casos por el sexo, el tamaño o el tiempo de separación de la sangre.

La composición de la sangre fetal a los 17 días de gestación y la composición de la sangre postnatal desde el día del nacimiento hasta los 24 meses de edad ha sido ampliamente investigada, determinando los parámetros hematológicos característicos de la misma. En la sangre fetal del ratón se observa un número de eritrocitos alrededor de los 3.3 millones por μl de sangre de los cuales la mitad contiene núcleo. Los mismos aumentan rápidamente hasta los 9 o 10 millones, pero en la novena semana de vida, se presenta una reducción de 8 a 9 millones hasta los 12 meses y de 7 a 8 millones hasta los 24 meses.

La concentración de hemoglobina en la sangre de ratón blanco sigue un modelo similar al que muestra el número de eritrocitos, con la excepción de que la reducción inicial se da a las dos semanas de nacido y es cuando existe de 14.5 a 15.5 gr. hasta los 9 meses,

seguido por otra reducción de 12 a 13.5 gr. hasta los 24 meses de vida.

Desde la cuarta semana en adelante la hembra tiene valores ligeramente más altos de hemoglobina y glóbulos rojos que el macho.

Las diferencias entre el sexo son mínimas, pero la influencia en los números de eritrocitos y su tamaño es evidente. Los números de eritrocitos y la hemoglobina alcanzan sus máximos valores a los dos o tres meses de vida, seguida de una reducción gradual durante el resto del primer año de vida.

8. Importancia:

Hasta el momento las diferentes medidas implementadas para el control adecuado de la Tripanosomiasis han fracasado debido a una serie de factores de índole epidemiológicos, geopolíticos, ecológicos y parasitológicos. Esto implica que se deben ahondar estudios en diferentes áreas de investigación y en este sentido investigaciones sobre la inmunología de la Tripanosomiasis tienen una gran justificación con el fin de generar resultados que permitan

comprender aspectos patológicos, desarrollos de técnicas de inmunodiagnóstico e implementación de métodos inmunoprolácticos (ILRAD, 1987).

Así mismo en Venezuela se conoce muy poco sobre el comportamiento parasitológico de distintos aislados de T. evansi sobre un mismo hospedador. Estos estudios pueden ser de gran importancia para comprender por qué existen no solo diferencias en la susceptibilidad de distintos hospedadores ante un mismo aislado sino también, si existen diferencias en las características infectivas de distintos aislados ante un mismo hospedador. El conocimiento de las características infectivas de aislados de este parásito pudieran en posteriores estudios relacionar su comportamiento infectivo con marcadores específicos (proteínas, ácidos nucleicos, etc) que a su vez pudieran ser utilizados como blanco de compuestos químicos así como el uso de vacunas para el control de la enfermedad.

En función a lo anteriormente escrito, los objetivos del presente trabajo son:

OBJETIVO GENERAL: Determinar características hematológicas, no hematológicas y parasitológicas de ratones susceptibles NMRI durante la infección con distintos aislados de *Trypanosoma evansi*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Estimar los niveles de parasitemia en ratones sometidos a la infección con cada uno de los aislados de *Trypanosoma evansi*.
- Determinar los niveles máximos y promedios de parasitemia.
- Relacionar el grado de parasitemia, producida por distintos aislados, en ratones NMRI con variables hematológicas (hematocrito, concentración de hemoglobina y número de glóbulos rojos) y no hematológicas (peso).
- Determinar la mortalidad en función de la infectividad producida por los diferentes aislados de *Trypanosoma evansi*.

MATERIALES Y MÉTODO

El desarrollo experimental se realizó a través de las siguientes etapas:

1. Reactivación de los aislados de **Trypanosoma evansi**.
2. Animales experimentales.
3. Infección experimental de los ratones con los diferentes aislados de T. evansi.
4. Medición de parámetros de referencia al día cero y de forma intermedia hasta la muerte del último animal experimental infectado.
5. Análisis estadístico de los datos obtenidos.

1. Reactivación de los aislados de T. evansi:

1.1. Parásitos:

El material parasitológico inicial constó de seis aislados de campo de **Trypanosoma evansi** cuyos datos de identificación se presentan a continuación:

Aislado	Fecha	Hospedador	Lugar	Procedencia
<i>Cedral12</i>	Marzo 2000	Chigüire	Edo. Apure Hato El Cedral	Salida de campo
<i>TeGubtrino</i> <i>TeGub323</i>	Noviembre 1999	Burro	Edo. Guárico Hato Terecay	Salida de campo
<i>USR</i> (Perrone, USB)	No determinado	Caballo	Edo. Apure	Donado por la USR- CEVIT
<i>Manteca</i> (Arvelo, 1999) ¹	Diciembre 1996	Caballo	Edo. Apure	Donado por el Med. Vet Emir Espinoza
<i>El Frío</i> (Perrone, USB)	Abril 1992	chigüire	Edo. Apure Hato El Frío	Inés Reverón

Tabla I. Datos de los aislados de Trypanosoma evansi utilizados en la metodología experimental.

De estos seis aislados, tres fueron los objetivos de este trabajo y los restantes fueron realizados anteriormente y utilizados en la presente tesis como motivo de comparación.

Los parásitos fueron resuspendidos 1:1 en Dimetil Sulfoxido (DMSO) al 5% en tampón fosfato salino glucosado a pH 8 (PSG) (monofosfato de sodio 20 mM, difosfato de sodio di hidratado 20 mM,

cloruro de sodio 0.8%, glucosa 1%) y criopreservados en nitrógeno líquido para experimentos posteriores.

Los aislados de T. evansi a utilizar fueron descongelados y posteriormente expandidos por inoculación intraperitoneal (IP) en dos ratones hembras NMRI inmunosuprimidas (IS) con ciclofosfamida (Endoxan) a una dosis de 200 mg/Kg de peso, tres horas antes de ser inoculados con los parásitos (aproximadamente 70 µg/ratón).

Una vez alcanzado valores de parasitemia de 10^5 parásitos/ml se sangraron los ratones por punción cardíaca, utilizando EDTA 0,1 M como anticoagulante y la sangre obtenida fue diluida hasta una concentración de 200 parásitos/ml. Esto representó el material parasitológico inicial, con el cual se inocularon los animales experimentales.

2. Animales experimentales:

Se utilizaron ratones NMRI hembras de ocho (8) semanas de edad, con un peso aproximado de 29-32 gr.

Para el ensayo se utilizaron treinta (30) ratones por aislado de *T. evansi*, distribuidos en tres (3) jaulas con diez (10) ratones cada una. Tres de ellos representó el grupo experimental y el grupo control estuvo constituido por una jaula con diez (10) ratones inoculados con solución fisiológica. Cada ratón tanto los experimentales como controles fueron marcados individualmente con Ácido Pícrico al 10%.

3. Infección experimental de los ratones:

3.1 Inóculo suministrado:

Se pesaron los ratones para suministrar un inóculo de uno a dos parásitos por gramo de peso de cada uno de los seis aislados. Los ratones tuvieron un peso promedio de 30 gr, por lo que fueron inoculados con 150 μ l de una solución de 200 parásitos/ml.

3.2 Vía de inoculación:

Los ratones fueron inoculados por vía subcutánea, en el pliegue dérmico de la zona interauricular, detrás de la base del cráneo.

4. Medición de variables de referencia al día cero y de forma interdiaria hasta la muerte del último animal experimental infectado:

4.1 Tiempo de medición de las variables:

Las variables a medir se revisaron de forma interdiaria. Previo a la inoculación, se determinaron los valores de las variables estudiadas y fueron tomadas como día cero. Luego de la infección experimental se hicieron mediciones sucesivas hasta la muerte del último ratón experimental.

4.2 Toma de muestras:

Para la toma de muestras se sangraron cuatro (4) ratones por jaula escogidos a través de números aleatorios generados en Microsoft Excel al 40% de la población, correspondiente a los ratones marcados.

4.3 Obtención de muestras de sangre:

Aproximadamente 40 μ l de sangre fueron extraídos en capilares heparinizados a partir de la vena caudal, mediante un corte en la punta de la cola del ratón.

Esto representó el material inicial para la medición de las variables hematológicas (hemoglobina, glóbulos rojos y hematocrito), parasitológicos (parasitemia) y no hematológicos (peso y mortalidad).

4.4 Medición de la concentración de hemoglobina:

Para la medición de la concentración de hemoglobina en la sangre se utilizó el método de la cianometahemoglobina (O.E.A., 1980).

Para ello se tomaron 10 μ l de sangre de cada muestra y adicionalmente 10 μ l de un patrón de hemoglobina comercial de concentración conocida. Dichas muestras se disolvieron en un tubo de ensayo con 2,5 ml de solución de Drabkin (bicarbonato de sodio 0.1%, ferricianuro de potasio 0.02%, cianuro de potasio 0.005%). Las

mismas se incubaron por diez (10) minutos (para garantizar una completa reacción entre la hemoglobina y la solución de Drabkin) y se determinò la absorbancia a 540 nm en un espectrofotómetro. Una vez obtenida la absorbancia de la muestra se calculó la concentración de hemoglobina en gs/dl utilizando la siguiente fórmula:

$$G/d = \frac{Abs.de.la.muestra}{Abs.del.patron} \cdot Concentración.del.patron$$

4.5 Medición del hematocrito:

Los valores hematocrito, es decir, el volumen de glóbulos rojos empaquetados se determinó mediante la técnica del microhematocrito. Para ello se utilizaron los capilares heparinizados con los 40 µl de sangre y se centrifugaron a 12.000 r.p.m. durante cinco (5) minutos en una microcentrífuga clínica (Clay Adams, Autocrit Ultra 3). El valor del hematocrito se expresó como el porcentaje de eritrocitos con relación al volumen total de sangre utilizando una tabla de hematocrito comercial Critocap.

4.6 Conteo de número de glóbulos rojos:

Para el conteo de glóbulos rojos se tomaron 5 μ l de sangre del material de partida y se diluyeron en 5 ml de líquido de Marciano (una solución de citrato trisódico al 3%, formol al 1%), obteniendo así una dilución 1/1000. Diez microlitros (10ul) fueron colocados en una cámara de Neubauer contando así la cantidad de glóbulos rojos presentes en cinco (5) recuadros centrales de dicha cámara.

El número de glóbulos rojos se calculó según la siguiente fórmula:

$$\text{Glóbulos rojos/mm}^3 = \frac{\text{células contadas en 5} \times \text{factor de dilución} \times 5 \times 10}{\text{recuadros centrales}}$$

4.7 Determinación de la parasitemia:

La parasitemia se determinó según el método de Brenner (1959), para ello fueron utilizadas: una pipeta ajustable de 20 μ l, láminas portaobjetos, láminas cubreobjetos de 22 x 22 mm, EDTA y un microscopio marca DIALUX con oculares de 10X y 40X.

Se tomaron 5 μ l de sangre de ratón y se colocaron en una lámina portaobjetos, se cubrieron con un cubreobjetos de 22 x 22 mm y se extendieron de manera que abarcara uniformemente el área de la lámina cubreobjetos una vez extendida la sangre, se contaron 100 campos en el microscopio y se registró tanto el número de campos como el número de parásitos.

El número de parásitos presentes en un ml de sangre se determinó a través de la siguiente fórmula:

$$\# \text{ parásitos/ml} = Tc \times F \times 200 \times \text{dilución}$$

Tc = Número de tripanosomas contados

F = Factor de conversión, el cual viene dado en función al número de campos contados (mínimo 10 y máximo 100 ó que sean múltiples de 5).

El factor de conversión (F) es un valor que se relaciona con el área de visión y el número de campos observados al microscopio a un aumento dado (aumento del objetivo x aumento de los oculares) y es particular para cada microscopio. Para medir el área de visión de un

microscopio a un aumento dado se utiliza un portaobjeto calibrado denominado micrómetro de platino, con el cual se calculó utilizando un ocular de 10X y un objetivo 40X. En estas condiciones, el diámetro del campo de visión del microscopio DIALUX es igual a 0,35 mm. El área del mismo (utilizando la misma fórmula de la circunferencia $A = \pi \times r^2$) es igual a 0,961625 mm². El diámetro del campo de visión utilizando oculares de 10X y objetivo de 25X para el mismo microscopio es de 0,56 mm y el área de visión es de 0,246176 mm². Finalmente el diámetro de visión del aumento de 10X x 100X es 0,14 mm y el área es de 0,015386 mm².

La superficie de una lámina de 22 x 22 mm es de 484 mm². El número de campos contenidos en una lámina portaobjetos de 22 x 22 mm es:

$$\# \text{ de campos} = \frac{484\text{mm}^2}{0.0961625\text{mm}^2} = 5.033,147\text{campos}$$

Si se cuentan el número de tripanosomas que hay en un número de campos y se multiplica por el factor de conversión (F), se

obtiene el número de parásitos en 5 μl (mm^3) de sangre. Si se multiplica por 200, se obtiene el # de parásitos/ml.

Se realizaron los siguientes cálculos matemáticos:

Área de visión de un ocular de 10X y un objetivo de 40X = 0.961625 mm^2 (A)

Superficie de la lámina de 22 x 22 mm = 484 mm^2 (S)

$$\# \text{ de campos} = \frac{484\text{mm}^2}{0.0961625\text{mm}^2} = 5.033,147\text{campos}$$

Para calcular el factor de conversión:

$$F_c = \frac{\# \text{ de campos totales del cubreobjeto de } 22 \times 22 \text{ mm}}{\# \text{ de campos contados}}$$

$$\text{Para 100 campos sería: } \frac{5.033,147}{100} = 50,33$$

4.8 Peso:

El peso fue medido en gramos (gr) utilizando una balanza SARTORIUS para pesos de hasta 2,5 Kg.

4.9 Mortalidad:

La mortalidad se calculó registrándolas muertes y los sobrevivientes, haciendo una relación entre la población inicial y los ratones vivos al momento del registro, determinando la tasa de mortalidad:

$$\text{Tasa de mortalidad} = \frac{\text{Número.de.ratones.muertos}}{\text{Número.de.ratones.vivos}}$$

5. Comparación de los aislados:

De cada jaula se tomaron cuatro ratones en forma aleatoria durante el experimento. Cada jaula se consideró una población, que representó una distribución probabilística normal, y seguidamente se realizaron los análisis correspondiente.

RESULTADOS

1. Parasitemia:

El curso de la infección experimental de los aislados de *Trypanosoma evansi* fue seguida interdiariamente durante 41 días y los resultados se muestran en las gráficas a continuación (fig. 1,2,3,4,5 y 6). Los mismos muestran la relación entre los parásitos de sangre y el número de días de duración del experimento.

Las figuras 1 y 2 muestran los valores de parasitemia de los aislados de *T. evansi* obtenidos a partir de sangre de chigüire.

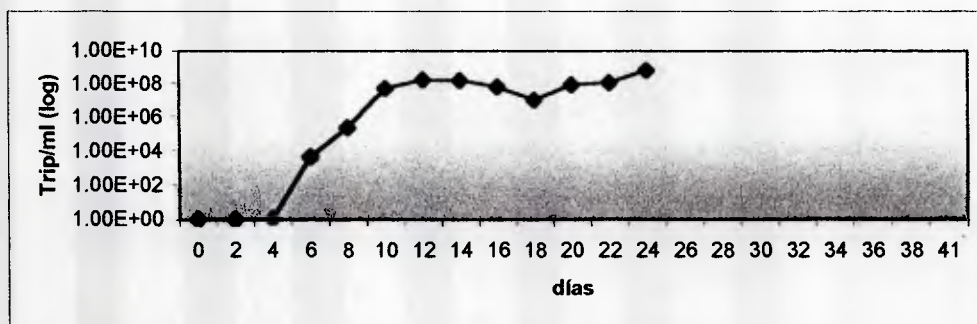


Fig. 1 Curso de la parasitemia en ratones NMRI infectados con *Trypanosoma evansi*: Cedral 12.

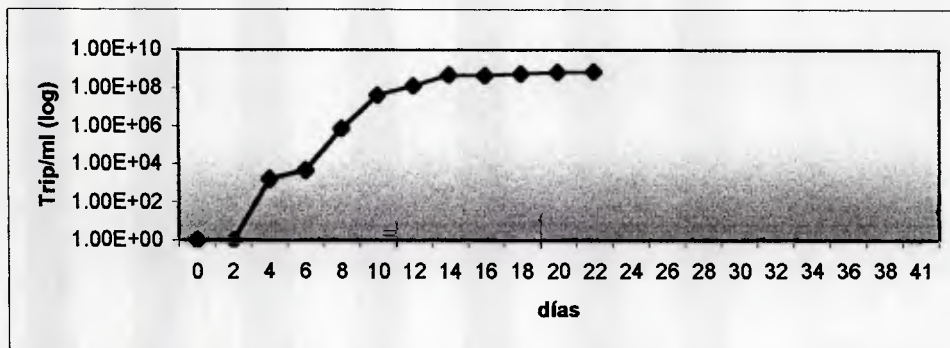


Fig. 2 Curso de la parasitemia en ratones NMRI infectados con *Trypanosoma evansi*: El Frío.

El comportamiento de los aislados provenientes de Chigüire, fue homogéneo. La gráfica muestra que la proliferación de los tripanosomas se inicia en el día 6 para ambos aislados, seguida de un aumento significativo de la multiplicación de los mismos en la sangre, hasta causar la muerte de los animales al día de 25 (fig. 1) y día 22 (fig. 2); sin mostrar ningún tipo de autocuración. Por lo tanto el tipo de parasitemia para estos aislados obtenidos de Chigüire es progresiva, debido al alto nivel de infectividad de los mismos.

En la figuras 3 y 4 se puede observar el curso de la parasitemia de los aislados obtenidos a partir de sangre de caballo, aislado Mantecal (fig. 3) y USR (fig. 4).

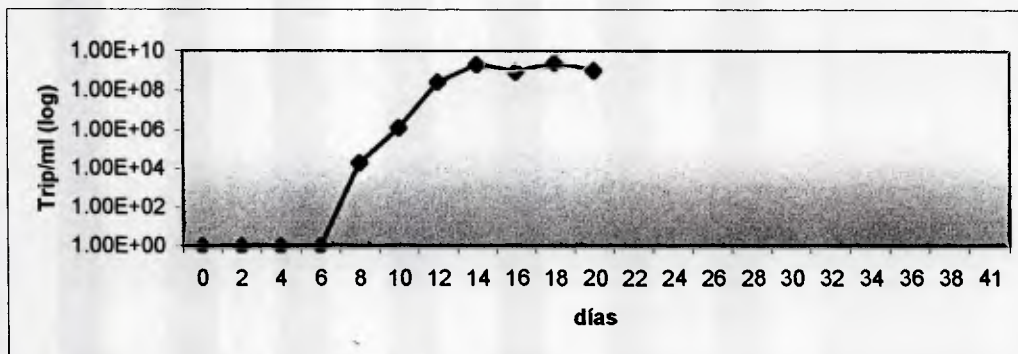


Fig. 3 Curso de la parasitemia en ratones NMRI infectados con *Trypanosoma evansi*: Mantecal.

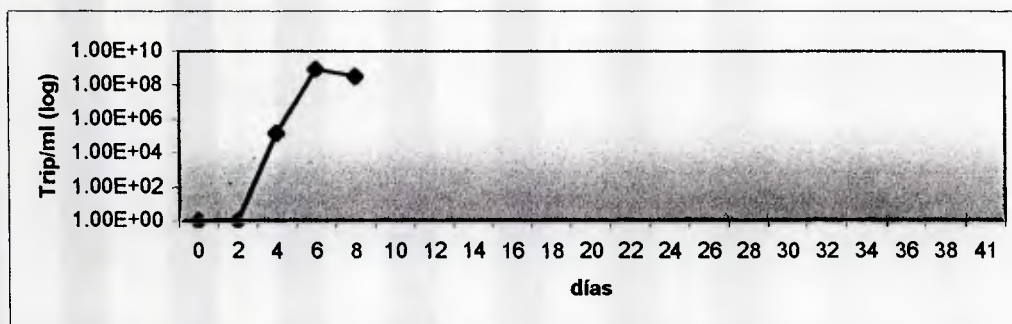


Fig. 4 Curso de la parasitemia en ratones NMRI infectados con *Trypanosoma evansi*: USR.

Como puede observarse en ambas figuras (3 y 4) los aislados, provenientes de caballo, se comportaron de una manera similar a los aislados obtenidos de Chigüire: Cedral 12 y El Frío (fig 1 y 2 respectivamente).

En los aislados de caballo la parasitemia aparece a los 6 días y 4 días post-infección (fig 3 y 4 respectivamente) y aumenta continuamente hasta el día de la muerte del último animal. Esto

demuestra, al igual que en el caso anterior, una alta infectividad. A diferencia de los aislados Cedral 12 y El Frío provenientes de chigüire, los ratones inoculados con aislados de T. evansi obtenidos a partir de sangre de caballo murieron a consecuencias de la infección a los 15 días para Mantecal y 8 días para USR; por lo que se puede deducir que los aislados de caballo son mas agresivos que los de chigüire.

Arcay de Peraza (1980), concluye en experimentos similares que aislados provenientes de caballo presentan mayor virulencia y agresividad a comparación con chigüire. Así mismo observa que las parasitemias de dichos aislados asciende verticalmente hasta el séptimo día en el cual el número de tripanosomas asciende a un valor infinito, produciendo así la mortalidad total de los ratones.

Dichas observaciones muestran que los reasultados obtenidos son fiables, ya que si observamos la tabla II el porcentaje de infectividad fue del 100% para ambos aislados, mostrando entonces la agresividad de los mismos.

En el caso de los aislados TeGubTrino y TeGub323 provenientes ambos de asno, presentan un comportamiento bastante diferente del resto de los casos (fig. 5 y 6 respectivamente).

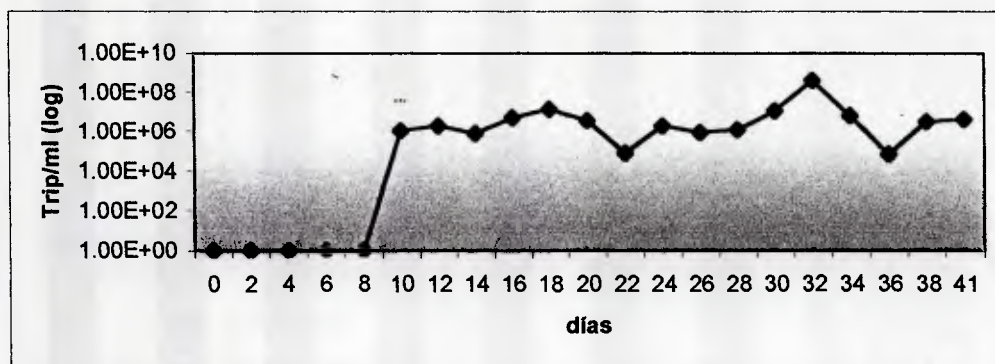


Fig. 5 Curso de la parasitemia en ratones NMRI infectados con *Trypanosoma evansi*: TeGubTrino.

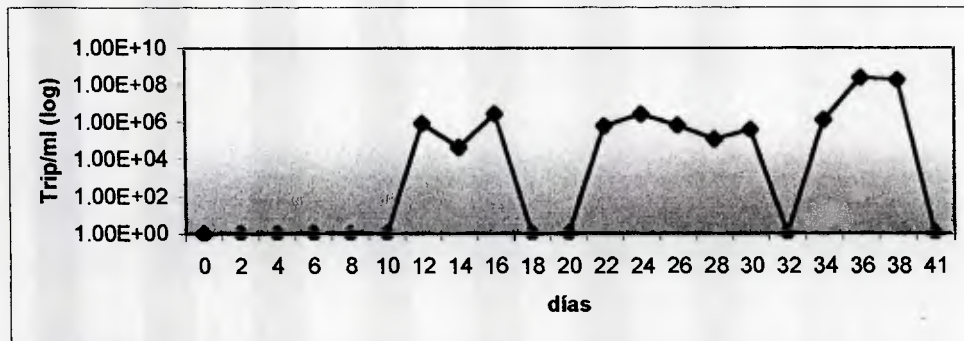


Fig. 6 Curso de la parasitemia en ratones NMRI infectados con *Trypanosoma evansi*: TeGub323.

Para ambos aislados la parasitemia se presentó de tipo ondulante, presentando dos picos y tres picos respectivamente (fig. 5 y 6).

La presencia de picos de parasitemia indica la poca infectividad de los tripanosomas, en comparación con el resto de los aislados obtenidos de caballo y chigüire. Esta poca infectividad permite que el sistema inmune de los ratones logre crear anticuerpos contra dichos parásitos, lo cual induce una disminución drástica del número de los mismos en la sangre del animal.

Como habíamos mencionado en otra oportunidad *Trypanosoma evansi* tiene como mecanismo de adaptación el cambio de ciertas proteínas en su superficie, formándose así nuevos tipos de parásitos. Cuando estos parásitos proliferan, el sistema inmune no los reconoce por lo que se crea una nueva onda de parasitemia y así sucesivamente. Este es el típico mecanismo de variación antigénica que muestran estos parásitos en sus hospedadores naturales.

Comparando ambos aislados de asno, observamos que las ondas de parasitemia presentes en TeGubTrino son menos acentuadas que TeGub323, indicando que el aislado TeGubTrino es

ligeramente más infectivo que el aislado TeGub323. Esto a causa de que los tripanosomas son capaces de cambiar sus proteínas más rápido que el aislado TeGub323. Por ello los ratones NMRI de este experimento en particular lograron un mayor tiempo de supervivencia (mayor a 45 días), a diferencia de los aislados provenientes de chigüire y caballo.

2. Hematocrito:

Una de las variables indicadoras de Anemia como síntoma principal es el hematocrito, que se representa como porcentaje del volumen de glóbulos rojos empaquetados (Perrone, 1992).

Al representar los valores de hematocrito para los aislados Cedral 12 y El Frío (fig. 7 y 8 respectivamente), provenientes ambos de chigüire, observamos una disminución del mismo desde los días 7 y 15 post-infección respectivamente, hasta el día de la muerte del último animal, a diferencia del grupo control en donde se observan continuos aumentos y disminuciones consideradas como un comportamiento normal en el animal y cuyos valores oscilan entre 46 y 50 (fig. 13)

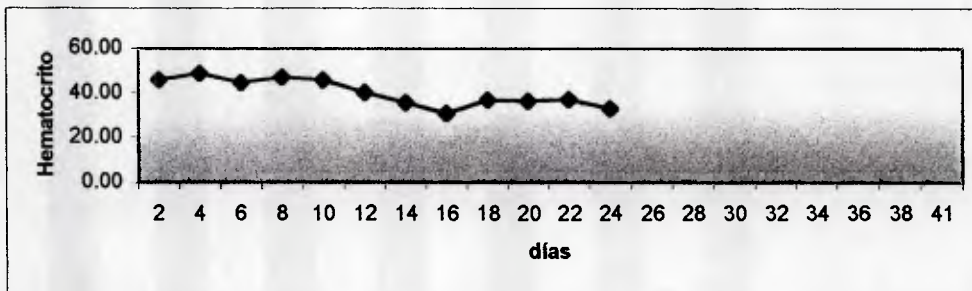


Fig. 7 Valores de Hematocrito en ratones NMRI infectados con *Trypanosoma evansi*: Cedral 12.

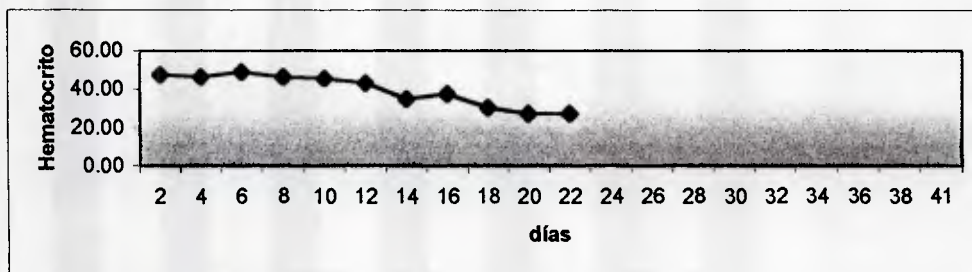


Fig. 8 Valores de Hematocrito en ratones NMRI infectados con *Trypanosoma evansi*: El Frio.

En el caso de los aislados provenientes de caballo, Mantecal y USR (fig. 9 y 20 respectivamente), observamos que el comportamiento es muy similar que en el caso de los aislados de chigüire.

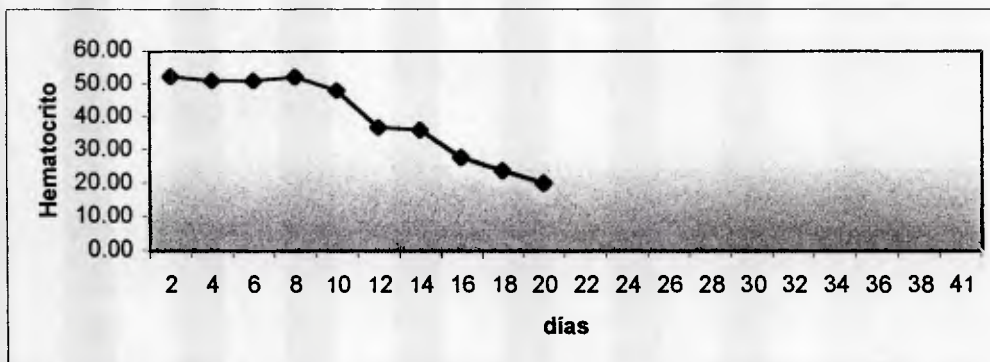


Fig. 9 Valores de Hematocrito en ratones NMRI infectados con *Trypanosoma evansi*: Mantecal.

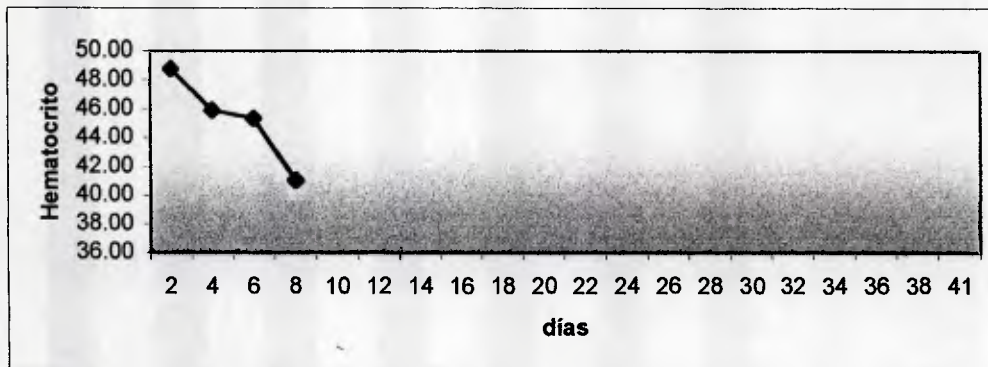


Fig. 10 Valores de Hematocrito en ratones NMRI infectados con *Trypanosoma evansi*: USR.

Los valores de hematocrito inician un significativo descenso a partir de los días 7 y 3 respectivamente hasta el día de muerte del último animal. Sin embargo, en los animales experimentales inoculados con el aislado USR (fig. 10), el descenso del valor de hematocrito inicia el primer día de post-infección lo cual muestra la significativa infectividad de dicho aislado, explicando así el breve período de dicha infección (8 días aproximadamente).

Por último, se muestran los valores de hematocrito de ratones inoculados con aislados provenientes de asno, denominados TeGubTrino y TeGub323.

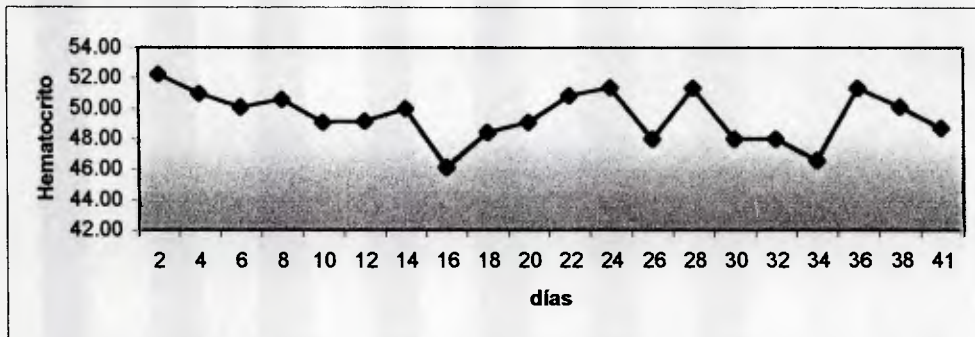


Fig. 11 Valores de Hematocrito en ratones NMRI infectados con *Trypanosoma evansi* : TeGubTrino.

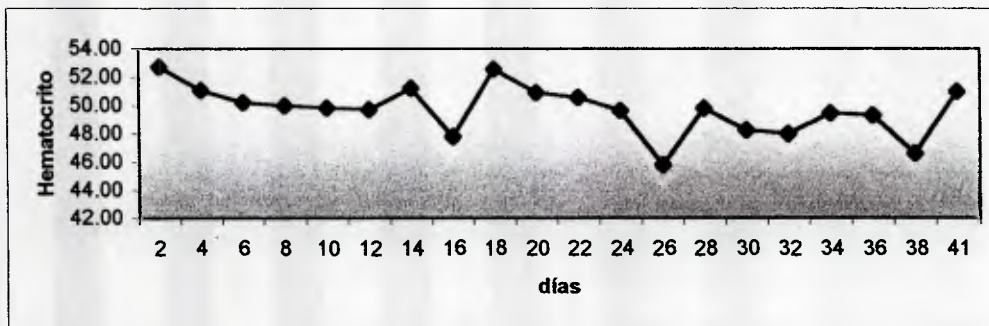


Fig. 12 Valores de Hematocrito en ratones NMRI infectados con *Trypanosoma evansi* : TeGub323.

En dichos gráficos podemos observar el comportamiento normal de los valores de hematocrito para ambos casos, si esto es comparado con el gráfico del grupo control (fig 13).

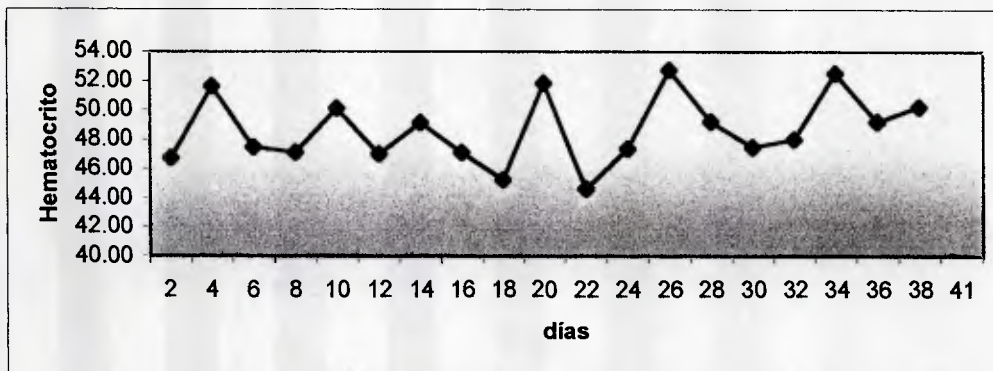


Fig. 13 Valores de Hematocrito en ratones NMRI: Control.

Este comportamiento posiblemente sea debido a la capacidad de controlar la parasitemia del animal, tal y como lo denomina ONAH (1996). Esta capacidad de control no es más que la causada por la baja infectividad de dichos aislados de *Trypanosoma evansi* en los ratones, lo cual permite al sistema inmune de los ratones destruir a la mayoría de los parásitos presentes en la sangre; los restantes parásitos gracias al mecanismo de variación antigénica serán los responsables de un nuevo descenso del nivel de hematocrito, así como sucedió con la parasitemia.

3. Hemoglobina:

Otra de las variables que muestran la presencia de anemia como síntoma de la infección por *Trypanosoma evansi*, es la hemoglobina.

La hemoglobina es el componente más importante del hematíe, constituyendo aproximadamente el 95% de su peso seco. La principal función de la hemoglobina es el transporte de oxígeno desde los pulmones hasta los tejidos y el CO₂ en sentido inverso.

En las siguientes gráficas se analiza la disminución de la hemoglobina en ratones NMRI, en relación a los días de duración de la infección; producida por los diferentes aislados de **Trypanosoma evansi**.

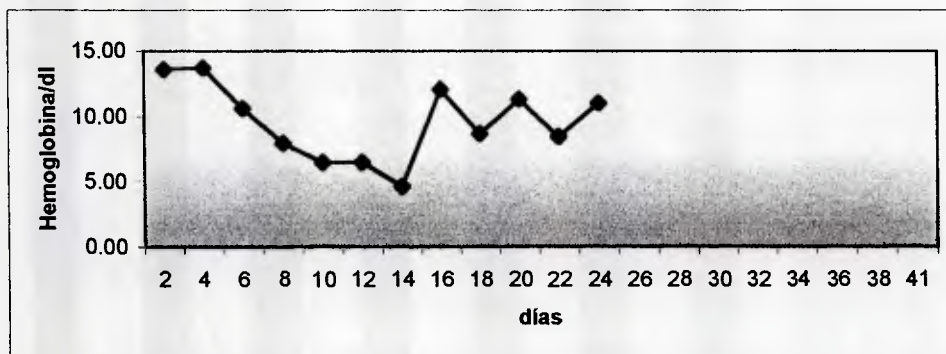


Fig. 14 Concentración de hemoglobina en ratones NMRI infectados con *Trypanosoma evansi*: Cedral 12.

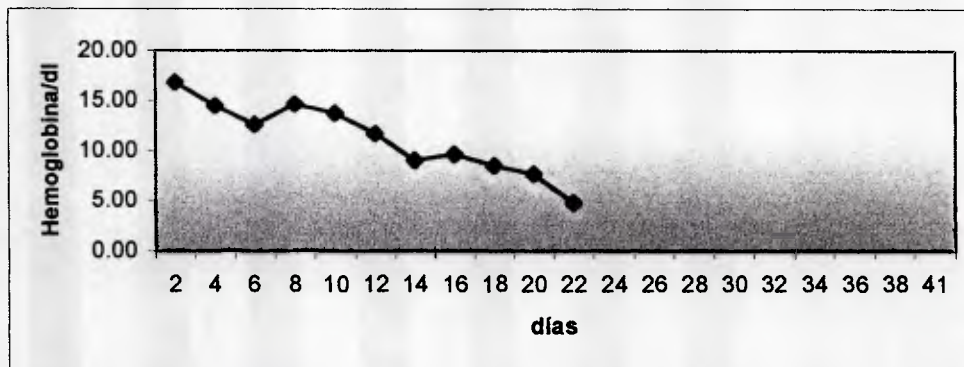


Fig. 15 Concentración de hemoglobina en ratones NMRI infectados con *Trypanosoma evansi*: El Frío.

En estas gráficas se presentan los aislados de chigüire, Cedral 12 y el Frío (fig 14 y 15 respectivamente), donde se observa que hubo una disminución considerable de la hemoglobina en ambas poblaciones de ratones experimentales, inoculados con dichos aislados. En la población de ratones experimentales inoculada con el aislado Cedral 12, se observa un descenso de la hemoglobina, desde sus valores normales (Hg/dl) durante los primeros cuatro días post-infección hasta el día 13 y baja hasta aproximadamente 10 g/dl recuperándose levemente sin llegar a sus valores normales a partir del día 14, hasta el último día de la infección. Posiblemente estos aislados no ejerzan gran influencia sobre el hematocrito puesto que los animales pueden recuperar ligeramente esta variable estudiada.

Los ratones experimentales inoculados con el aislado el Frío (fig. 15), también presentaron una notable disminución en los valores

de hemoglobina, desde el primer día de la infección hasta valores de 5 gr/dl al final del experimento, el día 21.

En las siguientes gráficas se presentan los valores de hemoglobina correspondiente a los aislados de caballo, Mantecal y USR (fig 16 y 17), en donde se observa una disminución progresiva de la hemoglobina a lo largo del curso de la infección.

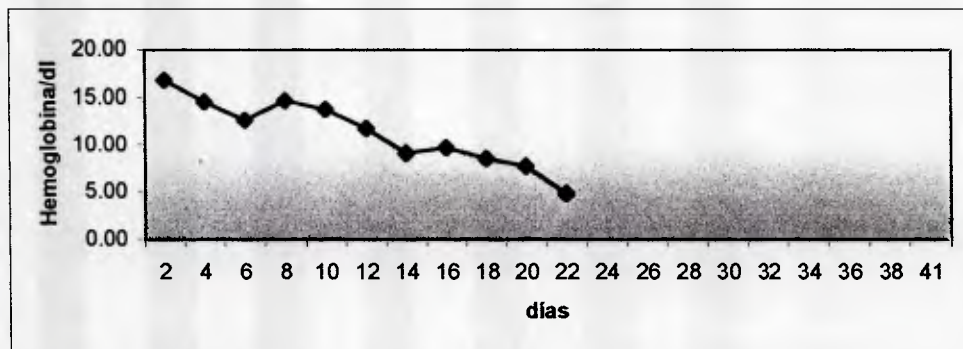


Fig. 16 Concentración de hemoglobina en ratones NMRI infectados con *Trypanosoma evansi*: Mantecal.

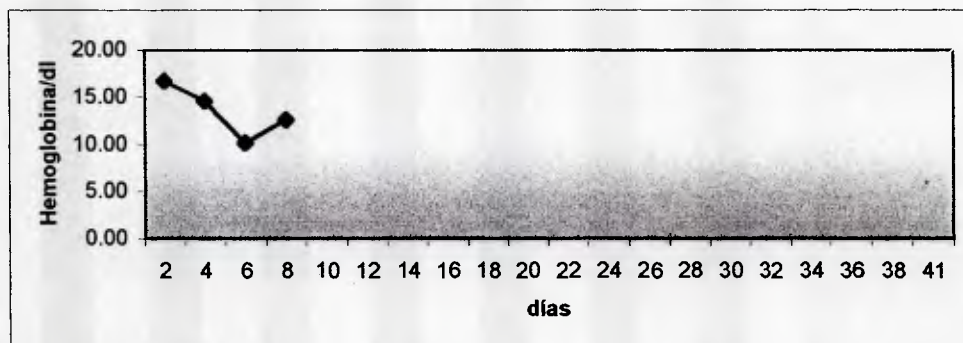


Fig. 17 Concentración de hemoglobina en ratones NMRI infectados con *Trypanosoma evansi*: USR.

Para los ratones inoculados con el aislado Mantecal, la hemoglobina descendió progresivamente desde sus valores normales (12 Hbg/dl) hasta valores menores a 5 gr/dl y para el aislado USR (fig 17), descendió hasta valores de 8 Hbg/dl., esto posiblemente causado por el alto grado de infectividad que posee dicho aislado.

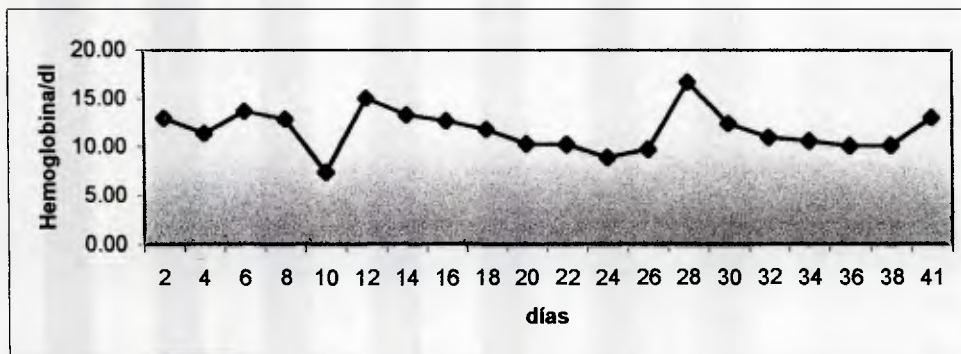


Fig. 18 Concentración de hemoglobina en ratones NMRI infectados con *Trypanosoma evansi*: TeGubTrino.

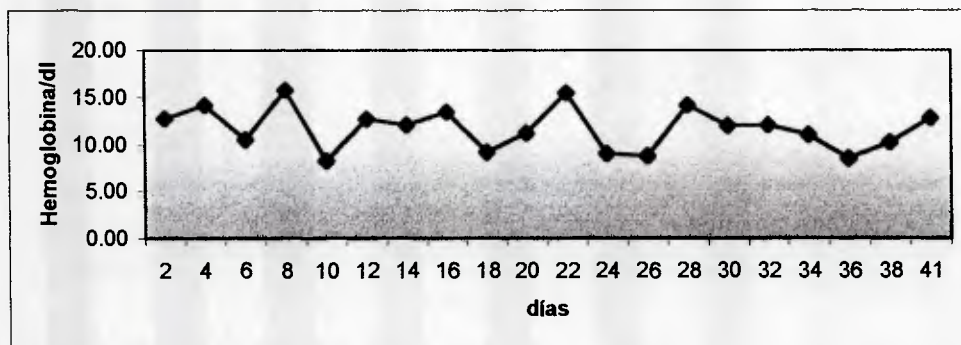


Fig. 19 Concentración de hemoglobina en ratones NMRI infectados con *Trypanosoma evansi*: TeGub323.

En las siguientes gráficas se presentan los valores de hemoglobina correspondientes a los aislados provenientes de asno,

TeGubTrino y TeGub323 (fig 18 y 19 respectivamente), donde se observa un comportamiento similar entre ambos aislados.

En estas gráficas, se puede ver un continuo aumento y descenso de los valores de hemoglobina a lo largo del curso de la infección. Este comportamiento, se debe posiblemente a que estos aislados presentan una baja infectividad, y en consecuencia, el sistema inmune de los ratones logra destruir a la mayoría de los parásitos presentes en la sangre, por lo cual, los valores de hemoglobina vuelven a ser normales.

Posteriormente a través del proceso de Variación Antigénica, los parásitos que sobreviven, son los responsables del nuevo pico de parasitemia, y en consecuencia, del descenso de los valores de hemoglobina.

En la fig. 20 se muestran los valores de la hemoglobina del grupo control a lo largo del experimento.

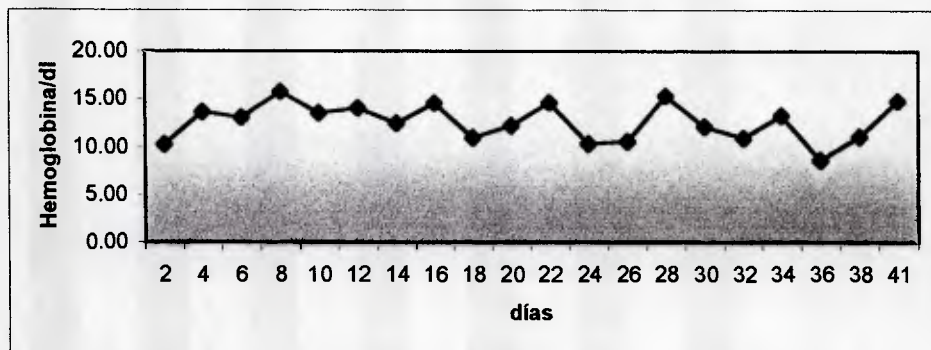


Fig. 20 Concentración de hemoglobina en ratones NMRI : Control.

Se puede concluir que los aislados que presentan un comportamiento parecido al grupo control, son los provenientes de asno, por el bajo poder infectivo de los mismos.

Además, el aislado proveniente de chigüire, Cedral 12, presenta un comportamiento relativamente similar después del día 14 post-infección.

4. Eritrocitos:

Los glóbulos rojos son los elementos más abundantes en la sangre. Su principal función es la de transportar la hemoglobina que es la encargada de transportar el oxígeno de los alvéolos pulmonares a los tejidos y el anhídrido carbónico en sentido contrario, fenómeno que se realiza por diferencia de presiones.

El número de eritrocitos (glóbulos rojos) contenidos en un litro de sangre se denomina concentración de número d eritrocitos. En unidades tradicionales se expresa como el número de células por milímetro cúbico y se llama “recuento” de eritrocitos o glóbulos rojos.

A continuación se presentan las graficas en donde se muestra la relación entre el número de eritrocitos y los días de post-infección de los ratones NMRI durante la fase experimental (fig 21 a la 26):

En estas gráficas se observa el comportamiento de tipo descendiente de los eritrocitos en los aislados Cedral 12 y El Frio (fig 21 y 22) , obtenidos a partir de sangre de chigüire.

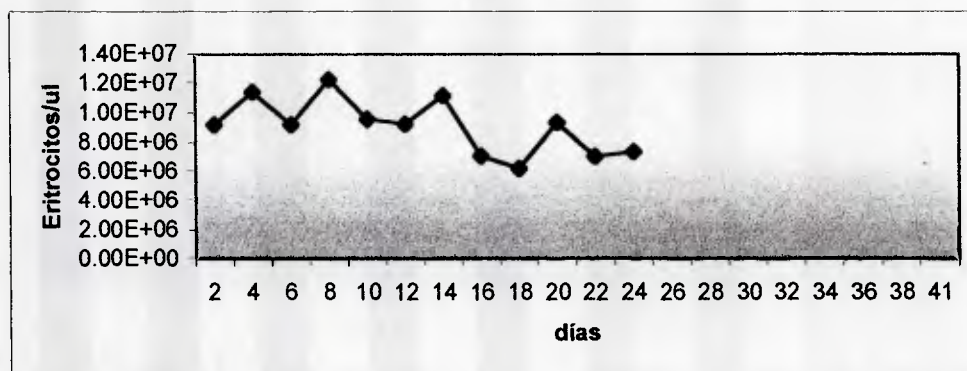


Fig. 21 Concentración de eritrocitos en ratones NMRI infectados con *Trypanosoma evansi* : Cedral 12.

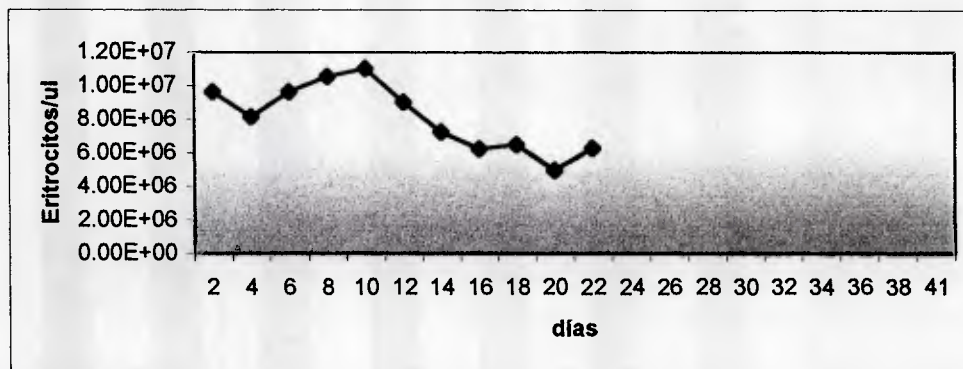


Fig. 22 Concentración de eritrocitos en ratones NMRI infectados con *Trypanosoma evansi* : El Frío.

Sin embargo, los ratones experimentales infectados con el Cedral 12 (fig 21) mostraron un comportamiento similar al grupo control (fig 27) decayendo a partir del día 13 post-infección hasta el día 17 post-infección, recuperándose un poco en los dos días siguientes, volviendo a presentar un descenso hasta la muerte de los mismos. La población de ratones NMRI inoculados con el aislado El Frío (fig 22) presentó un descenso continuo del número de eritrocitos a partir del día 9 post-infección hasta el último día de duración del experimento.

Para el caso de los aislados de *T. evansi* provenientes de caballo (fig 23 y 24), se muestra el descenso de los vaores de eritrocitos durante el curso de la infección.

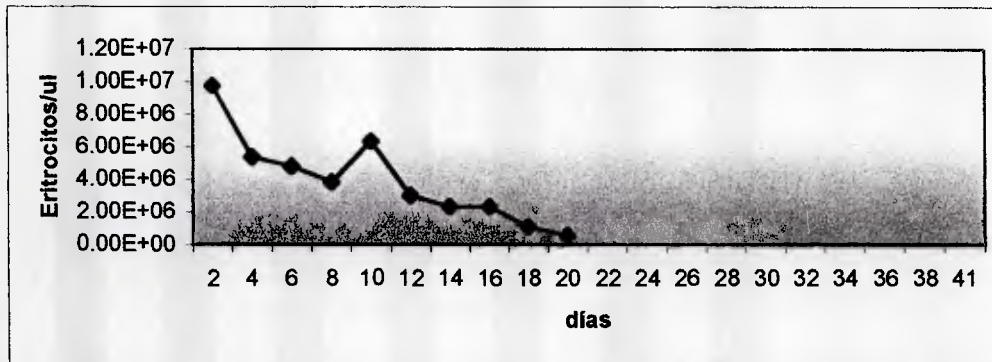


Fig. 23 Concentración de eritrocitos en ratones NMRI infectados con *Trypanosoma evansi* : Mantecal.

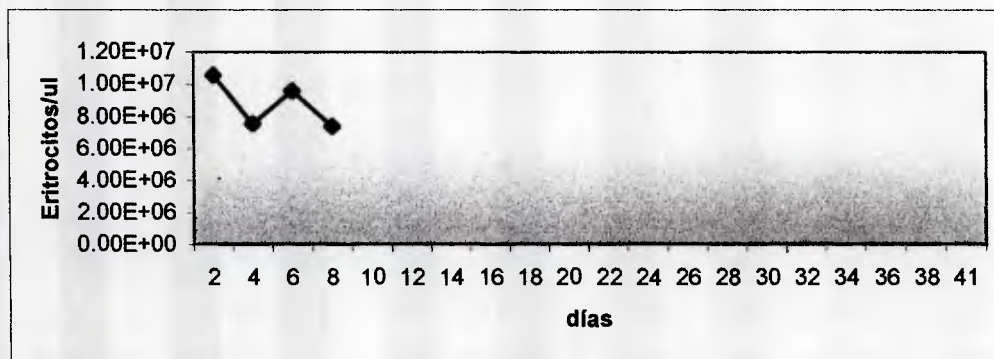


Fig. 24 Concentración de eritrocitos en ratones NMRI infectados con *Trypanosoma evansi* : USR.

La población infectada con el aislado Mantecal (fig 23) tuvo un continuo descenso bien pronunciado el primer día de infección hasta el 19, día último del experimento. Los ratones infectados con el aislados USR (fig 24) mostraron un leve descenso del número de eritrocitos durante los ocho días de duración del experimento. Cabe destacar que la mortalidad de los ratones inoculados experimentalmente con este aislado de *T. evansi* mostraron una

mortalidad del 100% entre los días 8 y 10 post-infección, razón por la cual el descenso de los valores hematológicos posiblemente no puedan ser apreciados dado el poco tiempo de supervivencia (8-10 días). Con estos resultados se puede señalar que los ratones no murieron a consecuencia de una disminución de las variables hematológicas sino posiblemente a un déficit de glucosa, metabolito principal para la supervivencia de estos parásitos.

Con respecto a los aislados de provenientes de asno (fig 25 y 26), donde se observa un comportamiento similar entre ambas poblaciones de ratones experimentales, y donde se muestran continuos aumentos y descensos en relación al número de eritrocitos, a lo largo del curso de la infección.

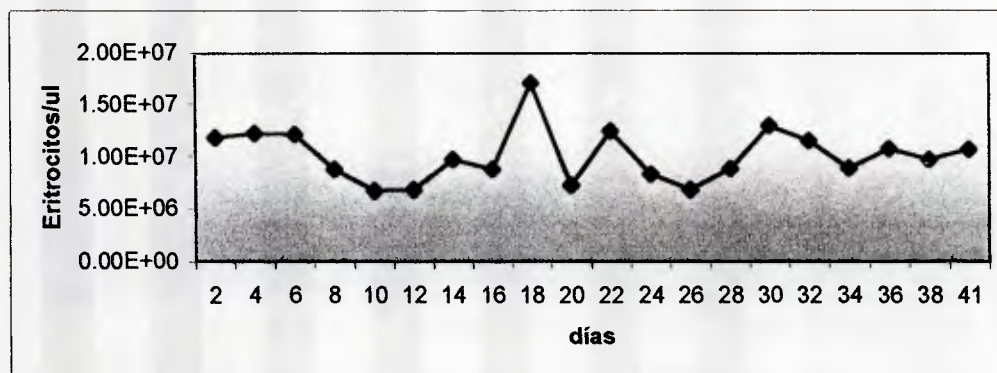


Fig. 25 Concentración de eritrocitos en ratones NMRI infectados con *Trypanosoma evansi*: TeGubTrino.

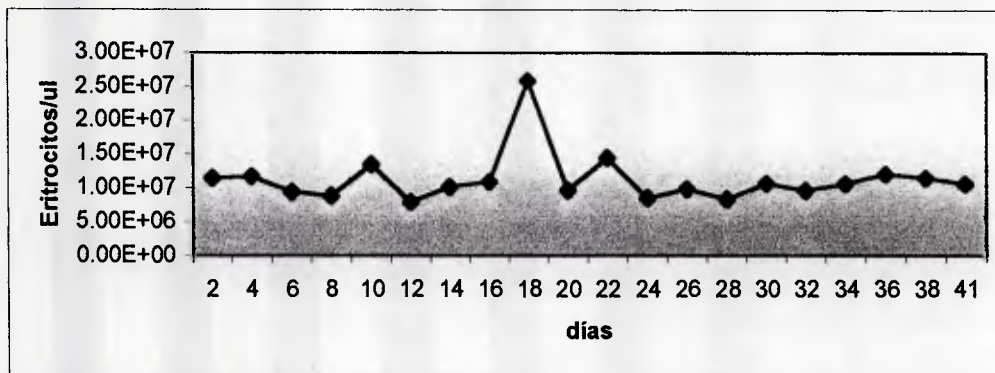


Fig. 26 Concentración de eritrocitos en ratones NMRI infectados con *Trypanosoma evansi* : TeGub323.

Este comportamiento es debido al bajo grado de infectividad que presentan los aislados, y en consecuencia, el sistema inmune de los ratones logra destruir a la mayoría de los parásitos restaurándose nuevamente los valores normales de eritrocitos.

Los parásitos que logran sobrevivir, gracias al proceso de variación antigénica, son los causantes del nuevo descenso del número de glóbulos rojos, reponiéndose éste, días después. Es por esto que las gráficas son comparables con el grupo control (fig 27).

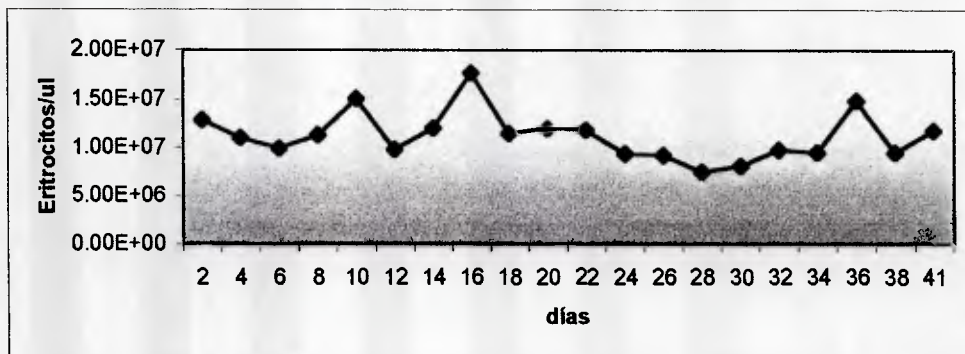


Fig. 27 Concentración de eritrocitos en ratones NMRI Control.

De estos resultados se puede concluir que las poblaciones de ratones experimentales que presentan un comportamiento similar al grupo control, fueron las inoculadas con parásitos provenientes de asno, debido al bajo grado de infectividad de los aislados. Además, los ratones inoculados con el aislado Cedral 12, proveniente de chigüire, muestran un comportamiento similar al grupo control en los primeros 13 días del experimento, decayendo continuamente a partir de ese día.

5. Peso Corporal:

Recordemos que Woo (1997), Losos (1980) y García (1988) describen como uno de los síntomas principales, el enflaquecimiento en forma marcada (emaciación); a pesar de que los animales pueden conservar el apetito.

En las siguientes gráficas se analiza entonces la pérdida de peso corporal en ratones NMRI en relación a los días de duración de la infección; producida por los diferentes aislados de Trypanosoma evansi (figuras 28 a la 33) incluyendo su grupo control (figura 34).

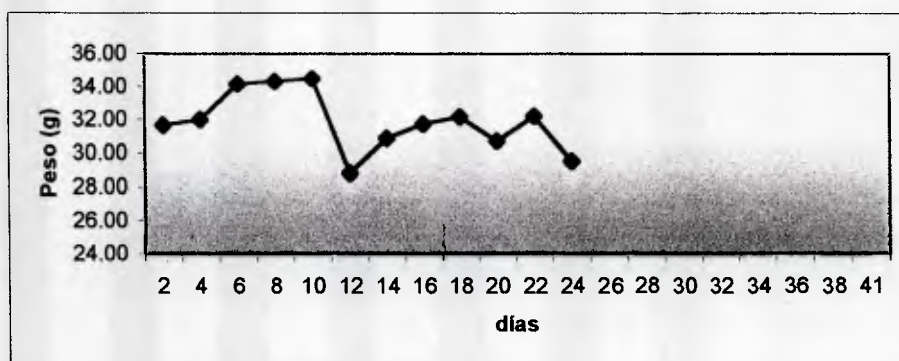


Fig. 28 Determinación de peso corporal en ratones NMRI infectados con *Trypanosoma evansi*: Cedral 12.

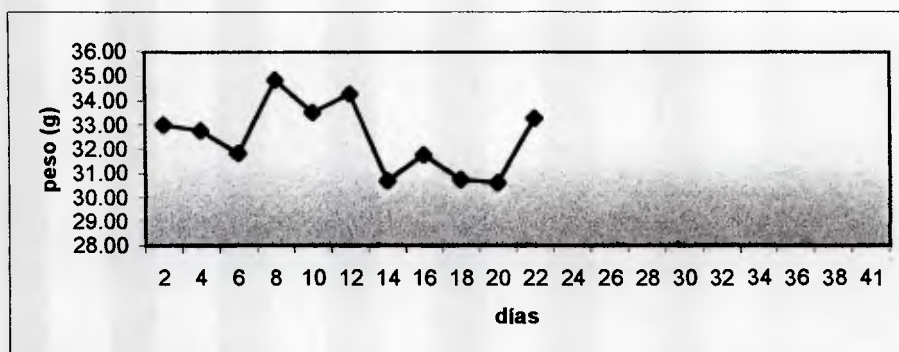


Fig. 29 De terminación de peso corporal en ratones NMRI infectados con *Trypanosoma evansi* : El Frío.

En estas gráficas se presentan los aislados de chigüire, Cedral 12 y el Frío (fig 28 y 29), donde se observa una disminución de peso

en un promedio de 6.5 gr., entre los días 9 -11 y 11-13 respectivamente; recuperándose lentamente, sin llegar al valor normal a partir del día 12 para el aislado Cedral 12 (fig 28) y del día 14 para el aislado el Frío (fig 29).

El peso corporal de dichos animales experimentales decae a medida que la parasitemia aumenta a niveles promedios de 1.10^7 tripanosomas/ml. de sangre para el aislado Cedral 12 y 1.10^8 tripanosomas/ml. de sangre para el aislado el Frío.

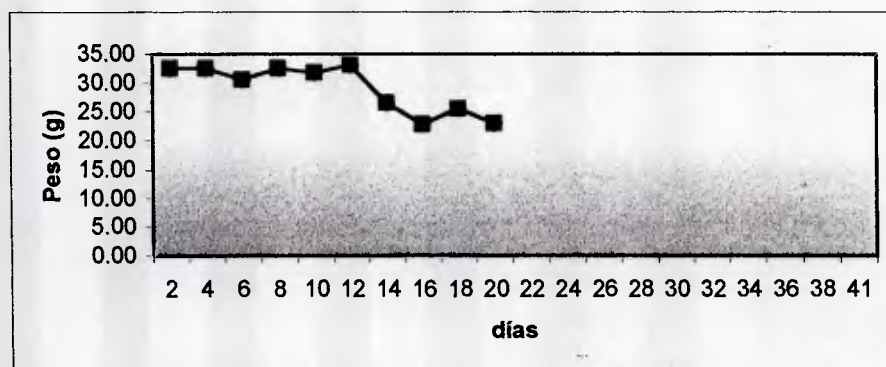


Fig. 30 Determinación de peso corporal en ratones NMRI infectados con *Trypanosoma evansi*: Mantecal.

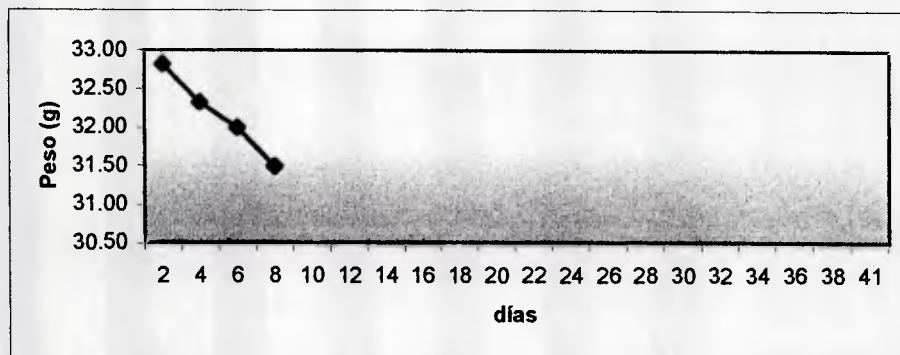


Fig. 31 Determinación de peso corporal en ratones NMRI infectados con *Trypanosoma evansi* : USR

En cuanto a los aislados obtenidos de caballo, Mantecal y USR (fig 30 y 31 respectivamente), donde observamos que los animales experimentales inoculados con el aislado Mantecal, presentaron una disminución considerable de peso hasta valores de 11gr., entre los días 11 y 15 post-infección.

Los animales experimentales infectados con el aislado USR, presentaron una disminución promedio del peso de 1gr., en los 8 días de duración del experimento. Este leve descenso del peso corporal del animal es debido al alto grado de infección que generó el aislado, y en consecuencia, la rápida muerte de los mismos. Dicha disminución prosiguió hasta el día de muerte del último animal experimental, para ambos aislados.

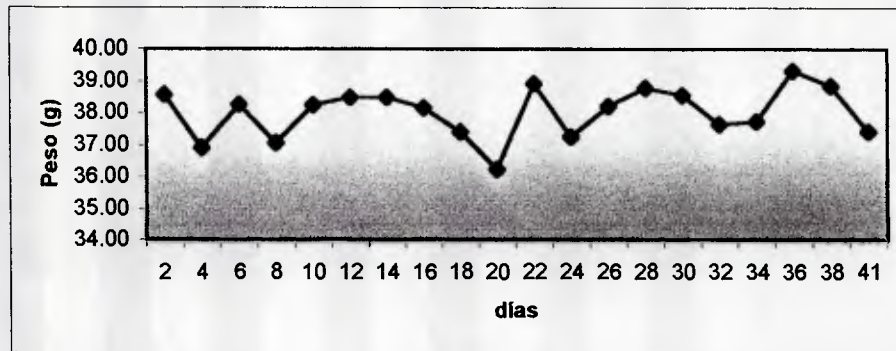


Fig. 32 Determinación de peso corporal en ratones NMRI infectados con *Trypanosoma evansi* : TeGub-Trino

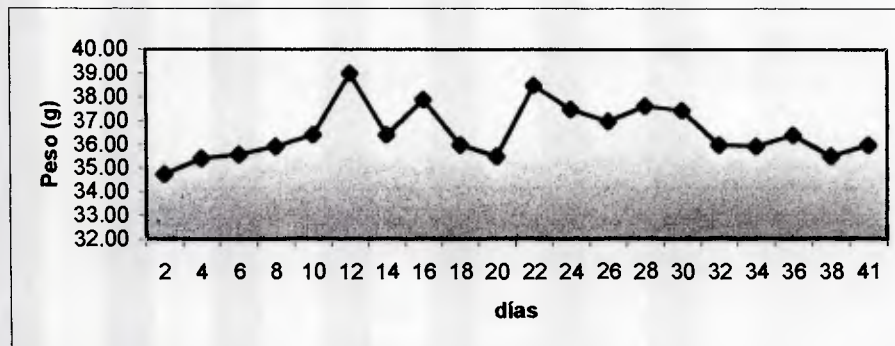


Fig. 33 De terminación de peso corporal en ratones NMRI infectados con *Trypanosoma evansi* : TeGub-323

Las figuras 32 y 33 muestran los valores de peso de los ratones durante el curso de la infección de aislados provenientes de asno, TeGubTrino y TeGub323 respectivamente, donde observamos un comportamiento similar en las poblaciones de ratones experimentales infectados con ambos aislados, mostrando continuos aumentos y descensos de peso a lo largo del curso de la infección y cuyos valores pudieran considerarse como normales.

Este comportamiento es comparable con las ondas de parasitemia que causan dichos aislados debido a la poca infectividad de los mismos, con lo cual, el sistema inmune logra destruir a la mayoría de los tripanosomas existentes en la sangre de los ratones, y en consecuencia los ratones recuperan nuevamente su fuerza muscular y por ende, su peso.

El proceso de variación antigénica permite la proliferación de un nuevo tipo de tripanosomas, que son los causantes de una nueva onda de parasitemia por lo que a su vez, los ratones vuelven a acentuar los síntomas, como la pérdida de peso muscular y peso.

En esta gráfica se muestra el peso de los ratones control a lo largo del experimento, el cual permanece constante con valores promedios de 30-35 gramos.

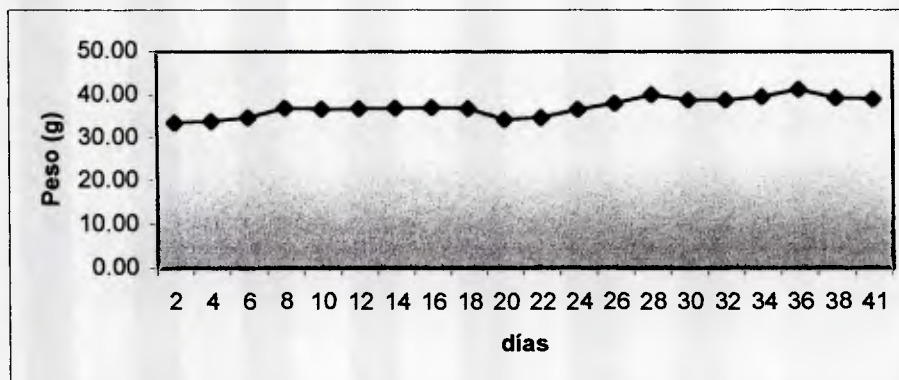


Fig. 34 De terminación de peso corporal en ratones NMRI: Control.

Se puede concluir que los ratones que fueron inoculados con los aislados de asno, presentaron un comportamiento similar al grupo control a lo largo del curso de la infección.

La población de ratones experimentales que fue inoculada con el aislado Mantecal, proveniente de caballo, mostró durante los primeros 13 días post-infección, un comportamiento similar al grupo control, decayendo progresivamente a partir del día 14.

Estos resultados muestran que los aislados de caballo fueron los que pudieron lograr el mayor descenso del peso en los ratones experimentales, esto debido a la alta infectividad de los mismos.

Los aislados de chigüire lograron un descenso de peso en los ratones experimentales, pero después del día 13 promedio post-infección, este fue recuperado.

Los aislados de asno, fueron los que presentaron el menor grado de infectividad, por lo que el peso se mantiene generalmente constante en los animales experimentales, siendo comparable con el grupo control.

	%infectividad	Curso de la infección (días)	Tipo de parasitemia
Mantecal	100	15	Progresiva
USR	100	8	Progresiva
Cedral 12	90	27	Progresiva
El frio	96	24	Progresiva
Tegub 323	27	45	Ondulante (3 picos)
Tegub-trino	76	45	Ondulante (2 picos)

Tabla II: Porcentaje de infectividad, Número de sobrevivientes y el Tipo de Parasitemia de los aislados estudiados.

La tabla II muestra el porcentaje de infección, el curso de la infección y el tipo de parasitemia de los seis aislados estudiados.

Se puede observar que el inóculo utilizado fue capaz de infectar al 100% de loss ratones para los aislados de caballo (Mantecal y USR), el 90% y 96% para los aislados de chigüire (Cedral 12 y El Frío) y 27% y 76% para los provenientes en asno (TeGubTrino y TeGub323). El curso de la infección fue de 15 y 8 días para los asilados Mantecal y USR, de 27 para cedral 12 y 24 días para El Frío; y por último 45 días para ambos aislados obtenidos de asno (TeGubTrino y TeGub323).

El tipo de parasitemia de los cuatro primeros aislados iba en aumento progresivos hasta la muerte de los animales, mientras que para ambos aislados de asno fue de tipo ondulante mostrando tres picos el aislado TeGub323 y dos picos el aislado TeGubTrino.

Estos resultados indican que los aislados más infectivos fueron Mantecal y USR provenientes de caballo seguidos por Cedral 12 y El Frío obtenidos de chigüire, siendo entonces los menos infectivos los provenientes de asno (TeGub323 y TeGubTrino).

DISCUSIÓN

Los objetivos principales en el presente trabajo fueron determinar las características hematológicas, no hematológicas y parasitológicas de ratones NMRI durante la infección con los diferentes aislados de *Trypanosoma evansi*.

Es importante destacar que la utilización de una numerosa población de ratones experimentales, permitió la realización de la comparación fiable de los resultados obtenidos de los diferentes aislados de *Trypanosoma evansi* obtenidos de chigüire, caballo y asno; para así conocer el comportamiento y duración de la infección producida y obtener así el nivel de infectividad de los mismos.

Un aspecto importante durante el análisis de los resultados es la variación antigénica, que como ya se mencionó es uno de los fenómenos más importantes en la tripanosomiasis, ya que permite a los parásitos escapar del sistema inmune del hospedador variando la composición de las proteínas de su cubierta antigénica constituida por una glicoproteína llamada glicoproteína variable de superficie (VSG) (Perrone, 1992). A pesar que en ratón como modelo experimental el comportamiento normal es un aumento de la

parasitemia hasta valores tan altos que producen la muerte de los mismos (Arvelo, 1999).

Por lo tanto cabe destacar que en el presente trabajo dos de los aislados (TeGubTrino y TeGub323) mostraron una parasitemia ondulante similar a su hospedador natural. Estos resultados coinciden con Queiroz (1999) quien también observó este mismo comportamiento en varios de sus aislados estudiados. Esta característica pudiera indicar que esto se trata de poblaciones distintas.

Aunque se han realizado numerosos estudios concernientes a la infectividad y comportamiento de los tripanosomas como *T. brucei*, *T. b. rhodesiense*, *T. b. gambiense* y *T. congolense*; *T. evansi* ha sido muy poco estudiado (Hörchner, 1984).

En este trabajo se realizó un análisis comparativo entre aislados venezolanos de *Trypanosoma evansi* proveniente de distintos hospedadores, para diferenciar en los niveles de infectividad.

Es importante destacar que mediante este trabajo se ha logrado demostrar claramente que existen diferencias entre el comportamiento parasitario entre aislados de *Trypanosoma evansi* de distintos hospedadores, en este caso entre aislados de caballo, chigüire y asno; todos originarios de Venezuela.

Para efectuar el estudio sobre el comportamiento parasitario de *Trypanosoma evansi* en distintos hospedadores y la selección del más infectivo, fue necesario utilizar dos tipos de aislado para cada hospedador, en el caso de caballo, Mantecal y USR; para chigüire, Cedral 12 y El Frío y por último TeGubTrino y TeGub323 para asno. La metodología empleada constituyó en seleccionar los ratones más susceptibles a la infección por *Trypanosoma evansi*, estudio que previamente fue realizado por Arvelo (1999), concluyendo en el mismo que NMRI es la cepa más susceptible a dicho parásito. Dichos ratones NMRI fueron inoculados con diferentes aislados de *Trypanosoma evansi* para así ser posteriormente estudiadas variables hematológicas, no hematológicas y parasitológicas en forma interdiaria a partir del primer día de inoculación hasta la muerte del último ratón. Para ello se tomaron aleatoriamente ratones durante el curso del experimento y se determinaron así las diferencias entre dichas variables presentes de cada aislado.

En relación al curso y severidad de la infección experimental de *Trypanosoma evansi* en los ratones NMRI se han encontrado diferencias muy marcadas. Se encontró que el inóculo experimental utilizado (1-2 parásitos/gramos de peso) de cada aislado fue capaz de infectar al 100% de la población de ratones para los aislados USR y Mantecal provenientes de caballo y El Frío proveniente de chigüiere, mientras que el resto de los aislados fueron capaces de infectar un 90% el aislado Cedral 12 obtenido también de chigüire, 76% el aislado TeGubTrino y 20% el TeGub323, ambos provenientes de asno.

Estas diferencias vienen dadas no sólo por la capacidad de infección del aislado de *Trypanosoma evansi* sino también por la capacidad del hospedador de responder inmunológicamente a dicho aislado en particular y la capacidad de adaptación de éste en el hospedador, como lo demuestra Barry (1985), el cual comparó las parasitemias entre diferentes hospedadores con un aislado de *T. vivax* y encontró diferencias representativas entre las mismas obtenidas de distintos hospedadores.

Con respecto a días de prepatencia de cada uno de los aislados, se observa que USR proveniente de caballo mostró la más corta, de 4 días, con respecto a el resto de los aislados, siendo la más retardada las pertenecientes a los aislados de asno, TeGubTrino y TeGub323 (8 y 10 respectivamente). Si a esto se le añade el promedio de parasitemia y la parasitemia máxima de los aislados notamos que USR y Mantecal mostraron el valor más alto, de $3,08 \cdot 10^8$ y $7,84 \cdot 10^8$ (promedio de parasitemia) y $4,48 \cdot 10^9$ y $9,62 \cdot 10^9$ (parasitemia máxima) respectivamente.

Para el caso de los aislados obtenidos de asno presentaron los menores valores de promedio de parasitemia y parasitemia máxima siendo los mismos $2,21 \cdot 10^7$ para TeGubTrino y $2,08 \cdot 10^7$ para TeGub323 de promedio de parasitemia y $7,61 \cdot 10^8$ y $4,44 \cdot 10^8$ de parasitemia máxima para los mismos aislados; siendo intermedio entonces el chigüire con valores de promedio de parasitemia de $1,00 \cdot 10^8$ para Cedral 12 y $2,75 \cdot 10^8$ para El Frío y valores máximas de parasitemia de $1,26 \cdot 10^9$ y $1,97 \cdot 10^9$ respectivamente.

Siguiendo esta tónica, podemos observar que el nivel de sobrevivencia de ratones para los aislados de asno fue mucho mayor que el resto de los aislados provenientes de caballo y chigüire. Los

ratones inoculados con los aislados TeGubTrino y TeGub323 sobrevivieron más de 41 días permaneciendo vivos 16 animales que representan el 53% de la población para TeGubTrino y 22 animales del segundo (TeGub323) que representan el 73% de la población viva. La menor sobrevivencia fue expresada por el aislados USR ya que los animales experimentales murieron en su totalidad a los diez días post-infección, a diferencia del aislado Mantecal obtenido también de caballo, en donde la totalidad de ratones murieron a los 18 días de post-infección. Quedando entonces nuevamente los aislados de chigüire en una posición intermedia, con un 23% de sobrevivencia (7 ratones) para el asilado Cedral 12, cuyo período de infección duró 22 días y 26 días para el aislado El Frío en donde no sobrevivió ningún animal experimental. Esto indica claramente que los aislados provenientes de caballo más agresivos que los obtenidos de chigüire y asno.

Analizando los resultados en relación a las variables consideradas en este trabajo tales como parasitemia, hematocrito, hemoglobina, eritrocitos y peso; notamos claras diferencias entre los aislados de *Trypanosoma evansi* provenientes de varias localidades y de distintos hospedadores.

En el caso de la parasitemia se observó la heterogeneidad en el comportamiento entre aislados de diferentes hospedadores. USR fue un aislado muy agresivo ya que logró eliminar al 100% de los animales experimentales en el día 10 post-infección mostrando un decaimiento continuo de todas las variables hematológicas y no hematológicas estudiadas a medida que la parasitemia aumentaba de manera progresiva hasta la muerte de los animales. Aunque el aislado Mantecal también proveniente del caballo presentó un período de infección más largo (18 días), también fue notable el aumento progresivo de la parasitemia así como el descenso característico en USR de las variables hematológicas y no hematológicas, lo cual indica la alta agresividad o infectividad de ambos aislados a comparación con el resto de los aislados de asno y chigüire.

Los aislados de chigüire, Cedral 12 y El Frío, mostraron cierto nivel de agresividad o infectividad ya que aunque el segundo logró eliminar el 96% de los animales experimentales el período de infección duró 24 días, y el asilado Cedral 12 mostró un valor de mortandad menor del 90%, logrando los ratones contrarrestar la actividad parasitaria hasta el día 24.

Esto quiere decir que el sistema inmune de los ratones inoculados con dichos aislados pueden sobrellevar la actividad de los parásitos en la sangre por un período de tiempo mayor que los aislados de caballo, debido a la infectividad mucho menor de los mismos, con respecto a los provenientes de caballo.

Lo aún más interesante, fue la capacidad de defensa de los ratones inoculados con los aislados obtenidos de asno, ya que las gráficas mostraron un comportamiento poco agresivo de los mismos por un tiempo mayor a 41 días, presentando en el curso de la infección una parasitemia del tipo ondulante generando así picos de parasitemia y ondas parasitarias.

Durante el período de infectividad del aislado TeGub323 produjo 3 picos de parasitemia, mientras que el aislado TeGubTrino produjo solo 2. Esto indica la capacidad del sistema inmune de contrarrestar la acción de los parásitos, así como la capacidad de adaptación de éstos, es decir, la capacidad de cambiar los aminoácidos (proteínas) de su cubierta protéica. En otras palabras, el aislado TeGub323 es menos infectivo que TeGubTrino ya que el sistema inmune logra destruir en más oportunidades con casi la totalidad de los tripanosomas, además de contrarrestar entonces más

efectivamente los daños producidos por la infección. El aislado TeGubTrino a su vez muestra ser más infectivo que TeGub323 ya que el sistema inmune logra contrarrestar los parásitos en dos oportunidades, pero de igual manera presenta una parasitemia de tipo ondulante que indica la poca agresividad del mismo con respecto a los aislados de caballo y chigüire. Además, recordemos que el porcentaje de sobrevivencia de TeGubTrino es mucho menor que TeGub323, 24% y 73% respectivamente, lo cual prueba lo anteriormente ya expuesto.

Tal y como ya se observó, las variables hematológicas y no hematológicas, van descendiendo a medida que la parasitemia se hace mayor. El valor del hematocrito tuvo leves descensos durante todo el curso de infección de los aislados TeGubTrino y TeGub323, ya que los valores permanecieron inalterados manteniéndose muy similar a los del grupo control. Esto debido a la capacidad del sistema inmune de destruir la actividad de los tripanosomas.

Estos resultados no coinciden con los obtenidos por García (1988), en la cual el valor de hematocrito en asnos infectados disminuyó hasta un 62% de su valor inicial desarrollando ésto anemia severa, la cual se hacía más pronunciada durante la caída de

la parasitemia. Este autor sugiere que la anemia producida se debe a algún mecanismo implicado en la eliminación de los parásitos y glóbulos rojos en forma simultánea.

Un tipo de anemia en donde los glóbulos rojos son destruidos simultáneamente con los parásitos es la del tipo regenerativa o periférica. Pero este no es el caso de los ratones experimentales, ya que pareciera que no está implicado ningún mecanismo de eliminación de glóbulos rojos que pueda llevar al animal a presentar un cuadro de anemia severa como en el caso de los aislados USR. Mientras que para Mantecal proveniente de caballo, en donde los valores de hematocrito disminuyeron drásticamente hasta la muerte del animal, presentándose fácilmente visible un cuadro de anemia severa.

Posteriormente se analizan los valores de Hemoglobina, los cuales descienden de manera continua con ciertos intentos de recuperación, durante todo el curso de la infección en todos los aislados de chigüire (Cedral 12 y El Frío) y de caballo (Mantecal y USR).

Sin embargo, para los aislados de asno ocurre lo mismo que en los valores de hematocrito; en donde se mantiene prácticamente inalterados durante todo el curso de la infección, permaneciéndose similar al grupo control; por ende no presentan un cuadro de anemia, sino cierto debilitamiento de la fuerza muscular, como síntoma principal de los primeros días de infección.

Conjuntamente se evidencia una significativa disminución del número de eritrocitos en sangre periférica en los aislados de caballo y chigüire, presentándose así nuevamente más incidencias de un cuadro anémico en los ratones inoculados con dichos aislados durante los últimos días de sobrevivencia.

Es importante destacar que debido a la alta agresividad del aislado USR, no se logró observar un cuadro anémico en los ratones inoculados, debido al corto tiempo de duración del experimento (10 días), por lo que no se pudo visualizar los síntomas característicos.

De distinta manera, los ratones inoculados con los aislados TeGubTrino y TeGub323 obtenidos de asno lograron controlar prácticamente durante todo el curso de la infección los valores de hemoglobina por lo que se comprueba nuevamente la similaridad con

los ratones del grupo control. Esto prueba nuevamente a su vez la poca infectividad de dichos aislados y por ende la suficiente capacidad del sistema inmune de controlar la infección por un período de tiempo extenso.

Por último, se encuentra la variables no hematológica observada durante el transcurso del experimento; el peso corporal. Recordemos que el animal no pierde el apetito sino que sufre de un nivel de debiliamiento tan alto de la fuerza muscular que le impide alimentarse, lo cual hace suponer que aquellos aislados más agresivos lograrán un mayor debilitamiento del animal y por ende este presentará un descenso mayor de peso. Esto ocurrió en el aislado Mantecal proveniente de caballo, en donde los ratones disminuyeron unos 10 gramos aproximadamente, aunque entre los aislados de caballo el menos infectivo era este. En el caso de USR, debido al poco tiempo de sobrevivencia de los animales, no se pudo observar una disminución significativa de peso, pero ello no indica que dicho aislado sea menos infectivo que el Mantecal, por lo ya mencionado anteriormente durante el análisis de las variables hematológicas.

Otro aislado que presentó una disminución considerable del peso corporal fue el proveniente de chigüire, Cedral 12, con un descenso de 7 gramos de peso; aunque El Frío no presentó una disminución de esta variable significativa.

De la misma manera que en las variables hematológicas anteriormente estudiadas, los animales experimentales inoculados con aislados de asno no mostraron cambios considerables del peso corporal, manteniéndose sus valores bastante similares a los del grupo control.

A pesar de que se han realizado algunos experimentos sobre el comportamiento de la parasitemia de *Trypanosoma evansi* en ratones, cobayos, ovejas, entre otros; por primera vez se realizan comparaciones entre diferentes aislados venezolanos tomando en cuenta numerosas variables tanto hematológicas como no hematológicas que demuestran las significativas diferencias que existen entre la capacidad infectiva o agresividad de los aislados dependiendo de los hospedadores de donde provienen, por ello este trabajo implica a posterior un estudio de tipificación de dichos aislados para así ser estudiados de manera exhaustiva, con la finalidad de encontrar el mecanismo o vacuna para contrarrestar esta

diversa gama de parásitos que afectan a numerosas especies de animales que son de considerable importancia económica en Los Llanos de Venezuela.

Quizá ahora con un mayor entendimiento de los mecanismos involucrados como la variación antigénica ya estudiada por Perrone (1992), con la identificación del animal experimental más óptimo para desarrollos de trabajo experimentales con *Trypanosoma evansi* realizado por Arvelo (1999) y con el estudio comparativo del comportamiento de diferentes aislados, pudieran llevar al desarrollo de métodos inmunoprolácticos, los cuales pudieran prevenir la enfermedad.

CONCLUSIÓN

Es importante destacar que el presente trabajo aporta información acerca del comportamiento parasitario de distintos aislados de *Trypanosoma evansi* provenientes de Los Llanos Venezolanos y de diferentes hospedadores como caballo, chigüire y asno. Estos tripanosomas presentan a su vez como mecanismo de adaptación al sistema inmune de los hospedadores la Variación Antigénica al igual que sus parientes africanos.

Sobre las bases de estos resultados obtenidos en este trabajo de investigación en ratones NMRI susceptibles a la infección de *Trypanosoma evansi* se establecen las siguientes conclusiones:

1. Un inóculo de 1 o 2 parásitos/ml fue capaz de infectar el 100% de la población de animales infectados con los aislados de caballo (Mantecal y USR). Así mismo un 90% y 96% para los aislados obtenidos de chigüire (Cedral 12 y El Frío respectivamente) y 27% y 76% para los aislados TeGubTrino y TeGub323 provenientes de asno.

2. Los aislados provenientes de caballo (Mantecal y USR) y chigüire (Cedral 12 y El Frío) desarrollaron una parasitemia de tipo progresiva sin obtener entonces picos de parasitemia.
3. Los aislados provenientes de asno (TeGubTrino y TeGub323) desarrollaron a su vez una parasitemia de tipo ondulante a partir de la cual se presentaron dos picos y tres picos respectivamente.
4. debido a la corta duración de la infección y por ende la sobrevivencia de los animales experimentales así como la presencia de un severo cuadro anémico de los mismos, se concluye que los aislados provenientes de caballo (Mantecal y USR) son mucho más agresivos o infectivos que el resto de los aislados estudiados a lo largo de esta investigación, siendo USR aún más infectivo que Mantecal. Mientras que los aislados de chigüire (Cedral 12 y Frío) presentaron una infectividad considerable aunque no con los mismo niveles que los aislados provenientes de caballo.
5. Por último, los aislados de asno (TeGubtrino y teGub323) resultaron ser los únicos que indujeron la presencia de ondas

de parasitemia o picos de parasitemia, resultando entonces ser los menos infectivos de los aislados estudiados; y por ello no presentaron un cuadro anémico severo a diferencia de los obtenidos de caballo y chigüire.

BIBLIOGRAFÍA

- ARCAJ DE PERAZA, L. 1976. Comportamiento de una cepa de Trypanosoma venezuelense, Mesmil 1910, aislado de Hydrochoerus hydrochaeris de los llanos venezolanos en animales de laboratorio. Acta Científica 27, 1: 131-132.
- ARCAJ DE PERAZA, L; DÍAZ MILA DE LA ROCA, C. Y OJASTI, J. 1980. Comportamiento de una cepa de Trypanosoma venezuelensi (T. evansi) aislado de Hydrochoerus hydrochaeris ("chigüire" o "capibara") en animales de laboratorio. Gaceta Biológica de Venezuela, 10(4):391-418.
- ARIAS NÚÑEZ, J.F.1993. Prevalencia del Trypanosoma evansi en chigüires Hydrochoerus hydrochaeris en sabanas inundables del estado Apure. Trabajo de grado. Venezuela, p:1-20.
- ARVELO, J. 1999. Susceptibilidad de cepas de ratón genéticamente diferentes a la infección con Trypanosoma evansi. Trabajo de Grado. Venezuela, p: 1-8.
- ASHCROFT, M.T. 1958. An attempt to isolate Trypanosoma rhodesiense from wild animals. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 52:276-282.
- ASHCROFT, M. T. 1959a. The relative virulence of Trypanosoma brucei in young and adult white rats. Ann. Trop. Med & Parasit. 53 (1): 89-92.

- ASHCROFT, M.T. 1959b. The importance of African wild animals as reservoir of trypanosomiasis. *E. Afr. Med. J.* 36 (6) : 289-297.
- ASHCROFT, M.T. BURTT E. & FAIRBAIRN, N. 1959. The experimental infection of some African wild animals with T. rhodesiense, T. brucei and T. congolense, *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 53: 147-161.
- AUDU, P. A., ESIEVO, K. A. N., MOHAMMED, G., AJANUSI, O. J. (1999) Studies of infectivity and pathogenicity of an isolate of Trypanosoma evansi in Yankasa Sheep. *Veterinary Parasitology*, 86: 185-190.
- BAKOS, E. y BUSTAMANTE, A. (1982). Detección de títulos serológicos anti-Trypanosoma equinum en equinos. Primera parte. Mediante la inmunofluorescencia indirecta (IFI). *Gac. Vet. B. Aires.* TXLIV (368): 175-181.
- BARRY, J.D. & GATHUO, H. 1984. Antigenic variation in Trypanosoma vivax: isolation of serodeme. *Parasitology*.: 89: 49-58.
- BOERO, J. J. 1974. *Tripanosomiasis en Parasitosis Animales II*. 3ª Edición. Editorial Eudeba. Buenos Aires.
- BORST, P., Molecular genetics of antigenic variation (1991). *Inmunoparasitology Today*: A29-A33.
- BRENER, Z. (1969). Therapeutic activity and criterium of cure on mice experimentally infected with Trypanosoma cruzi. *Rev. Inst. Ned. Trop. Sao Paulo* Vol IV:389-396.

- CLARK, H. and DUNN, L.H. 1933. Animal susceptibility to Trypanosoma hippicum, the equine Trypanosome of Panamá. Am. J. Trop. Med. 13 (3): 273-281.
- CROSS G.A.: Identification, purification and properties of clone-specific glycoprotein antigenics constituting the surface coat of Trypanosoma brucei. Parasitology. 1975 Dec; 71 (3): 393-417.
- DE ESTEFANO H., y col. 2001. Estudio Ultraestructural del Testículo de Ratones Infectados Experimentalmente con un aislado de Tripanosoma evansi. Revista Agrobiológica. IDECYT.Nº-1 p. 20-23.
- DÍAZ UNGRÍA, C. 1960. Parasitología Venezolana. Volumen I, Monografía n. 6. Sociedad de Ciencias Naturales la Salle. Fundación la Salle de Ciencias Naturales. Editorial Sucre C.A.
- DÍAZ UNGRÍA, C. GALLARDO, M. F. & YÉPEZ, M. M. S. 1965. Comportamiento del Trypanosoma venezuelense en animales de laboratorio. Rev. Vet. Venezuela. XIX: 113: 349-361.
- DÍAZ UNGRÍA, C. & ZEUSS, M. 1971. Transmisión del Trypanosoma evansi y Trypanosoma cruzi a partir de heces de animales infectados por vía bucal. Revista Veterinaria de Venezuela, n. 30, (176): 187-198.
- DILLMANN, J. S. S. and TOWNSEND, A. J. 1979. A Tripanosomiasis survey of wild animals in the Luangua Valley, Zambia. Acta Tropica. 36: 349-356.

- EDWARDS, J. T. (1926).: The chemotherapy of Surra (Trypanosoma evansi infections) of horses and cattle in media. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 20, 10-71.
- ELMASIAN, M. y MIGONE, L. E. 1904. Mal de caderas des animaux domestiques et sauvages (Epidemies paralleles). Ann. Inst. Pasteur. 18: 587-589.
- FAIRB, H. 1956. The infectivity to man of Syringe-passaged strains of T. rhodesiense and T. gambiense. Am. Trop. Med. Parasitol. 50: 167.
- FAIRB, H. & CULWICK, A. T. 1949. The differentiation of the polymorphic trypanosomes. Ann. Trop. Med. Parasitol. 43: 90.
- GARCÍA, F. 1988. Infección experimental de caballos con Trypanosoma evansi. (=T. venezuelense). Aspectos patológicos y antigénicos. Tesis M. Sc. En Ciencias Biológicas. USB. Caracas.
- GARCÍA, F., RIVERA, M. Y ORTEGA, M. 1989b. Asociación entre la tripanosomiasis equina (derrengadera) en un hat del Alto Apure. II Jornadas Científicas y de Actualización en Medicina Veterinaria Equina. Resúmenes. BAVMVEE 1. (1 y 2).
- GARCÍA , F. 1990. Técnicas directas para el diagnóstico de hemoparásitos. Hemoparásitos: Biología y Diagnóstico. Cuadernos, Serie Biología. USB. 1: 115-147.
- GILL, B.S. 1971. Studies on the serological diagnosis of Trypanosoma evansi. J. Comp. Path. 75: 175-183.

- GILL, B. S. (1972): Studies on Surra. VIII. Therapeutic activity of oxophenarsive hydrochloride, Ml w., pentamidine, quinapyramine suraminate and two terephthalnilide compounds in equine surra. *Indian J. Anim. Sci.*, 42, 278-280.
- GÓMEZ RODRÍGUEZ, R. 1956. Estudio de la tripanosomiasis natural del canino (Canis fam) en Venezuela. *Revista Médica Veterinaria Parasitológica*. XV (1-4): 63-105.
- GONZÁLEZ, R.A. 2000. Trypanosoma evansi: Variaciones morfométricas y cambios hematológicos en Mus Musculus infectados experimentalmente. Trabajo de Grado. Venezuela, p-1.
- HOARE, C. (1950). *Handbook of Medical Protozoology*. The Williams & Wilkins Company. Baltimore. p. 170-218.
- HOARE, C. A. 1950. A Kinetoplastic strains of Trypanosoma evansi and the status of allied trypanosomes. *Rev. Soc. Mexicana Mist. Nat.* 10 (1-4): 81.
- HOARE, C. A. 1954. The loss of the Kinetoplastic in trypanosomes, with special reference to Trypanosoma evansi *J. Protozool.* 1: 28-33.
- HOARE, C.A. 1965. Vampire rale as vectors and hosts equine and bovine Tripanosomes. *Acta Trop.* 22(3): 204-215.
- HOARE, C.A. 1972. *The trypanosomes of mammals (a zoological monograph)*. Blackwell Scientific Publication. Oxford. p. 6-20; 31-51; 63-119.

- HÖRCHNER, F.; AHMED, J.S. & GEILER, B. 1984. Antigenic Variation of Trypanosoma evansi in rabbits. 35: 242-246.
- INTERNATIONAL LABORATORY FOR RESEARCH ON ANIMAL DISEASES "ILRAD" (1987). Trypanosomiasis. Annual report of the international laboratory for research animal diseases. Pp. 33-49.
- INTERNATIONAL LABORATORY FOR RESEARCH ON ANIMAL DISEASES "ILRAD" (1988). New approaches to the diagnosis of African Trypanosomiasis. ILRAD Reports. 6(4): 1-4.
- IRIARTE, D.R. 1941. Tripanosomiasis caballar. Bol. Lab. Clin. Luis Razetti. 2(5): 91-100.
- JONES T. W., McKINNELL C. D., Antigenic variation in Trypanosoma evansi: a comparison of the predominant variable antigen type repertoire of stocks from Sudan (1985a) Trop. Med. Parasit. 36: 205-209.
- JONES T. W., McKINNELL C. D., Antigenic variation in Trypanosoma evansi: a comparison of the predominant variable antigen type (VAT) composition of first relapse populations in mice (1985b) Trop. Med. Parasit. 36: 127-130.
- JONES T. W., McKINNELL C. D., Antigenic variation in Trypanosoma evansi. Isolation and Characterization of Variable Antigen Type Populations from rabbits infected with a stock of T.evansi (1984) Trop. Med. Parasit. 35: 237-241.

- KUBES, V. (1939). Estudio acerca de la existencia de la anemia infecciosa de los equinos en la América del Sur y presencia en Venezuela y confusión con la tripanosomiasis caballar. Las llamadas “peste boba” y “Derrengadera”. Ministerio de Agricultura y Cría. Venezuela. pp.36.
- LANHAM, S.; GODFREY, D. (1970). Isolation of salivarian trypanosomes from man and other mammals using DEAE-Cellulose. Exp. Parasitol.
- LOSOS, G. J. 1980. Diseases caused by Trypanosoma evansi. A review. Vet. Res. Comm. 4: 165-181.
- LUCKINS, A.G., Trypanosoma evansi en Asia (1998). Parasitology Today: 4: 137-142.
- LUCKINS A. G., GRAY A. R., RAE, P. (1988). Comparison of the diagnostic value of serum immunoglobulin levels, an enzyme-linked immunosorbent assay and a fluorescent antibody test in experimental infections with Trypanosoma evansi in rabbits. Ann. Trop. Med. Parasitol. 72: 429-441.
- MESNIL, F. 1910. Identification the quelques trypanosomes pathogens. (Citado por Gonzalez Rincones, 1914). Bull Soc. Path. Exot. T. III: 376.
- MOLYNEAUX, D. H. (1975). Diagnostic methods in animal Trypanosomiasis. Vet. Parasitol. 1: 5-17.

MOULINEAUX, D. H. and ASHFORD, R. W. 1983. The biology of Trypanosoma and Leishmania parasites of man and domestic animal. Taylor and Francis Ltd. John Street, London.

MORALES, G. A.; WELLS, E.A. Y ANGEL, D. (1976). The capibara (Hydrochoerus hydrochaeris) as a reservoir host for Trypanosoma evansi. J.Wildlife Disease. 12(4): 572-574.

MULLA, A. F. and Rickamn, L. R. 1988. How do African game animals control trypanosome infections. Parasitology Today. 4 (12): 352-354.

MURRAY, M. MORRISON, D. I. and WHITELOW, D.D. 1982. Host susceptibility of African trypanosomiasis: Trypanotolerance. Advances in Parasitology. 21: 1-69.

NUNES, V. L. B. and OSHIRO, E. T. 1990. Trypanosoma evansi in the coati from the pantanal region of Mato Grosso do sul State, Brasil. Trans Royal Soc. Trop. Med. Hyg. 84: 692.

O.E.A. 1980. Manual de Técnicas Básicas para el Laboratorio de Salud. Serie Paltex. 433: 366-368.

ONAH, D. N., HOPKINS, J., and LUCKINS, A. G. (1996). Hematological changes in sheep experimentally infected with Trypanosoma evansi. Parasitol. Res. 82: 659-663.

PALMER, G. H.; KOCAN, K.; BARRON, S. J.; HAIR, J. A.; BARBET, A.F.; DAVIS, W.C. y Mc. GUIRE, T. C. (1985). Presence of common antigens including major surface protein epitopes; between the cattle

- (intraeritrocitic) and tick stages of Anaplasma marginale. Infect. Imm. 50(3): 881-886.
- PEGRAM, R. G. and SCOTT, I. M. 1976. The prevalence and diagnosis of Trypanosoma evansi infection in camels in Southern Ethiopia. Trop. Anim. Helth Prod. 8: 20-27.9612097
 - PERRONE, T. 1992. Variación Antigénica en un aislado venezolano de Trypanosoma evansi. Trabajo de Grado. Venezuela. p. 1-26.
 - QUEIROZ, A.; CABELLO, P. & JAMSEN, A. 2000. Biological and Biochemical characterization of isolates of Trypanosoma evansi from Pantanal of Matogrosso-Brazil. Veterinary Parasitology. 92: 107-118.
 - RAISINGHANI, P.M. and SWARNKAR, C. P. 1992. Efficacy of diagnostic test in surra. First international seminar on non- tsetse transmitted animal trypanosomiasis. O.M.S. Fondation Marcel Mérieux. Annecy. Francia.
 - RANGEL, R. 1910. Nota preliminar sobre la peste boba y la derrengadera de los équidos de los llanos de Venezuela. (Tripanosomiasis). Gaceta Médica de Caracas. XII (14). 105-112.
 - REVERÓN, J. 1992. Tripanosomiasis en chigüires y su diagnóstico mediante el ensayo Elisa. Trabajo de Grado. Venezuela. p. 10-12.
 - REVERÓN, J. 1996. Hemoparasitosis bovinas. Anauco Ediciones, p. 222.
 - REYNA, A. 1991. Ensayo inmunoenzimático (ELISA) y su aplicación para detectar anticuerpos de equinos anti-Trypanosoma evansi (= T.

- SOULSBY, E.J. 1988. Parasitología y enfermedades parasitarias en los animales domésticos. Nueva Editorial Interamericana S.A. de C.V. Séptima Edición. México.
- STEVENS, J. R., NUNES, V. L. B., LANHAM, S. M. and OSHIRO, E. T. 1989. Isoenzyme characterization of Trypanosoma evansi isolated from capybaras and dog in Brasil. Acta Tropica. 46: 213-222.
- SUDARTO, M. W.; TABEL, H. Y HAINES, D. M. (1990). Immunohistochemical demonstration of Trypanosoma evansi in tissues of experimentally infected rats and naturally infected water buffalo (Bubalus bubalis). J.Parasitol. 76(2): 162-167.
- TEJERA, E.; LEJER, 1920. Tripanosomiasis animales au Venezuela. Bull. Soc. Path. Exot. 13: 297-305.
- TURNER, M. J., DONELSON J. E., How the trypanosome changes its coat (1985) Scientific American: 44-51.
- TURNER, M. J., Trypanosome variant surface glycoprotein in: "**The Biology of Parasitism**"(1988). MBL lectures in biology. Vol. 9, Alan R. Liss. Inc. Editors Paul T. Englund and Alan Sher. New York, USA.
- TURNER, M. & DONELSON, J. 1990. Cell Biology of African Trypanosomes. En: modern parasite Biology Cell. Cellular, Immunological and Molecular Aspects (D.Wyler, Ed.)
- VICKERMAN, K. & BARRY, J. 1982. African Trypanosomiasis. In: Immunology parasitic infection. Edit. By Cohen and K.S. Warren. Second Edition Blackwill. P. 205-260.

- venezuelense). Trabajo presentado para optar al título de Magíster Scientiarum en Medicina Veterinaria. UCV, Maracay.
- RIVERA, M. A. 1981. Nemátodos del género Strongyloides grassi, 1879, en chigüires (Hydrochoerus hydrochaeris) de Venezuela. I Jornadas Informativas de la FVC-UCV. Maracay.
 - ROSSI, M. 1994. Ensayo inmunoenzimático (ELISA) para el diagnóstico de la tripanosomiasis bovina causada por Trypanosoma vivax. Trabajo de Grado. Venezuela. p. 1-11.
 - SCHALM, O. W., y col. (1975) The mouse. Veterinary Hematology. EEUU.
 - SCHÖNEFELD, A. (1979): Parasitologischer, klinischer und Serumenterverlauf bei mit Trypanosoma evansi (steel, 1885) infizierten Ponys. Vet. Med. Dis., FU Berlin
 - SCHROEDER, W. F., TORO, B. M., RUÍZ, R.H. y LINARES, O. L. 1972. Transmisión del Trypanosoma evansi en ratones. Ciencias Veterinarias 1 (4): 129-136.
 - SCORZA, J. V. and DARGET, B. 1955. Estudio comparativo de las curvas parasitarias del Trypanosoma venezuelense en ratones blancos y cobayos. Gac. Med. Caracas. 62 (5-6): 169-188.
 - SOLTYS, M. A. & WOO, P. 1970. Biological differences of two substrains of Trypanosoma brucei maintained by syringe in two different host. Ann. Trop. Med. Parasitol. 64 (2): 249-254.

- VOGELSANG, E. G. y ARMAS, J. 1946. Observaciones con el Trypanosoma venezuelense Mesnil, 1910. Rev. Med. Vet. y Paras. 5 (1): 39-43.
- WEIMAN, D. (1963). Problems of diagnosis of Trypanosomiasis. Bull. Wrld. Hlth. Org. 26: 731-743.
- WILLET, K. E. & FAIRB. 1955. The tinde experiment: a study of Trypanosoma rhodiense during eighteen years of cyclical transmission. Ann. Trop. Med. Parasit. 49: 278.
- WOO, P. T. K. (1979). The haematocrit centrifuge for the delection of trypanosomes in blood. Can. J. Zool. 47: 921-923.
- <http://www.ivic.ve/biblioteca/>
- <http://www.elsevier.com>
- <http://www.pub.med.com>
- http://www.oie.int/esp/maladies/es_classification.htm