

ESTUDIOS PARASITOLÓGICOS, HEMATOLOGICOS E HISTOPATOLÓGICOS EN RATONES INFECTADOS CON *TRYPANOSOMA EVANSI*

A PARASITOLOGICAL, HEMATOLOGICAL AND HISTOPATHOLOGICAL STUDY OF MICE INFECTED WITH *TRYPANOSOMA EVANSI*

Liliam Cañas(1)

Luis Eduardo Ramírez(1)

Amado Uribe(2)

Maricela Atehortúa(3)

RESUMEN

En el presente trabajo se estudió el comportamiento parasitológico, hematológico e histopatológico causado por *Trypanosoma evansi* en ratones. Se hizo un seguimiento diario de la parasitemia y de los valores sanguíneos: hemoglobina, hematocrito, recuento y diferencial de leucocitos. En determinados períodos de tiempo se sacrificaban los animales para medir los índices esplénico y hepático y para tomar biopsias de diferentes órganos y tejidos.

Los resultados obtenidos demuestran una correlación directa entre el incremento de la anemia, con la parasitemia y el índice esplénico. El estudio histopatológico reveló hiperplasia en bazo e hígado, indicando un proceso congestivo sin foco de necrosis y muchas células cargadas con hemosiderina, mientras que los demás órganos presentaron una histología normal. Igualmente hubo ausencia de trypomastigotes y amastigotes a nivel tisular.

ABSTRACT

The parasitological, hematological and histopathological behavior of *Trypanosoma evansi* in mice was studied. Daily control of the parasitemia and blood values of hemoglobin, hematocrit, white blood count and differential leucocyte count were followed. The mice were sacrificed at intervals in order to measure splenic and hepatic indices and perform biopsies on the different tissues and organs.

The results showed a direct correlation among increases in anemia, parasitemia and the splenic index. The histopathological study demonstrated hyperplasia of the spleen and liver, indicating a congestive process without a specific area of necrosis; in addition, many cells were found filled with hemosiderin. The remaining organs presented a normal histological picture.

INTRODUCCION

En Colombia existen pocos estudios sobre el *Trypanosoma evansi*, agente etiológico de la derrengadera o mal de caderas. Ramírez et al. (1979a) resumieron cronológicamente la información suministrada por reconocidos médicos veterinarios del país sobre esta tripanosomiasis, llegando a la conclusión de que puede existir en forma endémica en algunas regiones, afectando principalmente equinos.

Morales y Carreño (1976) aislaron, en las cercanías de la Estación Experimental de Carimagua (Llanos Orientales de Colombia), el *T. evansi* de caballos, perros y capibaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) inoculando sangre de estos animales en ratas, vía intraperitoneal. Morales (1978) relata en detalle los cambios histopatológicos que observó en un perro sacrificado, del cual se aisló el parásito, encontrando una invasión de todos los tejidos. Ramírez et al. (1979b) continuaron el estudio de las cepas de *T. evansi* aisladas por

(1) Profesor, Depto de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Univ. de Antioquia, Medellín, Colombia.

(2) Profesor, Depto de Patología, Facultad de Medicina, Univ. de Antioquia, Medellín, Colombia.

(3) Profesora, Depto de Morfología, Facultad de Medicina, Univ. de Antioquia, Medellín, Colombia.

Morales y Carreño (1976). Estudiaron la variación antigénica usando la aglutinación directa de cepas y clonas y establecieron una relación antigénica entre los aislamientos a partir de los diferentes huéspedes.

En este trabajo se propuso seguir el estudio de una de las cepas aisladas en Carimagua (Llanos Orientales de Colombia), con el objetivo de conocer su comportamiento parasitológico, hematológico e histopatológico en ratones experimentalmente infectados con *T. evansi*.

MATERIALES Y METODOS

La cepa de *T. evansi* que se utilizó fue aislada en ratas por Morales y Carreño (1976) a partir de un capibara cerca de la Estación Experimental del Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) en Carimagua, en los Llanos Orientales de Colombia. Esta cepa se mantuvo en ratones blancos mediante el pasaje de sangre infectada con el parásito.

Se utilizaron 70 ratones albinos machos de seis semanas de edad y un peso aproximado de 18 a 20 g. Cincuenta y seis (56) animales formaron el grupo experimental y los catorce (14) restantes, el grupo control.

El grupo experimental fue inoculado vía intraperitoneal con 1×10^6 tripomastigotes de *T. evansi*, suspendidos en solución de Hank, constituyendo este momento la hora cero de la experiencia. Para los propósitos de nuestro estudio a las 1/2, 1, 2, 4, 8, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168 y 192 horas, se sacrificaron cada vez cuatro ratones inoculados y uno normal.

La parasitemia se estudió inicialmente mediante el método de concentración de Woo (1969) y una vez que ésta se hacía positiva, se procedía a contar los parásitos en una cámara Neubauer, previamente diluidos en solución de Hank.

Para el recuento de leucocitos y el estimativo del grado de anemia, la sangre de los ratones se recolectó en frascos que contenían heparina y se procedió luego a medir el hematocrito y el contenido de hemoglobina y a hacer un recuento de glóbulos blancos por los métodos convencionales.

Para medir los índices esplénico y hepático de cada ratón, se pesaron en una balanza de precisión el bazo y el hígado y se coleccionaron estos pesos con el peso total del animal antes de su sacrificio.

De los animales sacrificados, tanto inoculados como sanos, se tomaron biopsias de bazo, hígado, médula ósea, riñón, corazón, cerebro, músculo estriado, intestino y piel, las cuales se fijaron en formalina al 10o/o, para luego ser sometidas a inclusión en parafina en secciones de 5 μ , coloreadas con hematoxilina-eosina.

El examen postmortem se realizó en cada uno de los animales, tanto de aquellos que murieron en el curso del experimento como de aquellos que fueron sacrificados.

RESULTADOS

Los tripomastigotes de *T. evansi* fueron visibles en sangre periférica a partir de las 24 horas siguientes a la inoculación. En este momento la parasitemia fue de 120 tripomastigotes/mm³. Luego, el incremento se hizo cada vez más significativo y, a las 144 horas (sexto día), alcanzó valores de 17.500 tripomastigotes/mm³ (fig. 1).

Las curvas de los índices de hemoglobina y hematocrito tuvieron un comportamiento semejante (fig. 2). La anemia se incrementó especialmente a partir de las 24 horas; a las 144 horas los índices de hemoglobina y hematocrito fueron la mitad de los valores con respecto a los animales control.

En cuanto a la población celular, los índices porcentuales de polimorfonucleares neutrófilos y linfocitos tuvieron relación inversa en todo el tiempo experimental (fig. 3); sin embargo, se notó un aumento significativo de los primeros a las 48 horas, que coincidió con el tiempo en el cual se incrementó la parasitemia y el índice esplénico.

En la figura 4 se muestran las variaciones cíclicas con respecto a los índices, en valores absolutos, de los polimorfonucleares neutrófilos y de los linfocitos, las cuales fueron similares; en tanto que el índice de valor absoluto leucocitario presentó elevación inicial en las cuatro primeras horas y posteriormente se invirtió en una leucopenia hasta el momento final de la experiencia.

En el extendido de sangre periférica los glóbulos rojos mostraron poiquilocitosis a partir de las 48 horas e igualmente policromatofilia asociada a la anemia.

Fueron de gran interés los cambios macroscópicos ocurridos en bazo e hígado. El índice esplénico fue significativo por su aumento a partir de las 72 horas, mientras que el incremento en hepatomegalia fue menor (fig. 5).

El estudio histológico de los diferentes órganos y tejidos (médula ósea, riñón, corazón, cerebro, músculo esquelético, intestino, piel, hígado y bazo) en los ratones inoculados y no inoculados y sacrificados a diferentes tiempos, fue notorio por lo exíguo de las alteraciones producidas. En el hígado hubo hiperplasia marcada de las células de Kuffer, muchas de ellas cargadas con pigmento de hemosiderina semejante a lo que se presenta en la malaria; los sinusoides contenían pocos eritrocitos como posible resultado de una hemólisis. En el bazo también ocurrió hiperplasia celular, la cual obedecía a una congestión, pero sin focos de necrosis y con la presencia de acúmulos focales de pigmento.

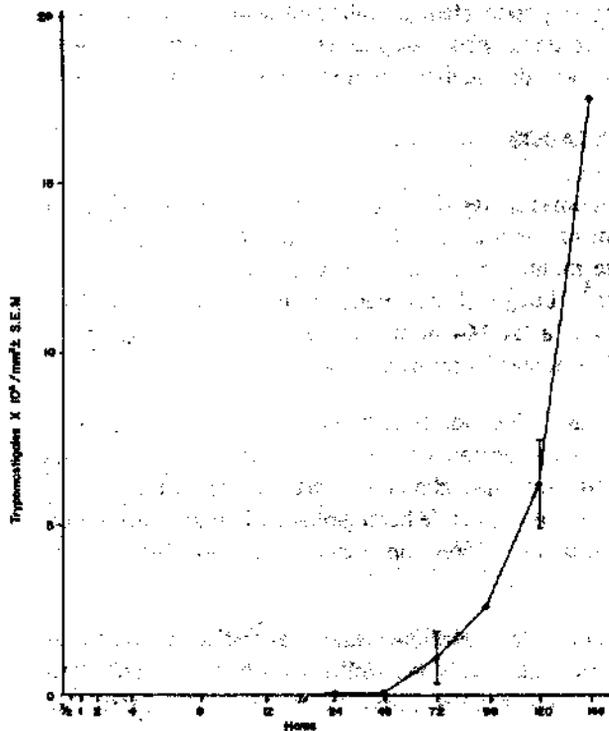


Fig. 1. Parasitemia en ratones infectados con *Trypanosoma evansi* (1×10^6 i.p.).

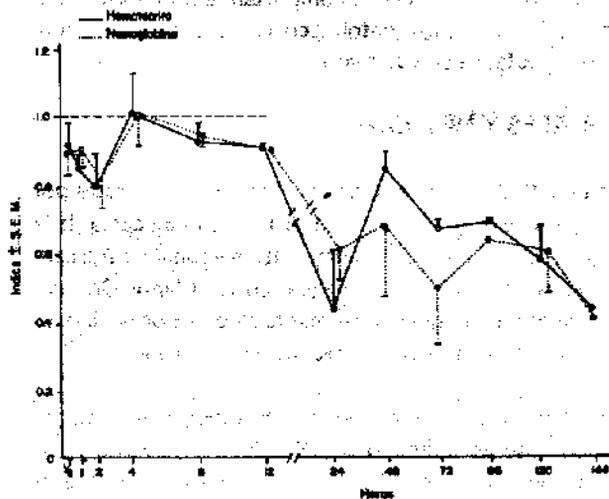


Fig. 2. Indices de hemoglobina y hematocrito en ratones infectados con *Trypanosoma evansi* (1×10^6 i.p.).

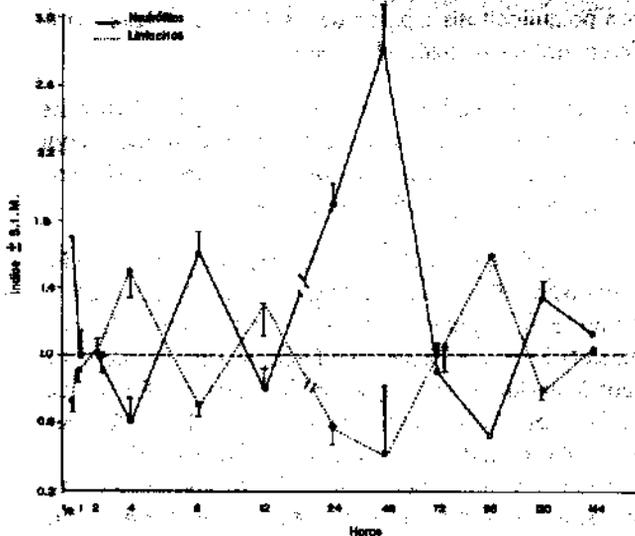


Fig. 3. Indices de porcentajes de neutrófilos y linfocitos en ratones infectados con *Trypanosoma evansi* (1×10^6 i.p.).

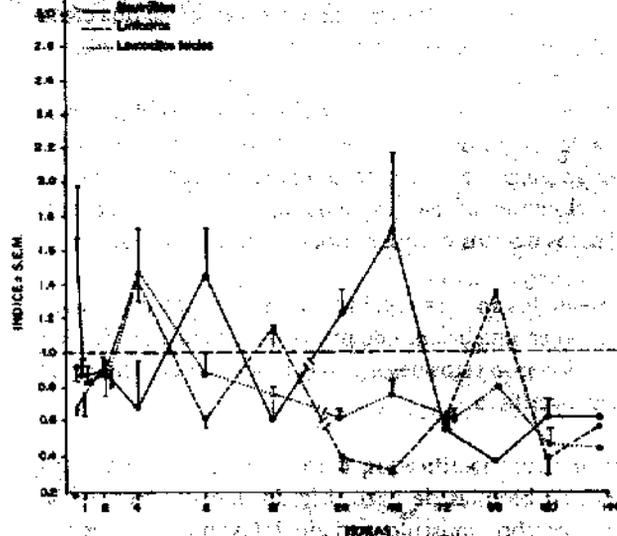


Fig. 4. Indices de valores absolutos de leucocitos en ratones infectados con *Trypanosoma evansi* (1×10^6 i.p.).

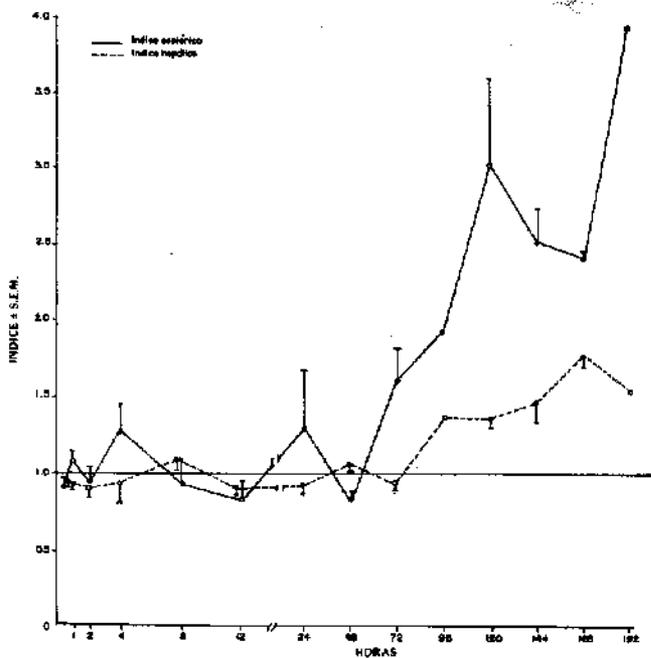


Fig. 5. Índices esplénico y hepático en ratones inoculados con *Trypanosoma evansi* (1×10^6 tripomastigotes i.p.).

Los demás órganos y tejidos examinados presentaron una histología normal. No se encontraron tripomastigotes ni amastigotes a nivel tisular, excepto lo observable en sangre periférica con parasitemia muy intensa.

DISCUSION

El curso de la enfermedad experimental en el ratón infectado con *Trypanosoma evansi* fue de carácter agudo y se manifestó por altos niveles de parasitemia, anemia, leucopenia, esplenio y hepatomegalia.

La infección patente se hizo presente a partir de las 24 horas después de la inoculación, observándose un patrón de parasitemia bien notable debido a su crecimiento exponencial continuo que alcanzó sus valores máximos en la fase terminal de la infección. Un comportamiento igual en ratones blancos de laboratorio fue observado por Díaz-Ungría (1965 y 1967) y Llukevich (1957) quienes demostraron que la parasitemia experimental con *Trypanosoma venezue-*

lense (T. evansi), es un proceso continuo, cuyo período de incubación (mínimo 3 días) variaba con la dosis parasitaria inoculada y terminaba con la muerte de los animales. Estos mismos autores reportaron un período prepatente mínimo de 3 días, lo cual contrasta con nuestros resultados, pues en este trabajo los parásitos se detectaron a las 24 horas. Esto probablemente pueda explicarse por el hecho de que en la presente experiencia se utilizó la técnica del hematocrito de centrífuga de Woo (1969) para la búsqueda directa de *T. evansi*, la cual se ha usado extensamente con éxito para la detección de *T. brucei*, *T. vivax* y *T. congolense* en ganado experimentalmente infectado, antes de que las infecciones puedan ser observadas al examen en fresco (Woo y Kauffman, 1972).

La anemia comenzó a aumentar a medida que el número de parásitos se incrementaba, llegando la hemoglobina y el hematocrito en la fase final de la infección a ser la mitad de los valores observados al comienzo de la experiencia o al de los animales controles. Existen evidencias de que durante las fases iniciales parasitemicas de la enfermedad, la destrucción de los glóbulos rojos se relaciona con la presencia de los mismos tripanosomas (Hvan et al., 1975; Tizard y Holmes, 1978) y que este efecto sea potenciado por factores inmunológicos y fisiológicos que tornan a la célula más vulnerable a la eritrofagocitosis por el sistema fagocítico mononuclear. Esta última posibilidad se basa en el concepto de que las inmunoglobulinas específicas para los tripanosomas se unen al complemento y este complejo se une a los glóbulos rojos llevándolos a su secuestro y destrucción. Se ha demostrado que esto ocurre en terneros infectados con *Trypanosoma congolense* (Kobayashi et al., 1976) y en conejos infectados con *Trypanosoma brucei* (Dodd et al., 1978). Posiblemente estos hechos puedan explicar los cambios histopatológicos observados en los ratones de nuestro experimento, en los que se demostró marcada hiperplasia de las células de Kuffer y del bazo, las cuales estaban cargadas con depósitos de hemosiderina, lo que puede indicar que haya ocurrido una deficiencia en la utilización del hierro originada probablemente por el severo proceso infeccioso (Dargie et al., 1979).

Debido a la presencia de leucopenia y de lesiones histopatológicas a nivel del bazo e hígado en los ratones infectados, órganos que son considerados órganos blanco en términos de respuesta a la tripanosomiasis animal, consideramos necesario continuar el estudio de la patogénesis de la respuesta linfocitaria y la inmunidad causada por estos parásitos.

LITERATURA CITADA

- Dargie, J.D., M. Murray, W.R.T. Grimshaw, P.K. Murray y W.I.M. McIntyne. 1979. Bovine Trypanosomiasis: The Red Cell Kinetics of N'dama and Zebu Cattle Infected with *Trypanosoma congolense*. *Parasitology* 78: 271-286.
- Díaz-Ungría, C. 1965. Comportamiento del *Trypanosoma venezuelense* en animales de laboratorio. *Rev. Vet. Venezolana*. 19: 349-361.
- . 1967. Transmisión bucal con *Trypanosoma venezuelense*. *Bol. Acad. Cienc. Fis. Mat. Nat.* 27: 51-57.
- Dodd, B.E., G.C. Jenkin, P.J. Lincoln y P. McCrorie. 1978. The Advantage of a Build-up Antiglobulin Technique for the detection of immunoglobulin on the red cells of rabbits infected with Trypanosomes. *Trans. Roy. Trop. Med. and Hyg.* 72: 501-505.
- Hvan, C.N., L. Webb, P.H. Lambert y P. A. Meishcher. 1975. Pathogenesis of the Anemia of African Trypanosomiasis characterization and purification of a hemolytic factor. *Schweizerische Medizinische Wochenschrift*. 122: 299-325.
- Kobayashi, A., I.R. Tizard y P.T.K. Woo. 1976. Studies on the anemia in experimental african Trypanosomiasis. II. The Pathogenesis of the anemia in calves infected with *Trypanosoma congolense*. *Am. J. Trop. Med. and Hyg.* 25: 401-406.
- Llukevich, A. 1957. Contribución al Estudio de la Tripanosomiasis del ganado caballar en los Llanos de Venezuela. *Rev. Vet. Venezolana*. 3: 3-42.
- Morales, G.A. y F. Carreño. 1976. The *Proechimys* Rat: A Potencial laboratory host and model for the study of *Trypanosoma evansi* *Trop. Anim. Hlth. Prool.* 8: 122-124.
- Morales, G.A. 1978. Patología de la Tripanosomiasis Canina. *Rev. Col. Cienc. Pec.* 7: 4-7.
- Ramírez, L.E., E.A. Wells y A. Betancourt. 1979a. La Tripanosomiasis en animales domésticos en Colombia. Centro Internacional de Agricultura Tropical, Cali — Serie 09Sg-1.
- Ramírez, L.E., E.A. Wells, L.R. Caraballo y H. Hanssen. 1979b. Estudio de Variaciones Antigénicas en copas de *Trypanosoma evansi*. *Rev. Lat. Amer. Microbiol.* 27: 1-5.
- Tizard, I.R. y W.L. Holmes. 1978. The generation of toxic activity from *Trypanosoma congolense*. *Experientia*. 32: 1533-1534.
- Woo, P.T.K. 1969. The hematocrit centrifuge for the detection of Trypanosomes in blood. *Can. J. Zool.* 47: 921-923.
- Woo, P.T.K. y M. Kaufman. 1972. The hematocrit centrifuge technique for the detection of virulent strains of Trypanosomes of the *Trypanosoma congolense* Sub-group. *Acta Tropica*. 28: 304-308.