

Efecto de inóculos bajos en la infección experimental por *Trypanosoma cruzi**

Elio Moreno¹, Néstor Añez¹, Cecilia de Scorza¹, Ana Lugo de Yarbuh¹ y Rafael Borges²

Se inocularon grupos de ratas Wistar machos por vía intradérmica (ID) o instilados en la conjuntiva (C) con 5×10^2 , 5×10^3 ó 5×10^4 tripomastigotos sanguícolas (tps) de *Trypanosoma cruzi*, procedentes de ratones NMRI donadores con altas parasitemias y tripomastigotos metacíclicos (tpm) obtenidas de medios de cultivo por elusión en columnas de DEAE-celulosa. Las parasitemias patentes, la respuesta humoral y las alteraciones histopatológicas, fueron evaluadas entre los 5 y 90 días post-infección (pi). Las infecciones patentes fueron detectadas entre los 10 y 35 días pi, observándose a los 20 días entre 64,2 y 100 % de infección en las ratas inoculadas con tps por vía ID, y con parasitemias promedios de hasta 33 ± 5 tps./mm³ y 28,5 y 71,4 % en las instiladas por vía C. Los grupos inoculados o instilados con tpm, mostraron a los 35 días pi, índices de infección que oscilaron entre 7,1 y 50%, y 7,1 y 35,7%. El análisis de los resultados reveló diferencias altamente significativas ($P < 0,001$) cuando se comparan forma del parásito, inóculo, vía de inoculación y período de infección. En ningún caso se registró mortalidad de los animales experimentales. Se detectaron Ac anti-*T. cruzi* en forma apreciable en todos los grupos experimentales a partir de los 10 y 15 días pi, observándose diferencias altamente significativas ($P < 0,001$) entre las ratas inoculadas con tps o tpm por vía ID y las instiladas por vía C. Los máximos títulos de anticuerpos (TAc) (1:2048 y 1:4096) fueron observados entre los 20 y 60 días respectivamente, manteniéndose en niveles elevados en algunos casos hasta los 90 días cuando finalizó el período de observación. El estudio histopatológico reveló el establecimiento de una miocarditis y miositis aguda y subaguda cuya intensidad y extensión dependen de la cantidad del inóculo (5×10^4), de la forma del parásito (tps) y de la vía de inoculación (ID).

Palabras clave: *Trypanosoma cruzi*, rata Wistar, tamaño del inóculo, vías de inoculación, infección chagásica.

INTRODUCCIÓN

La necesidad de contar con un modelo animal en el cual el curso de la infección y la patología evolucionen de manera similar a la humana, ha representado uno de los grandes obstáculos para el estudio integral de la enfermedad de Chagas. En este sentido, se ha referido que la mayoría de los modelos reproducen alguna de las fases de la enfermedad, limitando de alguna manera, la total comprensión del curso de la infección bajo condiciones naturales o experimentales (WHO, 1984).

Por otra parte, los resultados publicados en la literatura son contradictorios en relación a la infectividad de *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909) cuando se utilizan diferentes formas del parásito, vías de inoculación y tamaño del inóculo.

Algunos autores han planteado que la rata blanca (*Rattus norvegicus*), infectada experimentalmente con *T. cruzi*, reproduce la fase aguda de la enfermedad de Chagas humana, desarrollando una miocarditis aguda intensa la cual evoluciona sin quimioterapia, pasando a una fase crónica caracterizada por escasas alteraciones electrocardiográficas y mantenimiento de la respuesta humoral y celular (Scorza, 1982; Moreno *et al*, 1996, 1997).

En el presente estudio se detalla el efecto que

*Financiado por el CDCHT de la Universidad de Los Andes a través de los Proyectos C-694-94B y C-909-98-83-A.

¹Investigaciones Parasitológicas "J. F. Torrealba", Departamento de Biología, Facultad de Ciencias. ²Instituto de Estadística Aplicada y Computación, Universidad de Los Andes, Mérida-5101-Venezuela.

sobre el modelo rata Wistar tienen los inóculos bajos de las formas sanguíneas y metacíclicas de *T. cruzi* inyectados por la vía intradérmica e instilados en la subconjuntiva. Se hace un seguimiento del curso de la infección aguda y subaguda tomando en consideración la estimación de los niveles de parasitemia, la evolución de la respuesta humoral expresada como títulos de anticuerpos y las alteraciones histopatológicas en la musculatura esquelética y cardíaca, durante los primeros 90 días de infección.

MATERIALES Y MÉTODOS

Un total de 456 ratas Wistar, machos de 2 a 3 meses de nacidos y 250 g de peso, fue utilizado en el presente estudio; las ratas fueron divididas en dos lotes de 228, los cuales fueron inoculados por la vía intradérmica (ID) e instilados en la subconjuntiva (C). A su vez cada lote fue subdividido en dos grupos de

114 animales, los cuales fueron infectados uno con tripomastigotos metacíclicos (tpm) de cultivos de *T. cruzi* cepa "Y" (Silva & Nussenzweig, 1953) aislados por columnas de DEAE-celulosa (Souza, 1983) y el otro con tripomastigotos sanguíneos (tps) obtenidos de ratones NMRI donadores con altas parasitemias. De cada grupo de 114 ratas se establecieron 3 subgrupos de 38 animales los cuales recibieron inóculos de 5×10^2 , 5×10^3 y 5×10^4 formas flageladas infectantes según el caso (Tabla 1). Como control fueron utilizadas 84 ratas sanas con las mismas características arriba señaladas, las cuales fueron inyectadas con 0,1 ml de solución fisiológica salina.

Evaluación de la infección. En cada grupo experimental de 38 ratas infectadas, 14 fueron evaluadas individualmente; 10 ratas en forma continua a los 5, 10, 15, 20, 35, 60 y 90 días post-inoculación (pi), estimando niveles de parasitemia y títulos de anticuerpos (TAc) anti *T. cruzi*. Previa evaluación sero-parasitológica, 4

TABLA 1
Identificación de los grupos experimentales de ratas infectadas con tripomastigotos de *Trypanosoma cruzi**

Grupos	Número de ratas	Forma del parásito	Inóculo (0,1 ml)	Vías inoculación
<i>Ia</i>	38	tps	5×10^2	ID
<i>Ib</i>	38	tps	5×10^2	C
<i>Ct</i>	14	-	-	-
<i>IIa</i>	38	tpm	5×10^2	ID
<i>IIb</i>	38	tpm	5×10^2	C
<i>Ct</i>	14	-	-	-
<i>IIIa</i>	38	tps	5×10^3	ID
<i>IIIb</i>	38	tps	5×10^3	C
<i>Ct</i>	14	-	-	-
<i>IVa</i>	38	tpm	5×10^3	ID
<i>IVb</i>	38	tpm	5×10^3	C
<i>Ct</i>	14	-	-	-
<i>Va</i>	38	tps	5×10^4	ID
<i>Vb</i>	38	tps	5×10^4	C
<i>Ct</i>	14	-	-	-
<i>VIa</i>	38	tpm	5×10^4	ID
<i>VIb</i>	38	tpm	5×10^4	C
<i>Ct</i>	14	-	-	-

* tps = tripomastigotos sanguíneos
tpm = tripomastigotos metacíclicos
ID = Intradérmica
C = conjuntival
Ct = control

ratas fueron separadas al azar de las 28 restantes y utilizadas para estudios histopatológicos durante los días antes señalados.

Estudio parasitológico. La parasitemia fue estimada individualmente a las 14 ratas, siguiendo el método modificado por Brener (1962) en muestras de 5 mm³ de sangre extraídas con capilares heparinizados por punción del plexo retro-orbital durante los días de muestreos.

Determinación de la respuesta humoral. 0,5 ml de sangre del plexo retro-orbital fue utilizado para separar sueros mediante centrifugación. Los Ac específicos anti *T. cruzi* fueron determinados mediante la técnica de aglutinación directa (TAD) con previo tratamiento de los sueros con 2-Mercapto-Etanol (Storni *et al.*, 1975), utilizando como antígeno epimastigotos de *T. cruzi* colectados en fase exponencial de crecimiento en medio de cultivo NNN más solución fisiológica como fase líquida.

Estudio histopatológico. Inmediatamente después de estimada la parasitemia, las 4 ratas infectadas más un control sano fueron sacrificadas por sobreenestesia con éter dietílico durante los días de muestreos. El corazón completo cortado frontalmente en dos partes y fragmentos de músculo esquelético popliteo fueron removidos y fijados en formalina neutra 10% e incluidos en paraplást. Las secciones de 6 µm de espesor fueron cortadas con un microtomo American Optical Spencer y coloreadas por el método de Giemsa-colofonio (Bray & Garnham, 1962) para evidenciar la infección tisular.

Análisis estadístico. Los resultados obtenidos de las estimaciones de las parasitemias y niveles de anticuerpos anti *T. cruzi*, fueron analizados mediante un análisis de varianza utilizando el Proc. GLM del sistema SAS (1995) tomando en consideración los cuatro factores: forma del parásito (tps y tpm), inóculos (5x10², 5x10³ y 5x10⁴), vías de inoculación (ID y C) y días de infección (5, 10, 15, 20, 35, 60 y 90).

RESULTADOS

Evaluación de la infección. El seguimiento del curso de la infección en los grupos de ratas inoculadas por vía ID con 5x10², 5x10³ y 5x10⁴ tps de *T. cruzi*, reveló infecciones patentes entre los 10 y 35 días pi. A partir de los 15 días pi se detectó un aumento en el número de ratas infectadas, registrándose en el grupo *Ia* 64,2 % (9/14) a los 20 días pi. Igualmente, en los grupos *IIIa* y *Va* los índices de infección fueron de

100% (14/14) y 92,8% (13/14), con niveles parasitómicos promedios que alcanzaron hasta 33 ± 5 trips./mm³ a los 20 días pi y disminución de la parasitemia a los 35 días pi. En los exámenes realizados a los 60 y 90 días, no se detectaron formas sanguícolas. El grupo *Ib* de ratas instiladas por vía C con 5x10² tps, mostró infecciones tardías a los 35 días pi, que no sobrepasaron 7,1% (1/14) de los animales; mientras que los grupos *IIIb* y *Vb* que fueron instilados con 5x10³ y 5x10⁴ tps, exhibieron infección patente a partir de los 15 días pi, detectándose a los 20 días pi entre 28,5% (4/14) y 71,4% (10/14) de ratas infectadas (Figs. 1 y 2).

Por otra parte, los grupos *IIa* y *IVa* inoculados con 5x10² y 5x10³ tpm por la vía ID, mostraron bajos índices de infección (7,1 %) y discretas parasitemias a los 35 días pi. Mientras que las ratas del grupo *VIa* inoculadas con el mayor inóculo (5x10⁴ tpm) por la vía ID, 50% (7/14) de los animales manifestaron infecciones patentes a los 35 días pi, con moderados niveles de parasitemia que oscilaron entre 13 y 25 trips./mm³. En relación con los grupos infectados por vía C, el grupo *Ib* instilado con 5x10² tpm no mostró parasitemias patentes durante los días de muestreos, mientras que los grupos *IVb* y *VIb* instilados con 5x10³ y 5x10⁴ tpm, los índices de infección oscilaron entre 7,1 % (1/14) y 35,7% (5/14) a los 35 días pi, presentando discretos niveles de parasitemia (6 y 19 trips./mm³).

El análisis estadístico reveló diferencias altamente significativas (P<0,001) en cuanto a la cantidad del inóculo, siendo la parasitemia más significativa entre 5x10² y 5x10⁴.

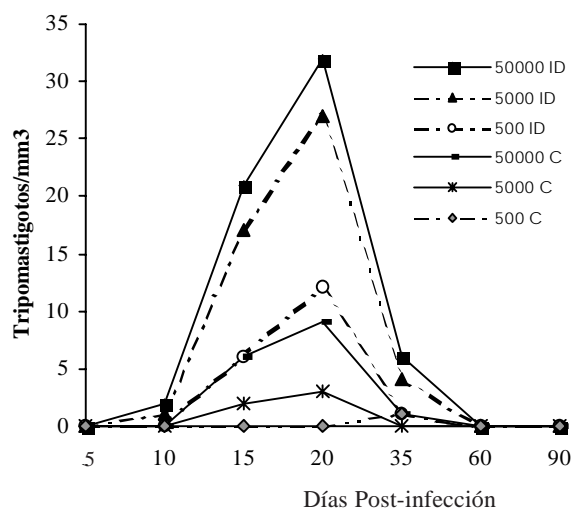


Figura 1. Parasitemia en ratas infectadas con *Trypanosoma cruzi* (ID: vía intradérmica; C: vía conjuntiva).

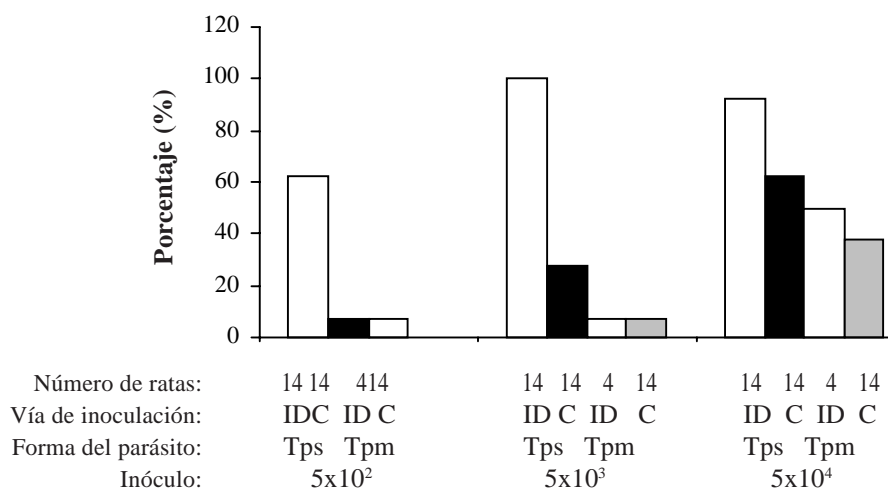


Figura 2. Porcentaje de ratas con infecciones patentes producidas por *Trypanosoma cruzi* (Tps: tripomastigotos sanguícolas; Tpm: tripomastigotos metacíclicos; ID: intradérmica; C: conjuntival).

En cuanto al período post-infección, el análisis también reveló diferencias altamente significativas ($P < 0,001$) entre cada período, siendo la parasitemia observada a los 20 > 15 > 35 días. Igualmente, el análisis mostró diferencias altamente significativa ($P < 0,001$) entre 5 y 20, 5 y 15, 10 y 15, 10 y 20, 20 y 60, 20 y 90, 20 y 35 días.

La interacción forma del parásito/inóculo y forma/vía de inoculación, fue altamente significativa ($P < 0,001$) cuando se hace la combinación tps/ 5×10^4 y se utilizan los tps por la vía ID, mientras que la interacción inóculo (5×10^3 vs 5×10^4 tpm) vía no fue significativa ($P > 0,05$). La interacción del inóculo por la vía ID y días fue estadísticamente significativa ($P < 0,01$), obteniéndose los mayores valores de parasitemia con un inóculo de 5×10^4 por vía ID a los 20 días pi.

Evolución de la respuesta humoral. Los grupos *Ia*, *IIIa* y *Va* infectados por las vías ID con 5×10^2 , 5×10^3 y 5×10^4 tps, y los grupos *IIIb* y *Vb* instilados con 5×10^3 y 5×10^4 tps, mostraron títulos apreciables de Ac anti *T. cruzi* a partir de los 10 y 15 días pi, observándose los mayores TAc (1:2048 y 1:4096) entre los 35 y 60 días pi respectivamente y manteniéndose en niveles elevados hasta los 90 días cuando finalizó el período de observación. En el grupo *Ib* instilados por vía C con 5×10^2 tps, los niveles de Ac fueron evidenciados a partir de los 35 días pi, mostrando TAc más bajos que los obtenidos en los demás grupos experimentales. En la figura 3, se presentan las gráficas de los TAc, tomando como criterio de selección la mayor frecuencia entre

los niveles de anticuerpos registrados en las 14 ratas infectadas y evaluadas durante los días de muestreos. Los grupos *Ila*, *IVa* y *VIa* inoculados y *Ilb*, *IVb* y *VIb* instilados con tpm, mostraron una respuesta humoral más tardía y de menor intensidad que la detectada para los grupos infectados con las formas sanguícolas del parásito.

El análisis estadístico entre los TAc detectados en las ratas inoculadas con 5×10^2 , 5×10^3 y 5×10^4 tps o tpm por vía ID y las instiladas por vía C, reveló diferencias altamente significativas ($P < 0,001$) entre cada uno de los factores, indicando que el mayor inóculo de 5×10^4 tps por la vía ID, producen títulos de Ac mayores que los observados en infecciones con tpm; que la vía ID es más eficaz que la C y los mayores TAc fueron detectados a los 35 días y 60 días pi.

El análisis de la interacción forma/período, inóculo/período y vías/período, reveló diferencias altamente significativas ($P < 0,001$) en cuanto a los TAc cuando se hace la comparación tps/ 5×10^4 /por la vía ID a los 20 días vs tps/ 5×10^3 /por vía ID a los 15 días.

Alteraciones histopatológicas. El estudio de las alteraciones histopatológicas en las ratas inoculadas por la vía ID con 5×10^2 , 5×10^3 y 5×10^4 formas sanguícolas de *T. cruzi*, sacrificadas entre los 5 y 90 días pi, reveló una miocarditis aguda de variable intensidad y extensión, con infiltrado inflamatorio inicial discreto de naturaleza mononuclear a partir de los 10 y 15 días pi. El infiltrado se tornó difuso en las aurículas, y focal de naturaleza linfoplasma-histiocitario en los

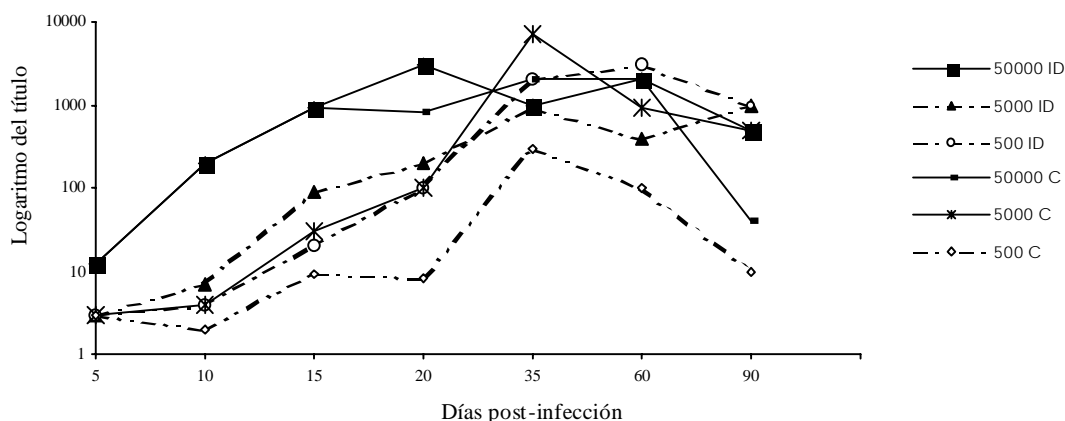


Figura 3. Anticuerpos en ratas con tripomastigotos sanguíneos de *Trypanosoma cruzi*. ID: Vía Intradérmica C: Vía Conjuntival.

ventrículos con abundantes nidos de parásitos observables aún a los 60 días pi. (Fig.4a). El músculo esquelético mostró miositis focal moderada a partir del décimo día, con parasitosis entre los 15 y 20 días pi. Contrariamente, en las ratas instiladas por vía C con los mismos inóculos de tps, se observó una miocarditis de menor intensidad, con un infiltrado inflamatorio más discreto y focalizado, así como escasos nidos de amastigotos entre los 15 y 35 días pi. Del mismo modo, el músculo esquelético mostró miositis focal discreta a partir del día 20 y escasa parasitosis tisular entre los 20 y 35 días pi (Fig.4b).

En las ratas infectadas por las vías ID y C con 5×10^2 formas metacíclicas, no se observó parasitosis tisular ni miocarditis, sólo una marcada eosinofilia en el músculo esquelético de una rata. Igualmente, los animales infectados por ambas vías con 5×10^3 y 5×10^4 tpm, mostraron discreto infiltrado inflamatorio focal de naturaleza linfoplasmocitario en la región subepicárdica con escasos nidos de amastigotos y destrucción de algunas miocélulas a los 35 días pi. Por otro lado, el músculo esquelético mostró miositis focal discreta sin parasitosis tisular, entre los 35 y 60 días pi.

DISCUSIÓN

En el presente trabajo se demuestra que la inoculación de un relativamente bajo número de formas sanguíneas o metacíclicas de *T. cruzi* por las vías ID y C, pueden producir infecciones variables en el modelo rata Wistar evidenciadas por bajas parasitemias patentes, altos títulos de Ac anti *T. cruzi* y severas alteraciones

histopatológicas a nivel del corazón y músculo esquelético, dependiendo del inóculo usado, la vía de inoculación y el origen del parásito.

La inyección de inóculos bajos de tps por la vía ID en diferentes grupos de ratas, desarrollaron infecciones patentes entre 64,2 y 100 % de los animales durante los primeros 35 días pi. Por otra parte, la instilación de los mismos inóculos por la vía C arrojó porcentajes de infección menores, desde 7,1 y 71,4 % a los 20 y 35 días pi, indicando que la cantidad de parásitos inoculados y la vía de inoculación tienen un efecto discreto sobre el nivel de parasitemia durante el curso de la infección. Estos hallazgos difieren de los resultados publicados por Scorza & Scorza (1972) quienes refieren 9,4% (3/32) de infección en ratas inoculadas por vía intraperitoneal con 5×10^4 tripomastigotos sanguíneos de *T. cruzi* "Y".

En los grupos de ratas inoculadas o instiladas con tpm, la detección de la infección fue más tardía (a los 35 días pi) y los niveles de infección fueron menores (7,1 y 50% para los grupos *Ia* y *VIa* y 7,1 y 35,7% en los grupos *Vb* y *VIb*), demostrándose que la vía ID de inoculación pareciera ser más eficaz que la C y las formas sanguíneas más infectivas que las metacíclicas a juzgar por los mayores porcentajes de infección detectados en el modelo utilizado. Nuestros resultados son concordantes con los obtenidos por Delfín (1985), Guillén (1987) y Araque (1987) quienes infectaron ratas Wistar y ratones C57 y C3H con formas metacíclicas de cultivo y observaron que las infecciones aparecen más tardíamente que las producidas por las formas



Figura 4. Lesiones histopatológicas de ratas Wistar infectadas experimentalmente con tripomastigotos sanguícolas de *Trypanosoma cruzi* a los 15 días de infección. a.- Nidos de amastigotos en el miocardio y discreto infiltrado celular de naturaleza mononuclear. b.- Miositis focal moderada (Giemsa-Colofonio, 400X).

sanguícolas. Por otra parte, han sido descritas infecciones experimentales producidas por la vía C con las diferentes formas infectivas de *T. cruzi* en ratones (Marsden, 1969), ratas (Ribeiro *et al*, 1979), conejos (Ramirez & Brener, 1987), perros (Marsden & Hagstrom, 1968; Lana *et al*, 1992) y monos (Bolomo *et al*, 1980), insistiéndose en la dificultad de infectar estos animales por esta vía, cuando se usan formas sanguícolas o metacíclicas provenientes de medios de cultivo.

En nuestro trabajo ninguna de las ratas instiladas con ambas formas infectivas de *T. cruzi*, desarrolló edema palpebral o síndrome oftalmo-ganglionar como el observado en infecciones humanas. Consideramos que la resistencia del modelo utilizado, así como el bajo número de parásitos que produjeron las infecciones en estos animales, no fue suficiente para que se desarrollara un proceso inflamatorio como el detectado en algunos casos agudos humanos (Añez *et al*, 1999a). El tamaño del inóculo necesario para producir infecciones patentes en humanos, sigue siendo desconocido; sin embargo, infecciones experimentales han demostrado que la inoculación de sólo un tripomastigoto metacíclico produjeron infecciones patentes en ratones (Marsden, 1969) y ratas (Moreno, 1996 observaciones no publicadas). Estos hallazgos experimentales hacen suponer que mamíferos susceptibles a *T. cruzi*, pueden infectarse con la inoculación de un número muy reducido de formas metacíclicas del parásito y no desarrollar la infección. En este mismo orden de ideas, Crisante (1996) demuestra la presencia de infecciones inaparentes por *T. cruzi* en casos humanos (26%) y en perros (70%) provenientes de áreas endémicas para la enfermedad de Chagas del occidente de Venezuela, señalando que las personas conviviendo bajo los mismos riesgos de infección que los casos agudos, nunca manifestaron sintomatología atribuible a la enfermedad de Chagas, lo cual podría considerarse como un peligro potencial en las áreas endémicas en las que individuos que albergan infecciones subpatentes o inaparentes pudieran constituirse en reservorios humanos de *T. cruzi*, pudiendo favorecer la transmisión intradomiciliar cuando el insecto vector esté presente en ese ambiente.

Anticuerpos específicos anti *T. cruzi*, han sido detectados en el transcurso de la infección chagásica humana y en animales experimentales mediante el uso de diversas técnicas serológicas (Krettl, 1982). Nuestros resultados confirman la aparición de Ac anti *T. cruzi* en las etapas iniciales de la fase aguda de la infección chagásica, asociada con la presencia de parásitos en el torrente sanguíneo. Los TAc aumentaron en la medida que se incrementó el número de parásitos inoculados, detectándose los máximos valores (1:2048 y 1:4096)

entre los 20 y 60 días pi, persistiendo en forma elevada hasta finales del experimento. Por otra parte, las formas sanguícolas inoculadas por la vía ID, inducen una mayor respuesta humoral que la detectada por la vía C. La respuesta humoral en los animales infectados con las formas metacíclicas fue más tardía y de menor intensidad que la detectada en las ratas infectadas con las formas sanguícolas. Tal apreciación probablemente esté relacionada con la composición antigénica de cada una de las formas infectantes del parásito estudiadas. Delgado (1979) investigando la respuesta humoral en el mismo modelo experimental, encontró un aumento específico de IgG a partir de la segunda semana, cuyo título se incrementó en función del tiempo de infección. Similarmente, Revelli *et al*, (1980) demostraron incremento significativo de las aglutininas a partir de la segunda semana de infección en ratas inoculadas con *T. cruzi*, manteniéndose los niveles hasta los 500 días de observación. Por otro lado, Scorza (1982) encuentra anticuerpos fijadores de complemento en ratas infectadas con *T. cruzi* "Y", entre la segunda y sexagésima semana de infección, demostrando además, hipersensibilidad retardada dérmica desde la segunda semana con incremento logarítmico hasta la sexta semana y estabilización hacia la sexagésima semana después de la inoculación, sugiriendo que la posible combinación de la respuesta humoral y celular conducen al aparente dominio de la infección, no lográndose demostrar parásitos por métodos directos ni por xenodiagnóstico en las ratas examinadas después de 3 semanas, ni reinvasión al miocardio.

El estudio histopatológico de las ratas inoculadas con las formas sanguícolas por vía ID, reveló: a) instauración de una miocarditis aguda de intensidad variable, entre los 10 y 20 días pi, la cual aumenta en la medida que se incrementa el tamaño del inóculo, b) invasión temprana al músculo cardíaco y esquelético por parásitos, entre 10 y 20 días pi, c) establecimiento de un proceso inflamatorio de naturaleza linfoplasmohistiocitario focal o difuso a partir de los 15 días, de extensión e intensidad variables en toda la masa muscular y desaparición en algunos casos después de los 60 y 90 días pi, d) instauración de una miositis focal progresiva a partir de los 10 días en las ratas que recibieron 5×10^3 y 5×10^4 parásitos, escasos nidos de amastigotos entre los 15 y 20 días pi. Estos resultados ratifican las observaciones señaladas por Scorza (1982). Recientemente, Añez *et al*, (1999b) demostraron la persistencia de *T. cruzi* en el miocardio de individuos seropositivos y clínicamente diagnosticados como pacientes chagásicos crónicos, indicando que durante la enfermedad de Chagas aunque los parásitos están en

un bajo número, su potencial para dañar el corazón puede ser comparado con los que están presentes durante la fase aguda.

En relación a los grupos de ratas instiladas por vía C con las formas sanguícolas, la miocarditis aguda fue de más baja intensidad, demostrándose la poca efectividad de esta vía de infección, cuando se utilizan formas sanguícolas del parásito y metacíclicos de cultivo; tales hallazgos coinciden con los resultados publicados por Zeledón *et al.*, (1977) y Marsden, (1969) en ratones infectados experimentalmente.

En las ratas infectadas con las formas metacíclicas, la infección ocurre más tardíamente y las manifestaciones histopatológicas se evidencian en las ratas infectadas por vía ID con los mayores inóculos (5×10^3 y 5×10^4 parásitos), los cuales desarrollaron una miocarditis aguda, con infiltrado inflamatorio focal de naturaleza linfoplasmocitaria a los 35 días pi, que luego se torna linfocitaria, con escasos nidos de parásitos. Igualmente, se observó miositis focal discreta sin parásitos.

De los resultados obtenidos destacamos que, el diseño experimental utilizado en esta investigación permite comparar la capacidad infectiva para provocar miocarditis aguda por *T. cruzi*, de acuerdo con la modalidad de obtención del parásito, forma del parásito, vías de inoculación y tamaño del inóculo.

Finalmente, la forma sanguícola obtenida de ratones donadores, tiene una alta capacidad infectiva por vía ID la cual es independiente del tamaño del inóculo. Por el contrario, la forma metacíclica obtenida por columna de DEAE-celulosa, tiene muy baja capacidad infectiva, la cual se expresa con los máximos inóculos y cuando se utiliza la vía ID. En otras palabras, la forma metacíclica obtenida por columnas de DEAE-celulosa, probablemente, sufre modificaciones negativas en su capacidad infectiva, modificaciones que se atenúan cuando el parásito es inoculado por vía ID.

SUMMARY

Groups of male rats Wistar were inoculated intradermally (ID) with approximately 5×10^2 , 5×10^3 and 5×10^4 blood trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* obtained from mice with high parasitemia and by conjunctival instillation (C) with metacyclic trypomastigotes obtained from axenic cultures after passage through a DEAE-cellulose column. The course of parasitemia, humoral response and histopathology was studied in each animal group from 5 to 90 days post-

inoculation (pi). Patent parasitemias appeared from 10 to 35 days pi, 64.2% to 100% of rats inoculated with blood forms by ID showed infection after 20 days, with average parasitemia of up to 33 ± 5 tps./mm³. The figures for those instilled by C, ranged from 28.5 to 71.4%. 35 days pi, the groups inoculated or instilled with metacyclic forms of *T. cruzi* had levels of infection ranging from 7.1 to 50%, and 7.1 to 35.7% of infected rats. Significant differences ($P < 0.001$) were observed when comparing parasite origin, inoculum size, route of administration and postinfection period. No mortality rates were observed in the experimental animals. Anti-*T. cruzi* antibodies appeared in all infected rats between 10 and 15 days pi, with a significant difference ($P < 0.001$) between the groups of inoculated rats and instilled rats. The highest titers (1:2048 and 1:4096) were observed between 20 and 60 days pi. In some experimental groups, these levels remained high until the end of the experiment period. Moderate to severe myocarditis and myositis were present in all infected rats, characterized by inflammatory infiltrate, occasionally associated with pseudocysts of parasites. These findings observed are dependent upon inoculum size, the parasite form used and the route of inoculation.

Key words: *Trypanosoma cruzi*, Wistar rat, inoculum size, routes of inoculation, chagasic infection.

REFERENCIAS

- Araque L.M. (1987). Estudio histopatológico, inmunológico y electrocardiográfico en ratones experimentalmente infectados con metacíclicos de *Trypanosoma cruzi*. Trabajo Esp. de Grado, Dpto. de Biología, Facultad de Ciencias, ULA. 58 pp.
- Añez N., Carrasco H., Parada H., Crisanti G., Rojas A., González N., Ramírez J.L., Guevara P., Rivero C., Borges R., & Scorza J.V. (1999a). Acute Chagas' disease in western Venezuela: A clinical, seroparasitologic, and epidemiologic study. *Am.J.Trop. Med.Hyg.*, **60**: 215 - 222.
- Añez N., Carrasco H., Parada H., Crisanti G., Rojas A., González N., Ramírez J.L., Guevara P., Rivero C., Borges R., & Scorza J.V. (1999b). Miocardial parasite persistence in chronic chagasic patients. *Am J. Trop. Med. Hyg.*, **60**: 726 - 732
- Bolomo N., Milei J., Cossio P. M., Segura E. L., Laguens R. P., Fernandez L. M., Laranja M. (1980). Experimental Chagas' disease in a South America primate (*Cebus sp.*). *Medicina (B. Aires)*, **40**: 667.
- Bray R. & Garnham, P.C.C. (1962). The Giemsa-colophonium method for staining protozoa in tissue section. *Indian J. Malariol.*, **16**: 152 - 155.
- Brener Z. (1962). Observações sobre a imunidade a superinfecciones em camundongos experimentalmente inoculados con *Trypanosoma cruzi* e submetidos a tratamento. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, **4**: 119 - 123.

- Chagas C. (1909). Nova trypanosomiase humana: estudo sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiologico de nova entidade morbida no homen. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, **1**: 159 - 218.
- Crisante G.E. (1996). Detección de infecciones inaparentes y persistencia parasitaria en la enfermedad de Chagas en áreas endémicas del occidente de Venezuela. Trabajo Esp. de Grado, Dpto. de Biología, Facultad de Ciencias, ULA, 66 pp.
- Delgado V. (1979). Estudio de la respuesta humoral en infecciones experimentales por *Trypanosoma cruzi* en ratas "Wistar". Trabajo Esp. de Grado, Depto. de Biología, Facultad de Ciencias, ULA. 61 pp.
- Delfin W. (1985). Aislamiento de metacíclicos puros de *Trypanosoma cruzi* y su infectividad en ratones albinos. Trabajo Esp. de Grado, Depto. de Biología, Facultad de Ciencias, ULA. 49 pp.
- Guillén C.B. (1987). Estudio histopatológico, histotrópico y electrocardiográfico en ratas "Wistar" inoculadas con metacíclicos de *Trypanosoma cruzi*. Trabajo de Ascenso, Facultad de Medicina, ULA. 65 pp.
- Krettlí A.U.(1982). Antibodies to *Trypanosoma cruzi*. In experimental and human infection. Afr. Exp. Immunol., **3**: 327 - 345.
- Lana M., Chiari E. & Tafuri W.L.(1992). Experimental Chagas' disease in dogs. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, **87**: 59 - 71.
- Marsden P.D. & Hagstrom J.W.C.(1968). Experimental *Trypanosoma cruzi* infection in beagle puppies. The effect of variations in the dose and source of infecting trypanosomes and the route of inoculation on the course of the infection. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., **62**: 816- 824.
- Marsden P. D. (1969). *Trypanosoma cruzi* infections in CFI mice. III. The capability of flagellates obtained from two sources (bug faeces and mouse blood) to induce patent infection on perconjuntival instillation. Ann. Trop. Med. Parasitol., **63**: 309-311.
- Moreno E. A., Añez N., Gottberg C., Scorza C., Lugo A. & Dávila D. (1996). Modificaciones electrocardiográficas en ratas infectadas con formas sanguíneas y metacíclicos de *Trypanosoma cruzi*. Bol. Dir. Malarial. San. Amb., **36**:70 - 77.
- Moreno E. A, González N., Guillén C.B., Rivera I., Alarcón M., Lugo A. & Añez N. (1997). Biological and isoenzyme characteristics of venezuelan strains of *Trypanosoma cruzi*. Am. J. Trop. Med. Hyg., **57**(Supplem.): 155.
- Ramírez L.E. & Brener Z. (1987). Evaluation of the rabbit as a model for Chagas' disease. I. Parasitological studies. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, **82**: 531-536.
- Revelli S.S., Amerio N., Moreno H.S., Valenti J.L., Balberry H. & Morin J. (1980). Enfermedad de Chagas crónica en la rata. Características serológicas, electrocardiográficas e histopatológicas. Medicina (B. Aires), **40**: 69 - 76.
- Ribeiro R.D., Belda Neto F.M. & Pereira M.B. (1979). Estudos sobre reservatórios vetores silvestres do *Trypanosoma cruzi*. LXXI. Estudo comparativo da eficiencia da porta de entrada de tripomastigotas metacíclicos na infecção experimental pelo *Trypanosoma cruzi*. Rev. Bras. Biol., **39**: 1-3.
- SAS System (1995). General Linear Models Procedure. Ed. Raleigh, North Carolina, SAS Institute.
- Scorza C. (1982). La rata *Wistar* como modelo experimental para el estudio de la miocarditis chagásica: aspectos histopatológicos, histoquímicos, inmunológicos y electrocardiográficos en diferentes etapas de la infección. Trabajo de Ascenso, Facultad de Ciencias, ULA. 101 pp.
- Scorza C. & Scorza J.V. (1972). Acute myocarditis in rats inoculated with *Trypanosoma cruzi*: study of animals sacrificed between the fourth and twenty ninth day after infection. Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo, **14**: 171 - 177.
- Silva L.H. & Nussenzweig V. (1953). Sobre una cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. Fol. Clin. Biol., **20**: 191 - 207.
- Souza de M.A. (1983). A simple method to purify biologically and antigenically preserved blood stream trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* using DEAE-cellulose column. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, **78**: 317-333.
- Storni P.D., Bolsi F.L. & Yanovsky J.V. (1975). Reacción de aglutinación directa para diagnóstico de la enfermedad de Chagas. Utilización sistemática del 2- Mercapto-etanol para la eliminación de las aglutininas inespecíficas. Medicina (B. Aires), **35**: 67.
- WHO. (1984). Report of the Scientific working group on the development and evaluation of animal models for Chagas' disease. TDR/84.3., p. 1-10.
- WHO. (1991). Control of Chagas Disease. Tecnical Report Serie - 811.
- Zeledón R., Trejos M. & Chinchilla M. (1977). Experimental infection of mice with blood, culture and insect forms of *Trypanosoma cruzi* by different routes. Protozool., **3**: 95-101.