



**UNIVERSIDAD CENTRAL DE
VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGÍA**

**ALTERACIONES ULTRAESTRUCTURALES DE PULMÓN EN
RATONES INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE CON DOS
AISLADOS VENEZOLANOS DE *T. evansi*.**

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

Presentado ante la Ilustre Universidad Central de
Venezuela, por la bachiller Fredximar Marrero
como requisito parcial para optar al título de
Licenciado en Biología

Tutor: Roschman González

CARACAS, VENEZUELA
MAYO - 2011

Dedicado a mis tres ángeles:
A mis Padres ... Por su esfuerzo y sacrificio, por enseñarme a crecer,
por hacerme inmensamente feliz cada día de mi vida y por
esperar con paciencia y entusiasmo cada uno de mis logros.
A mi Tia... Por ser mi segunda madre, por apoyarme,
aconsejarme y quererme sin esperar nada a cambio.
Xiomara, Freddy y Zulay... Mis logros son suyos.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo es producto de un esfuerzo en el cual participan varias personas, directa o indirectamente, opinando, leyendo, corrigiendo, apoyándome y acompañándome en momentos de felicidad y de crisis. Personas que por un motivo u otro me trajeron hasta este punto, la culminación de una meta y comienzo de nuevas etapas. Por tal motivo deseo agradecer:

- A mi tutor, amigo y compañero, el Dr. Roschman González, quien me apoyo académica y emocionalmente, seco mis lágrimas en instantes de crisis, confió en mi y compartió conmigo tantos momentos de alegría y tensión. Por ser siempre mas que mi tutor, mi amigo.... Gracias.
- Al Dr. Héctor Finol, por su apoyo, sus correcciones y su paciencia. Gracias por compartir con gran entusiasmo sus conocimientos.
- Al Dr. Félix Tejero, por abrirme las puertas de la protozoología parasitaria y mostrarme un camino que hoy me permite alcanzar esta meta.
- A mis compañeros de Laboratorio, Roberto y Alicia, por su apoyo, su cariño, su comprensión y paciencia. Gracias por ser mis amigos y brindarme tanta alegría, aun en los momentos de crisis.
- A mis tías: Mirian y Pilar, por quererme tanto y brindarme a lo largo de mi vida y de mi carrera su apoyo incondicional, su cariño y recibirme en su hogar y en su vida como una sobrina. Gracias por hacerme sentir en casa todos los días.
- A mi familia: mi hermano, mis tíos, mis primos y mis abuelas, quienes me animaron siempre a seguir adelante y esperaron con suma paciencia por este logro.
- A mis amigos (as) de la carrera: Inés, Karla, María de los Ángeles, Eliana, Dileyvic, Alberto. Gracias por los momentos de estudio y los de ocio, por apoyarme académica y emocionalmente siempre.

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN.....	06
El Parásito.....	06
El Pulmón.....	14
ANTECEDENTES.....	18
HIPÓTESIS.....	19
OBJETIVOS.....	19
Objetivo General.....	19
Objetivos Específicos.....	19
MATERIALES Y MÉTODOS.....	20
Material biológico.....	20
Diseño experimental.....	20
Métodos.....	20
RESULTADOS.....	27
Descripción Parasitológica.....	28
Descripción Histopatológica.....	32
Descripción Ultraestructural.....	34
Descripción Cuantitativa.....	58
DISCUSIÓN.....	66
CONCLUSIONES.....	76
BIBLIOGRAFÍA.....	78

EL PARÁSITO

La tripanosomosis causada por *Trypanosoma evansi* tiene distribución mundial, habiéndose descrito en cuatro Regiones Biogeográficas: Etiópica, Oriental, Neotropical y Paleártica (Rangel, 1905; Kubes, 1939; Holland, 2003) (Figura 1).

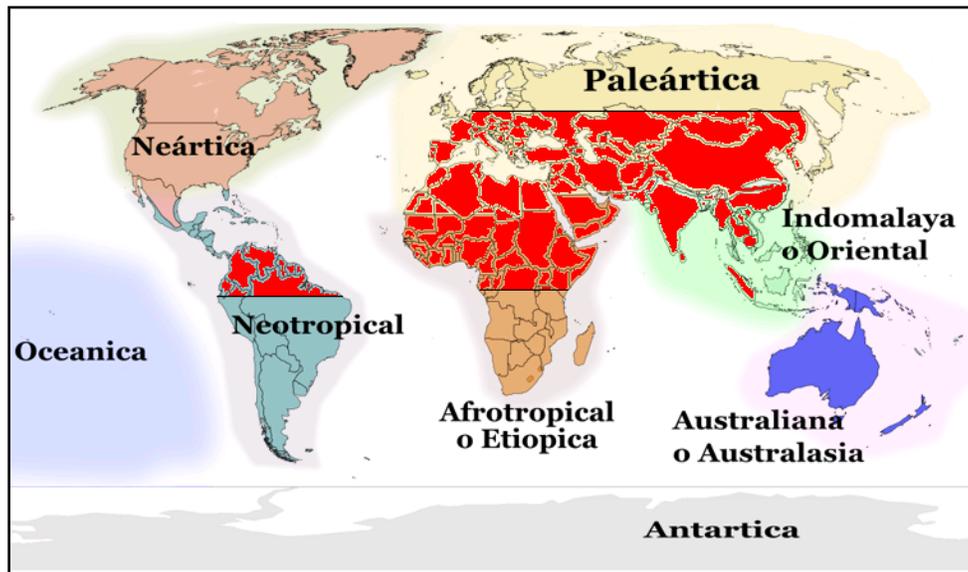


Figura 1. Regiones Biogeográficas (modificado de <http://www.testudines.org/Articulos/Apendices-y-Glosarios/Ecologia-Botanica-Edafologia/Ecozonas.aspx>)

Es el tripanosoma más diseminado a escala mundial (Ramírez y col., 1997), describiéndose en países del norte de África, Oriente Medio, Asia y algunos países europeos, así como en Centro y Sur América (Luckins, 1988; Gutierrez y col., 1998). Recientemente, se han reportado casos en camélidos y ovinos de granjas Francesas (Desquesnes y col., 2008). En Sudamérica, se reparte en grandes áreas dedicadas a la ganadería extensiva. En nuestro país, la tripanosomosis equina por *T. evansi* presenta una alta incidencia en los Llanos.

Si bien este tripanosoma se ha descrito en gran variedad de mamíferos (Tejero y col., 2008), los camélidos y los equinos son los hospedadores por excelencia y su infección constituye una fuente importante de pérdidas económicas, pues produce el deterioro físico y hasta la muerte de los caballos utilizados para el manejo del ganado (Losos, 1980; Mahmoud y Gray, 1980; González y col., 2006). Así mismo, se ha reportado un gran impacto en la ganadería en países Asiáticos como Tailandia y Finlandia (Dobson y col., 2009; Jittapalapong y col., 2009).

La primera descripción del *Trypanosoma evansi* fue realizada por Griffith Evans en 1880, en la región de Punjab, India. Sin embargo, fue Balbiani quien, en el año 1888 lo ubicó en el género *Trypanosoma* (Hoare, 1972).

Cabe preguntarse entonces, con cierto interés científico, cómo llegó este tripanosoma a tierras americanas, distribuyéndose ampliamente entre la población equina Suramericana. En este sentido, se acepta que el *T. evansi* fue introducido como “polizón” en los equinos que trajeron los conquistadores españoles en el siglo XVI (Luckins, 1988; Roberts y Janovy, 2000).

Durante muchos años, se asumió la existencia de tripanosomas muy similares entre sí pero descritos como especies diferentes, hasta que a mediados del siglo XX, Hoare demostró que estos protozoarios no presentaban diferencias morfológicas que sustentaran dicha separación y que las disimilitudes descritas correspondían, simplemente, a “razas geográficas” (Hoare, 1972). Este axioma fue comprobado posteriormente por, Gibson y col., (1978), Losos (1980), Mahmoud y Gray (1980).

En este sentido, Tejero y col. (2008), determinaron que este parásito no solo presenta diferencias en cuanto a las razas geográficas, sino que además la relación parásito-hospedador es tan estrecha, que varía en patogenicidad dependiendo del mamífero. Así, los aislados de diferentes animales varían entre sí, constituyéndose en diferentes cepas y mostrando diversos comportamientos parasitológicos en modelos murinos.

Según Corliss (1994), la ubicación taxonómica del *T. evansi* es la siguiente:

Imperio Eukarya,
Reino Protozoa,
Phylum Euglenozoa,
Clase Kinetoplastida,
Orden Trypanosomatida,
Familia Trypanosomatidae.
Genero *Trypanosoma*
Especie *T. evansi*

Hoare (1972) creó una división, que si bien carece de valor taxonómico, es de gran valor práctico, por cuanto organiza a los tripanosomas según el modo en el que alcanzan el torrente circulatorio del hospedador mamífero. Así, los tripanosomas de la Sección Stercoraria infectan a sus hospedadores mamíferos por contaminación con heces del hospedador invertebrado. Por su parte, los tripanosomas de la Sección Salivaria infectan a sus hospedadores mamíferos por inoculación del contenido de las glándulas salivales del hospedador invertebrado. *T. evansi* pertenece a la sección Salivaria.

Trypanosoma evansi es transmitido mecánicamente de un hospedador mamífero a otro mamífero por la picadura de dípteros hematófagos. Los principales vectores en la Región Neotropical, son representantes de las familias Tabanidae (*Tabanus* spp.; sólo las hembras son hematófagas) y Muscidae (*Stomoxys calcitrans* y *Haematobia irritans*; tanto machos como hembras son hematófagos) (Brun y col., 1998). En el Viejo Mundo, la mosca tse-tse

(*Glossina* spp.) es el agente trasmisor primordial (Brun y col., 1998). Adicionalmente, Camargo y col.(2004) especulan acerca de la capacidad de las garrapatas para vehicular al *T. evansi*.

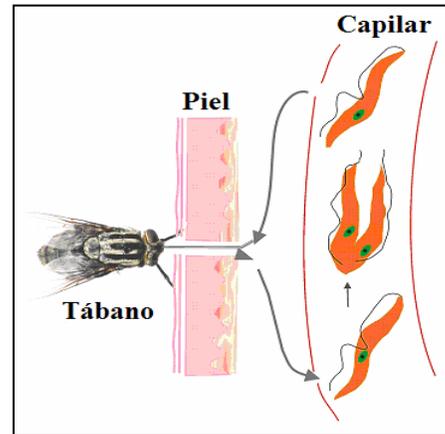
Los quirópteros hematófagos, particularmente *Desmodus rotundus*, también han sido incriminados en la transmisión de la tripanosomosis. En efecto, Gutiérrez (1958), describe su capacidad transmisora en caballos y Hoare (1964, 1972), lo implica en propagaciones eficientes a equinos y/o bovinos de Centro y Suramérica.

La ubicación del parásito en el hospedador invertebrado se restringe a la hipofaringe y las labelas, donde no experimenta ningún tipo de transformación; el vector actúa como un simple inoculador mecánico.

Trypanosoma evansi infecta una amplia variedad de mamíferos, variando el hospedador en cada región geográfica. En África, los camélidos son los hospedadores por excelencia (Dia y col., 1997) mientras en Suramérica, la enfermedad afecta principalmente a la población equina. Por su parte en Asia, incluye camélidos, búfalos y cerdos (Holland, 2003). Asimismo, en el año 2005, Joshi y col. reportaron un caso de tripanosomiasis causada por *T. evansi* en un humano en Nagpur, India.

En el hospedador vertebrado, la multiplicación del *T. evansi* acontece en el torrente circulatorio por fisión binaria longitudinal simple de tripomastigotes, único estadio descrito (Figura 2).

Figura 2. Esquema del ciclo de vida de *Trypanosoma evansi* (Modificado de Gardiner y col., 1988).



T. evansi es una especie monomórfica oblonga y deprimida con dimensiones que van de 15 μm a 36 μm de largo \times 1,5 μm a 2 μm de ancho (Hoare, 1956, 1972). Por su parte, Tejero y col. (2008) establecen que el rango de variación dimensional de los especímenes venezolanos varía entre 10-24,7 μm de largo y 1,2-3,9 μm de ancho.

Entre las características ultraestructurales resaltantes del *T. evansi* está el flagelo, provisto de barra paraxial, una sola mitocondria que se extiende a todo lo largo del cuerpo que alberga un conspicuo paquete de ADN denominado cinetoplasto, un aparato de Golgi, acidocalcisomas, así como glicosomas y vacuolas de diferentes dimensiones (Figura 3).

Se observa, asimismo, una membrana plasmática de composición similar al resto de los tipos celulares eucarióticos, a cuyos lípidos se unen polisacáridos de cadena corta, constituyendo una capa de material externo amorfo, denominada glicocalix endógeno. Dicho glicocalix, dependiendo del medio externo, de la condición fisiológica y del estadio de vida del parásito, puede presentar modificaciones en su composición. Inmediatamente por debajo de la membrana celular, existe una red de microtúbulos subpediculares formada por unidades de 20 nm de diámetro que se extiende de un extremo a otro de la célula que adicionalmente están asociados estrechamente a la

membrana constituyendo parte del citoesqueleto de estos hemoflagelados (Vickerman, 1977).

El núcleo presenta la estructura general de los eucariotas, con una envoltura nuclear compuesta por dos membranas yuxtapuestas que encierra un nucléolo central, prominente y muy denso, en tanto que la cromatina se distribuye a modo de masas periféricas, difuminándose al momento de la replicación (Vickerman, 1977).

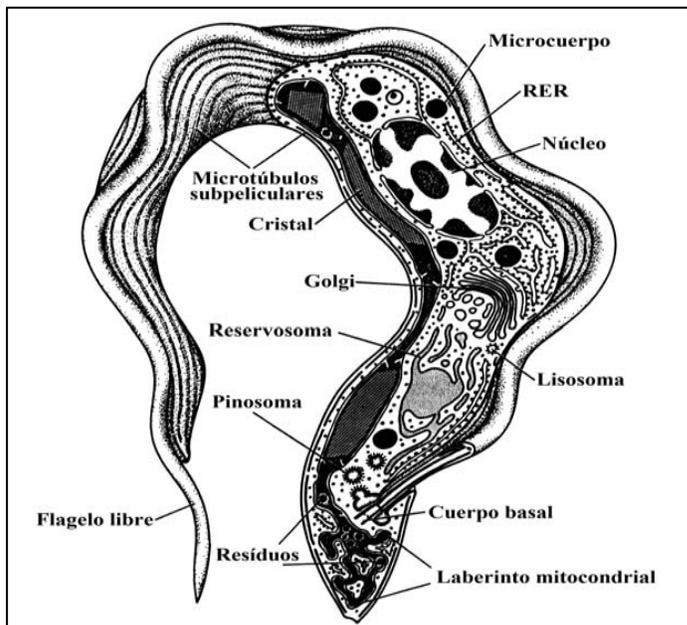


Figura 3. Representación esquemática de la ultraestructura de un tripomastigote de *Trypanosoma evansi* (Modificado de Vickerman, 1977).

Hoare (1972), indica que *T. evansi* fue el primer tripanosoma asociado a eventos patogénicos que varía en función del aislado, la zona geográfica y la especie de vertebrado involucrado. No obstante, se aprecian semejanzas macroscópicas en cuanto a lesiones anatomopatológicas se refiere. Adicionalmente, se observa anemia, exudados serofibrinosos en las cavidades serosas, caquexia, atrofia de la musculatura esquelética y adenopatías tumefactas, mucosas pálidas, tejidos ictéricos, edemas generalizados, esplenomegalia, hígado hipertrófico con congestión pasiva y focos de degeneración turbia y

adiposa, riñones tumefactos, congestionados y con hemorragias intersticiales (Damayanti y col., 1994; Audu y col., 1999; Biswas y col., 2001; Herrera y col., 2002), indicando que es posible establecer relaciones entre lesiones macroscópicas y alteraciones microscópicas, aun cuando no es descabellado suponer que tal correlación también sería extrapolable a cambios submicroscópicos.

De esta manera, la patología de la enfermedad producida por *T. evansi* y sus implicaciones en el desarrollo de las actividades pecuarias en Venezuela y en extensas regiones subtropicales de Sudamérica, África y Asia, sugieren por sí mismas la relevancia de ahondar en la descripción macroscópica, microscópica y ultraestructural ya señaladas. Aun mayor es la importancia de desarrollar estudios utilizando aislados venezolanos, asumiendo las potencialidades de Venezuela como país ganadero. En este sentido, en los últimos años se han reportado alteraciones submicroscópicas importantes que conllevan a fallas en la función hepática y renal en modelos murinos. Así, Rossi y col. (2008), describen cambios como: acumulación de gotas lipídicas, distribución irregular de partículas de glucógeno (Fig. 4), retículo endoplasmático hinchado, mitocondrias pleomórficas y desaparición del retículo endoplasmático rugoso. Adicionalmente se evidencia la presencia de tripomastigotes en el tejido y a nivel intracelular.

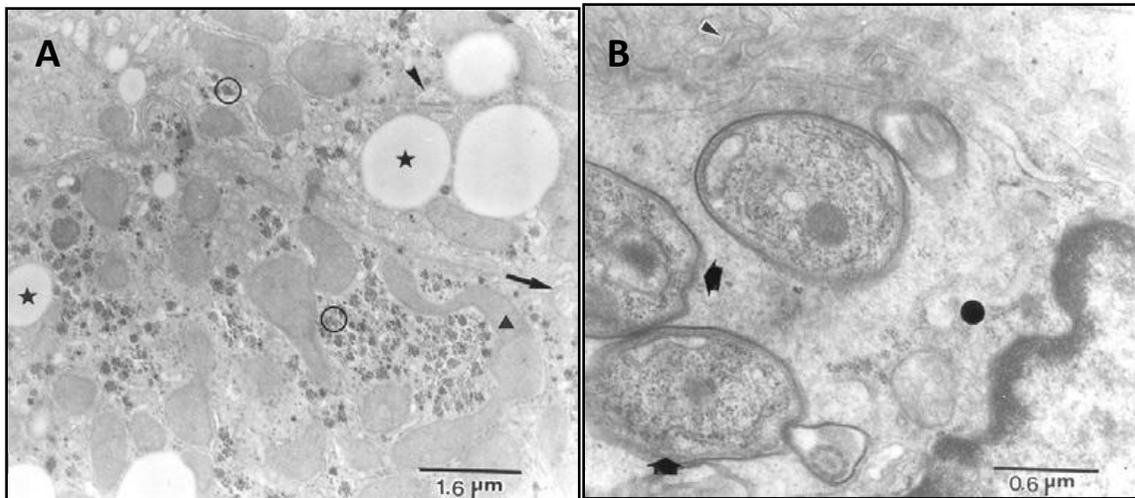


Figura 4. A: Micrografía electrónica mostrando cúmulos de gotas lipídicas (estrellas) y distribución irregular de partículas de glicógeno (círculo) en el citoplasma de hepatocitos, peroxisomas (cabeza de flecha) mitocondrias(triángulo), canalículo biliar (flecha). B: Formas tripomastigotes del *T. evansi* (flecha) en el citoplasma de un hepatocito alterado (círculo), Espacio de Disse (cabeza de flecha). (Tomado de Rossi y col., 2008)

Asimismo, Tejero y col. (2009) reportan algunos hallazgos similares en tejido renal, tras la infección experimental de ratones, describiendo alteraciones como mitocondrias pleomórficas, acumulación de gotas lipídicas y presencia de tripomastigotes, esta vez en la microvasculatura (Figura 5).

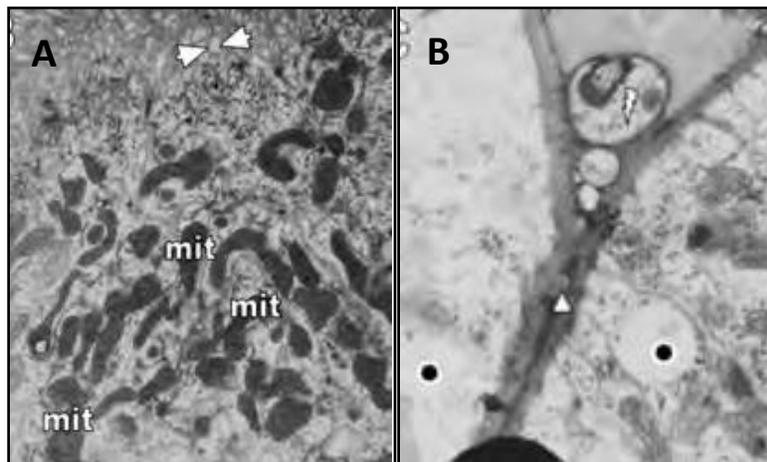


Figura 5. A: Se observan microvellosidades apicales (doble cabeza de flecha) y mitocondrias polimórficas (mit)(15000X). B: se revela la presencia de un tripomastigote intravascular (rayo),la membrana basal (triángulo) y gotas lipídicas (círculos negros)(35000X). (Tomado de Tejero y col., 2009).

Por otro lado, se han realizado estudios histopatológicos con *T. cruzi*, que revelan cambios en el parénquima pulmonar de ratones infectados (Melnikov y col.,2005), lo cual sugiere la posible existencia de este tipo de alteraciones también en infecciones con *T. evansi*, particularmente con aislados venezolanos. En este sentido, Marrero y col. (2009) reportaron descripciones ultraestructurales y morfométricas puntuales del tejido en un modelo murino inoculado con *T. evansi* a una alta parasitemia, encontrándose mitocondrias edematizadas y alteraciones nucleares. Estas investigaciones podrían considerarse como precursoras en el estudio de las variaciones a nivel submicroscópicos a lo largo de infecciones experimentales. Además, Biswas y col. (2001) y Herrera y col. (2002), quienes trabajaron en la India y Brasil, respectivamente, describieron lesiones macroscópicas e histopatológicas severas, incluyendo la ruptura de los alvéolos pulmonares, que sugieren efectivamente la existencia de cambios ultraestructurales en pulmón.

EL PULMÓN

El pulmón es el órgano responsable de la respiración en el hombre y en los vertebrados que viven o pueden vivir fuera del agua. Es una estructura esponjosa, blanda, flexible, que se comprime y dilata, y ocupa una parte de la cavidad torácica (Figura 6).

El pulmón de los mamíferos está constituido por millones de sacos alveolares interconectados y cerrados por un extremo que se denominan alvéolos que, junto con los bronquiolos terminales, los bronquiolos respiratorios, los conductos alveolares y los sacos alveolares, constituyen la porción respiratoria del pulmón. Los gases se transfieren a través de las finas paredes de los alvéolos que se encuentran en las regiones distales respecto a los bronquiolos terminales, denominadas ácinos. Las vías aéreas que conducen hasta los

bronquiolos terminales constituyen la parte no respiratoria del pulmón(Figura 7) (Randall y col., 1998).

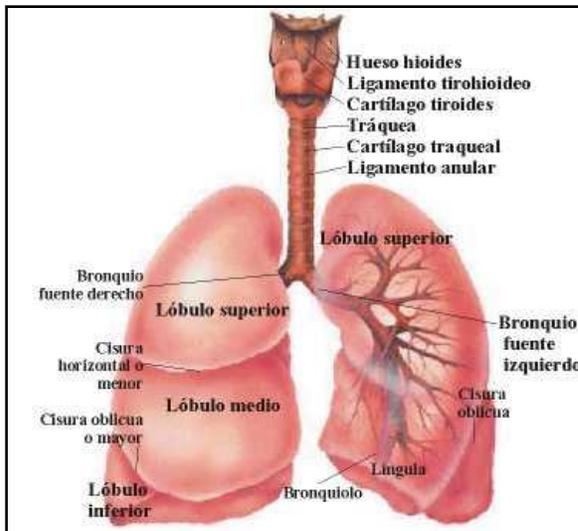
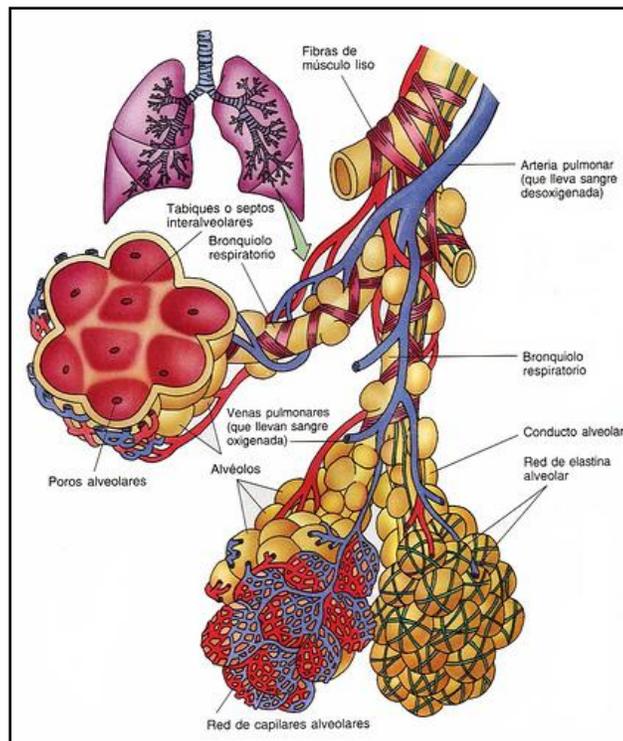


Figura 6. Esquema pulmonar externo
<http://cuerpohumanocuerpo.blogspot.com/2009/03/dibujo-de-los-pulmones.html> [Consultada el 09 de febrero de 2011]

Figura 7. Esquema pulmonar interno.
 (<http://www.flickr.com/photos/11052268@N03/1033197410/>) [Consultada el 02 de noviembre de 2010]



Los conductos aéreos que llevan a la porción respiratoria del pulmón contienen cartílago, un poco de músculo liso y epitelio ciliado. El epitelio secreta mucus, que se mueve en

dirección a la boca por acción de los cilios. Este mucus mantiene los pulmones limpios. En las porciones respiratorias del pulmón el cartílago es reemplazado por músculo liso (Hib y Di Fiore, 2001).

El epitelio pulmonar está formado por dos tipos celulares.

- 1- Células alveolares o neumocitos I (ocupan el 95% de la pared de los alveolos), son planas con grandes núcleos aplanados y están unidas gracias a uniones estrechas. Contiene escasas mitocondrias y organelos; su citoplasma ofrece una delgada cobertura a la membrana basal alveolar y su delgadez contribuye a la eficiencia de la barrera aire-sangre (Stevens y Lowe, 2006)
- 2- Células septales o neumocitos II, también llamadas células alveolares grandes (Figura 8). Se encuentran dispersas entre las células alveolares I, aisladas o en grupos pequeños. El nombre de células septales se debe a que abundan en las zonas donde se unen entre sí los tabiques interalveolares (Leeson y col., 1987).

La superficie libre de las células tipo II es convexa, se halla cubierta de microvellosidades y sobresale en la luz del alvéolo. Poseen un núcleo relativamente grande que ocupa la región central de la célula. En la región apical contienen gránulos de secreción que miden entre 0,2 y 1 μm de diámetro, que reciben el nombre de cuerpos multilamelares porque presentan una serie de laminillas o membranas superpuestas. Los cuerpos multilamelares descargan su contenido hacia la cavidad alveolar. El producto secretado, que fundamentalmente es el dipalmitoilfosfatidilcolina, se conoce como surfactante o agente tensioactivo pulmonar y está encargado de formar una película sobre el epitelio alveolar que disminuye la tensión superficial entre el aire y el epitelio en sí, facilitando así el intercambio gaseoso; además, evita que los alveolos se colapsen durante la espiración (Randall y col, 1998).

Por otro lado, los macrófagos de los alveolos pulmonares, también llamados células pulverulentas, como todos los macrófagos, derivan de monocitos circulantes que escapan de los capilares interalveolares y pasan al tejido conectivo de los tabiques, donde se diferencian en macrófagos. Algunos permanecen en el interior de los tabiques y otros aparecen en la cavidad alveolar, ya que se filtran entre las células alveolares (Figura 9). Los macrófagos fagocitan las partículas que ingresan en los pulmones con el aire inhalado (Hib y Di Fiore, 2001)

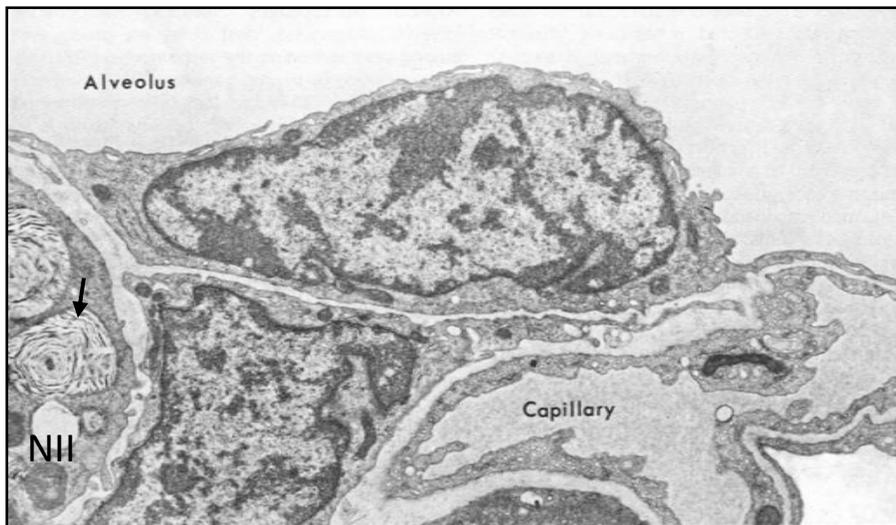


Figura 8. Epitelio escamoso alveolar. Se destacan neumocitos tipo II (NII) con estructuras en forma mielínica características (flecha), el espacio alveolar (alveolus) y un capilar (capillary). (Modificado de Greep y Weiss, 1973)

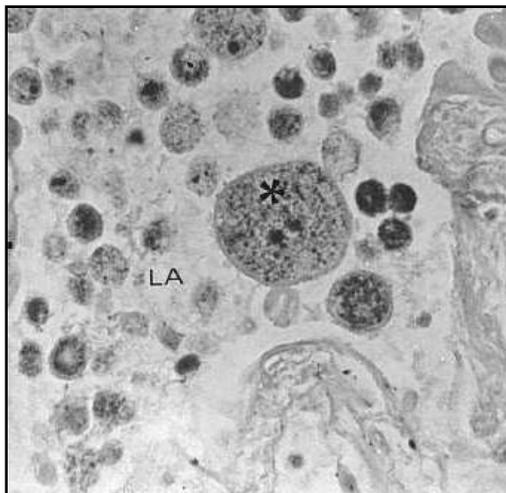


Figura 9. Micrografía donde se observan macrófagos alveolares (asterisco) en la luz alveolar (LA). (Tomado de Garrido y col., 2003)

Son diversas las referencias alusivas a pulmón y sus cambios en infecciones naturales y experimentales con protozoarios. Sin embargo, la bibliografía relativa al *T. evansi* es escasa y aquella referida, específicamente a muestras venezolanas del parásito, según nuestro conocimiento, solo ha sido investigado por Marrero y col. (2009) en un modelo murino con alta carga parasitaria, reportando edematización mitocondrial y alteraciones nucleares.

En Indonesia, Damayanti y col. (1999), llevó a cabo infecciones experimentales en búfalos, reportando alteraciones pulmonares como engrosamiento focal de las paredes alveolares, edema intersticial y congestión capilar. Posteriormente, a partir de investigaciones realizadas en la India, Biswas y col. (2001) describen alteraciones macroscópicas e histopatológicas progresivas en pulmones de ratas infectadas experimentalmente con *T. evansi*, que van desde congestión en los bronquiolos y desarrollo inflamatorio intrabronquial en los primeros días de infección, hasta necrosis en las paredes alveolares, neumonía lobular y enfisema. Por su parte, en el año 2002, Herrera y col. observan congestión y hemorragia pulmonar al infectar coatíes (*Nasua nasua*) con *T. evansi*, así como áreas focales de enfisema.

Así mismo, Dargantes y col. (2005), hallaron colapso alveolar, infiltración linfocitaria y tripomastigotes evidentes en el tejido pulmonar de cabras infectadas experimentalmente. En el mismo año, Melnikov y col. (2005), realizan experimentos en México con un protozoario filogenéticamente cercano a *T. evansi*, infectando modelos murinos con *T. cruzi*, hallando resultados similares que comprenden engrosamiento de la pared alveolar e infiltrado inflamatorio.

HIPÓTESIS

La infección experimental en ratones con los aislados venezolanos de *T. evansi*, induce alteraciones en las células alveolares y microvasculatura pulmonar que varían en función del tiempo de infección.

OBJETIVO GENERAL

Estudiar los cambios ultraestructurales del pulmón de ratones infectados experimentalmente con dos aislados venezolanos de *T. evansi*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

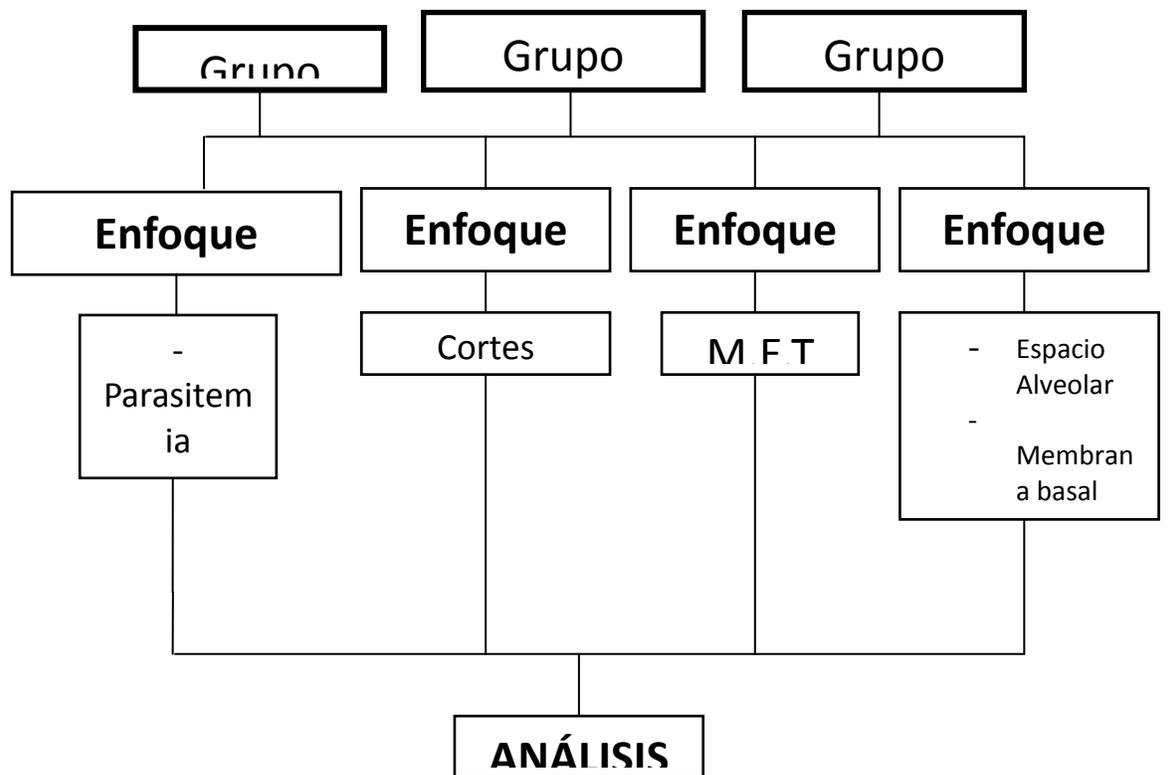
1. Correlacionar el comportamiento parasitológico en el transcurso de las infecciones experimentales en modelos murinos con posibles alteraciones ultraestructurales.
2. Verificar la presencia del *T. evansi* en el pulmón de ratones infectados experimentalmente en el transcurso de la infección experimental.
3. Describir posibles cambios histopatológicos en el tejido pulmonar de ratones infectados con *T. evansi*.
4. Describir posibles cambios ultraestructurales en las células alveolares I y II en el transcurso de la infección experimental.
5. Describir posibles cambios ultraestructurales en la microvasculatura en el transcurso de la infección experimental.
6. Describir posible presencia de infiltrado celular en el tejido.
7. Comparar el comportamiento parasitológico y las alteraciones histopatológicas y ultraestructurales en tejido pulmonar de ratones infectados con dos aislados venezolanos de *T. evansi*.

MATERIAL BIOLÓGICO

Muestras de *T. evansi* provenientes de un caballo (*E. caballus*) y de un asno (*E. asinus*) con sintomatología de derrengadera infectados en forma natural en los estados Guárico y Apure, respectivamente.

Lotes de *Mus musculus* hembras de 20 gr de peso corporal de la cepa NMRI (Bioterio IVIC).

DISEÑO EXPERIMENTAL



Una muestra criopreservada en N₂ líquido se normalizó y expandió por inoculación intraperitoneal en ratones NMRI. Tras alcanzar niveles de parasitemia del orden de 10⁷, los animales fueron sacrificados por dislocación cervical y por punción cardíaca se extrajo

lasangre, la cual se mezcló con EDTA. Las muestras se diluyeron en una solución en buffer fosfato (PBS) enriquecido con 1% de glucosa (PBSG) hasta alcanzar el inoculo deseado.

Grupos de 15 ratones fueron inoculados intradérmicamente con 1 tripomastigote/gramo de peso corporal. Interdiariamente se seleccionó aleatoriamente un ratón por grupo.

Cabe destacar que las infecciones con los aislados *E. caballus* y *E. asinus* de *T. evansi* utilizados en este estudio, han sido reportadas por Perrone (2003), con un tiempo de sobrevivencia de 16 y 38 días aproximadamente, a partir de los cuales los individuos comienzan a morir, por lo cual una muestra de 15 ratones por grupo aseguró la extracción interdiaria del órgano a lo largo de la infección.

A partir de sangre de la vena caudal se determinó la parasitemia según una adaptación del método de Brener (1962). Se colocaron 5 µl de sangre en un porta-objetos, sobre la muestra de sangre se dispuso una laminilla cubre-objetos (22 mm x 22 mm). La muestra se llevó al microscopio y se observaron 100 campos a 400X.

La fórmula que permitió la evaluación de la parasitemia es la siguiente:

$$\frac{\text{Flagelados}}{\text{ml}} = Oc \times Fm \times Fd$$

donde Oc, representa el número de organismos contados, Fm, es el factor del microscopio y Fd, es el factor de dilución.

Seguidamente se procedió a registrar el peso de cada ratón y realizar el análisis de hematocrito, según el protocolo de Woo, (1969).

Un ratón seleccionado al azar, al cual se le realizó previamente el análisis parasitológico (para cada grupo experimental) fue sacrificado por dislocación cervical y mediante ablación

quirúrgica, se le extrajo los pulmones. Las muestras fueron procesadas y observadas en un microscopio electrónico de transmisión, marca JEOL, modelo JEM-1011.

Con base en su complejidad metodológica se describen las etapas de la técnica rutinaria de corte fino para microscopía electrónica de transmisión.

FIJACIÓN.

El primer paso de la técnica consiste en preservar la ultraestructura biológica de la muestra y proteger de modificaciones eventuales que pudieran aparecer durante el devenir de la técnica.

El primer fijador a usar consiste en la solución de Karnovsky, una mezcla de 2,5% de glutaraldehído más 37% de formaldehído diluidos en buffer fosfato de Millonig (1961) a pH 7,4 y 320 mOsm, osmolaridad mayor que la del plasma de los mamíferos por cuanto en el rango utilizado no se aprecia daño tisular, evitándose además, la dilución excesiva de la solución fijadora que alcanza las regiones centrales de la muestra. En la osmolaridad total no se incluye la contribución del glutaraldehído, ya que según Arborgh y col. (1976), no constituye un factor importante en la presión osmótica efectiva. El glutaraldehído establece puentes de entrecruzamiento con las proteínas, enlazando sus grupos amino. Específicamente, el grupo aldehído reacciona con el grupo amino de la lisina ubicada en proteínas adyacentes, originando así, los puentes de entrecruzamiento (Bozzola y Russell, 1992). El órgano extraído se deposita en un tubo Eppendorf provisto con 0,5 ml de solución de Karnovsky a 4° C. Transcurridos 5 minutos la muestra es seccionada y los fragmentos continúan el proceso de fijación hasta completarse 45 minutos. Al cabo de ese tiempo, las porciones de pulmón se lavan en buffer fosfato por 5 minutos y se postfijan en tetróxido de osmio (OsO_4) al 1% en el mismo buffer, bajo las mismas condiciones de osmolaridad y pH.

La post-fijación (OsO₄) se prolonga por 1 hora y se prosigue con un lavado en agua destilada durante 15 minutos. El OsO₄ reacciona principalmente con las moléculas lipídicas. Se ha propuesto que las insaturaciones de los ácidos grasos son oxidadas por el OsO₄, el cual a su vez, es reducido a Osmio metálico formando un precipitado opaco que añade densidad y contraste al tejido (Bozzola y Russell, 1992). Así, además de actuar como fijador, procede como contrastante menos acentuado, por cierto, que el de los contrastantes utilizados en la “coloración” de los cortes finos.

DESHIDRATACIÓN.

La deshidratación es el proceso que sustituye el agua intracelular por un líquido que actúa a modo de solvente entre el medio celular acuoso y la resina de inclusión hidrofóbica. El reemplazo se consigue mediante una serie de cambios de concentración ascendente del agente deshidratante, en este caso etanol, para lograrlo se procede de acuerdo al siguiente protocolo:

Agente deshidratante	% de alcohol	Temperatura (°C)	N° de cambios	Tiempo (min.)
Etanol	50	4	1	5
Etanol	75	4	1	5
Etanol	90	ambiente	1	5
Etanol	100	ambiente	1	5

Los pasos de deshidratación iniciales se realizaron a 4° C con la finalidad de minimizar los cambios post-mortem debidos a la actividad lisosomal que se retardan considerablemente.

INFILTRACIÓN.

Este proceso implica la sustitución del agente deshidratante por un compuesto intermediario entre el etanol y la resina epóxica que se utiliza en la inclusión, ya que este alcohol es poco miscible con el epón. Se usa en siguiente una pauta basada en óxido de propileno que se muestra a continuación:

Agente	N° de cambios	Tiempo (minutos)
Óxido de propileno	2	15
Óxido de propileno – epón (1:1)	1	30

INCLUSIÓN.

La inclusión consiste en sustituir la mixtura resina-óxido de propileno por la mezcla definitiva de resina y su posterior polimerización a 60°C por 48 horas. Esta reacción química le proporciona al espécimen el soporte físico imprescindible que permite obtener cortes finos. El proceso implica 4 cambios de 30 minutos cada uno en la resina (Luft, 1961), cuya composición se detalla seguidamente:

Agente	Mililitros
EM bed – 812	9,0
DDSA	6,0
NMA	5,0
DMP – 30	0,5

CORTE Y CONTRASTE.

Los cortes finos (60-90 nm) se obtuvieron con una cuchilla de diamante acoplada a un ultramicrotomo Porter–Blum MT2–B. Las secciones finas se contrastaron con acetato de uranilo (Watson, 1958) y citrato de plomo (Reynolds, 1963). Si bien el mecanismo de acción de los elementos contrastantes se desconoce, se acepta que los iones uranilo

reaccionan fuertemente con los grupos fosfato contenidos en los ácidos nucleicos y las proteínas, adquiriendo en consecuencia un contraste consistente y característico. Asimismo, los iones plomo se enlazan a componentes cargados negativamente como los grupos hidroxilo y a los dominios en los que se había enlazado el osmio. Los grupos fosfatos también podrían estar implicados en este fenómeno (Bozzola y Russell, 1992). El acetato de uranilo se emplea en forma de solución acuosa al 3%. La rejilla porta-muestras se coloca sobre la solución en oscuridad durante 35 minutos y, posteriormente, se lava con agua destilada dejándose secar antes de proceder al tratamiento con el siguiente compuesto. El contraste con citrato de plomo se realiza colocando una gota de la solución sobre un papel impermeable en una placa de Petri completamente anhidra. Para lograrlo la placa se colocará en una cámara anhidra y se depositarán en el interior de la placa perlitas de NaOH; la anhidrosis procederá durante los 20 minutos previos a la introducción de las rejillas porta-muestras. Una vez colocadas las rejillas en contacto con el contrastante en el interior de la cámara, se dejan transcurrir 15 minutos. Posteriormente, las muestras (cortes finos sobre rejilla porta-muestras) se enjuagan con agua destilada y se dejan secar. Los cortes finos se examinaron en el microscopio electrónico de transmisión Jeol JEM-1011, con voltaje de aceleración de 80 kV. El registro permanente se efectuó en negativos de $8,3 \times 10,2$ cm, de los cuales se obtuvo el positivo, bajo el procedimiento común de revelado de fotografías.

Los cortes gruesos fueron realizados a partir de las muestras ya incluidas en resina, en un ultramicrotomo Porter-Blum MT2-B, para luego ser coloreados con azul de toluidina, observados por microscopia de luz y registrados en fotografías digitales. El azul de toluidina, es un colorante básico, que se une selectivamente a los grupos fosfato de carga

negativa del DNA y RNA. En consecuencia, tiñe la cromatina, el nucléolo y los ribosomas (Welsch y Sobotta, 2009). Este colorante es empleado para mostrar las células y fibras en cortes de resina epoxi, pues es uno de los pocos que penetran la densa resina y logran teñir el corte tisular (Stevens y Lowe, 2006).

A partir de las micrografías obtenidas en los cortes finos y gruesos, se realizaron medidas morfométricas, a través del programa IMAGE TOOLS versión 3.1. Los datos fueron analizados realizando un análisis de la varianza ANOVA a través del programa STATISTICA versión 2.0.

El ANOVA es un estadístico que se utiliza para comparar si los valores de un conjunto de datos numéricos son significativamente distintos a los valores de otro o más conjuntos de datos. El procedimiento para comparar estos valores está basado en la varianza global observada en los grupos de datos numéricos a comparar. Típicamente, el ANOVA se utiliza para asociar una probabilidad a la conclusión de que la media de un grupo de puntuaciones es distinta de la media de otro grupo de puntuaciones. De esta manera, establece que el ANOVA es un procedimiento estadístico que permite analizar si más de dos grupos difieren significativamente entre sí en cuanto a sus medias y varianza. Mediante la comparación se pretende probar una hipótesis de diferencia entre más de dos grupos (Milton, 2001).

Finalmente se llevó a cabo el análisis de las micrografías obtenidas a través de la descripción cualitativa y cuantitativa de la morfología y estructura del tejido, las células y sus organelos, sus alteraciones y la búsqueda de patologías, mediante la revisión bibliográfica, para correlacionar los enfoques parasitológico, histopatológico ultraestructural y morfométrico.

Para facilitar su comprensión, los resultados han sido agrupados en 4 enfoques, clasificados de acuerdo a la metodología utilizada para la obtención de los mismos. Estos son: parasitológico, histopatológico, ultraestructural y morfométrico.

- I. **Enfoque parasitológico.** Implica una descripción de los resultados obtenidos a partir de técnicas empleadas comúnmente en estudios clásicos de parasitología, incluyendo variables como la parasitemia, supervivencia, peso y hematocrito de los individuos para cada grupo experimental, a lo largo de la infección. En el se evalúa el comportamiento parasitológico de los aislados utilizados y signos clínicos de los roedores infectados.
- II. **Enfoque histológico.** Muestra las principales alteraciones a nivel microscópico, permitiendo apreciar cambios alveolares y tisulares en los individuos infectados experimentalmente con los aislados *E. caballus* y *E. asinus*, comparándolos con los controles.
- III. **Enfoque ultraestructural.** En el transcurso de las infecciones experimentales, los hospedadores sufren alteraciones pulmonares submicroscópicas, de las cuales algunas son descritas de forma interdiaria. Se analizan los cambios en los animales infectados con cada uno de los aislados.

IV. **Enfoque morfométrico.** Permite evaluar algunas de las alteraciones observadas en los enfoques anteriores, cuantificando variables como el diámetro mayor de los espacios alveolares, grosor de la membrana basal capilar, área de los neumocitos I, área de los neumocitos II, área de su núcleo y diámetro de sus cuerpos laminares, a lo largo de las infecciones experimentales. Se determina la significancia de las alteraciones y se comparan los cambios entre los aislados.

I. DESCRIPCIÓN PARASITOLÓGICA

A continuación se muestra el cambio de las variables parasitológicas: parasitemia, sobrevivencia, peso y hematocrito en el transcurso de la infección experimental correspondiente a los aislados de *T. evansi* provenientes de *E. caballus* y *E. asinus*.

Una de las variables más representativas, en los estudios parasitológicos es la parasitemia. La Figura 10, muestra diferencias en el comportamiento parasitológico de los aislados estudiados. El grupo infectado con el aislado procedente de *E. caballus* incrementa de forma continua la parasitemia hasta la muerte de los hospedadores, mientras que el infectado con el aislado de *E. asinus* presenta un patrón que evidencia fluctuaciones en la carga parasitaria de los animales.

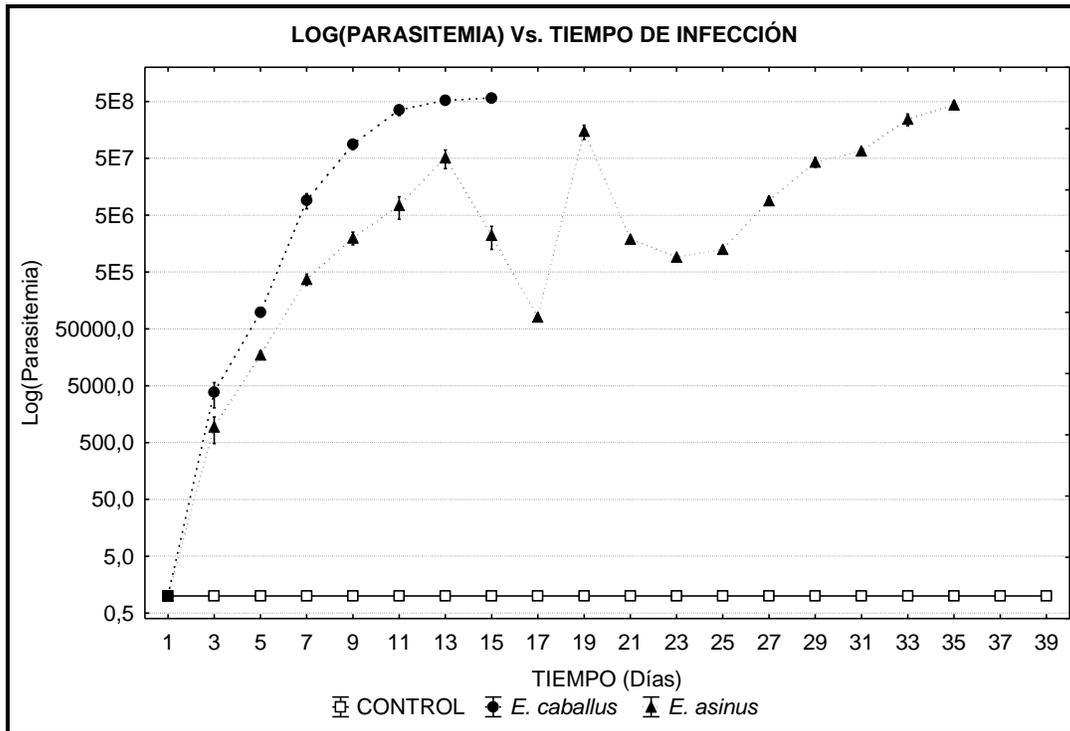


Figura 10. La gráfica indica en el eje (Y) las variaciones estimadas del promedio de Parasitemia (P) de *T. evansi*, luego de la infección experimental en murinos, en el transcurso del tiempo (eje X). Cada curva corresponde a un grupo experimental. La línea punteada y triángulos señala el curso y promedio interdiario de P, en los animales infectados con *E. asinus*, la línea discontinua y círculos indican el curso y promedio de P, en los animales infectados con *E. caballus* y la línea continua y cuadros muestra el comportamiento del grupo control. Las barras (ó bigotes) de cada promedio corresponden al error estándar asociado a cada media aritmética.

Estas cargas parasitarias se ven reflejadas en la sobrevivencia de los animales, la cual fue mayor en los individuos infectados con el aislado *E. asinus*, tal como se muestra en la Figura 11, evidenciando una menor agresividad del mismo y señalando un mayor tiempo en la infección experimental.

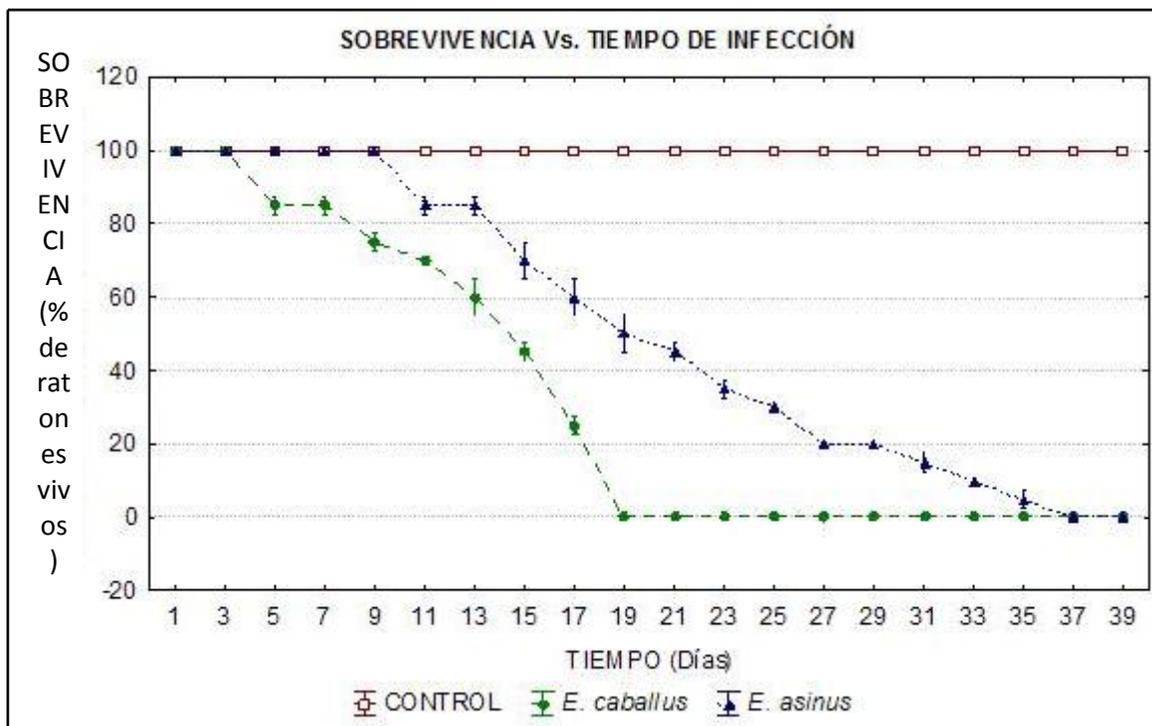


Figura 11. La gráfica indica en el eje (Y) las variaciones estimadas del promedio del porcentaje de sobrevivencia (S) de los ratones luego de la infección experimental, en el transcurso del tiempo (eje X). Cada curva corresponde a un grupo experimental. La línea punteada y triángulos señala el curso y promedio interdiario de S, en los animales infectados con *E. asinus*, la línea discontinua y círculos indican el curso y promedio de S, en los animales infectados con *E. caballus* y la línea continua y cuadros muestra el comportamiento del grupo control. Las barras (ó bigotes) de cada promedio corresponden al error estándar asociado a cada media aritmética.

Los efectos de la infección se evidencian también en el peso corporal de los roedores. La Figura 12, permite apreciar una disminución del mismo en los roedores infectados con cada uno de los aislados. Asimismo, la Figura 13 evidencia una disminución progresiva en el porcentaje de eritrocitos (Hematocrito) de los modelos murinos. Se destaca la diferencia entre el efecto causado, en ambas variables, por el aislado *E. caballus* y el aislado *E. asinus*.

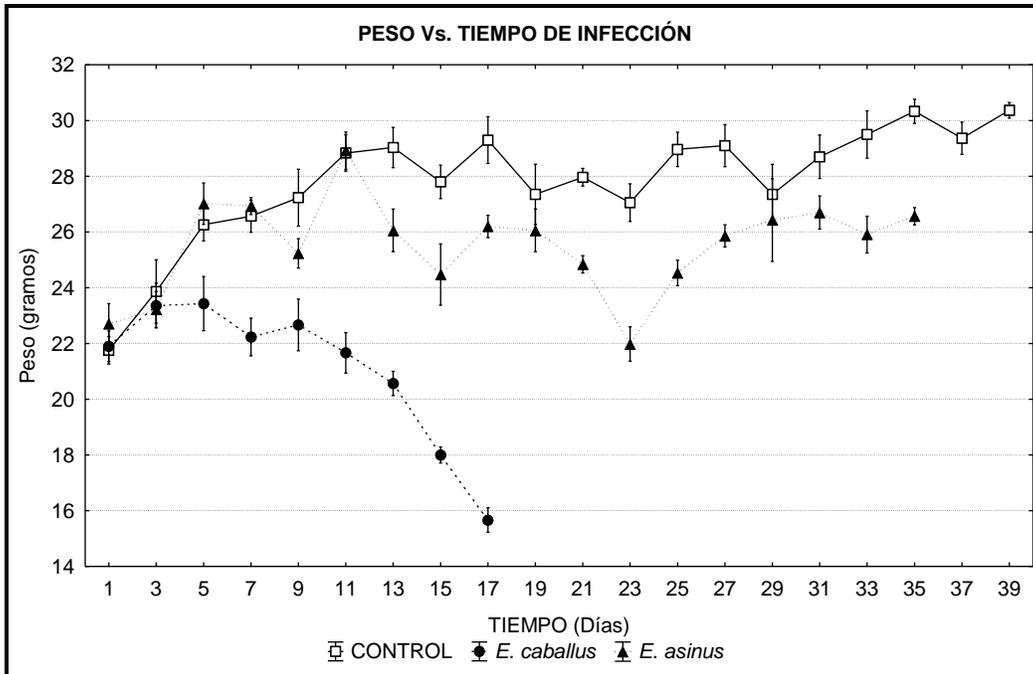


Figura 12. La gráfica indica en el eje (Y) las variaciones estimadas del promedio del Peso corporal (PC) de los ratones infectados en el transcurso del tiempo (eje X). Cada curva corresponde a un grupo experimental. La línea punteada y triángulos señala el curso y promedio interdiario de PC, en los animales infectados con *E. asinus*, la línea discontinua y círculos indican el curso y promedio de PC, en los animales infectados con *E. caballus* y la línea continua y cuadros muestra el comportamiento del grupo control. Las barras (ó bigotes) de cada promedio corresponden al error estándar asociado a cada media aritmética.

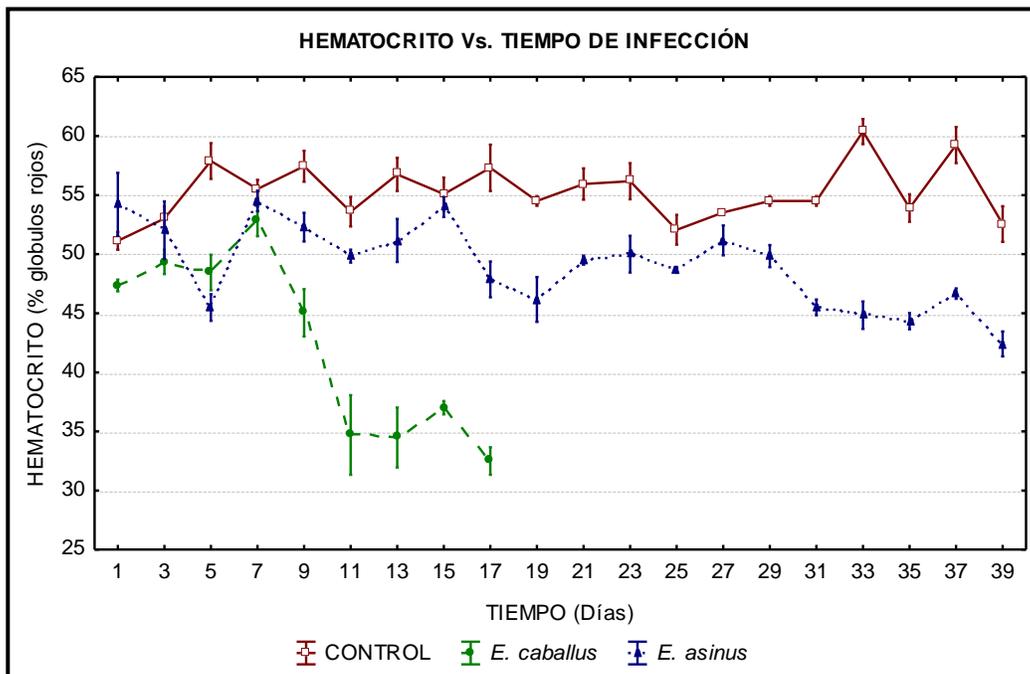


Figura 13. La gráfica indica en el eje (Y) las variaciones estimadas del promedio del Hematocrito (H) de los ratones infectados en el transcurso del tiempo (eje X). Cada curva corresponde a un grupo experimental. La línea punteada y triángulos señala el curso y promedio interdiario de H, en los animales infectados con *E. asinus*, la línea discontinua y círculos indican el curso y promedio de H, en los animales infectados con *E. caballus* y la línea continua y cuadros muestra el comportamiento del grupo control. Las barras (ó bigotes) de cada promedio corresponden al error estándar asociado a cada media aritmética.

Hasta ahora, los resultados mostrados en esta sección evidencian con claridad que existen indudables diferencias parasitológicas entre los aislados estudiados, presentándose efectos mas pronunciados sobre el hospedador infectado con el aislado proveniente de *E. caballus*, respecto a los infectados con el aislado proveniente de *E. asinus*.

II. DESCRIPCION HISTOPATOLÓGICA DEL TEJIDO

La infección causada por el parásito evidencia cambios macroscópicos en los animales, tanto en el aislado proveniente de *E. caballus* como en el aislado de *E. asinus*. Particularmente, a nivel pulmonar, se observan más oscuros y con un notable aumento de tamaño.

A nivel microscópico, usando como herramienta la microscopía de luz y técnicas histológicas, estos daños claramente perceptibles, pueden correlacionarse con algunas alteraciones observadas como el aumento de los espacios alveolares y alveolos, lo cual se hace evidente en la Figura 15.

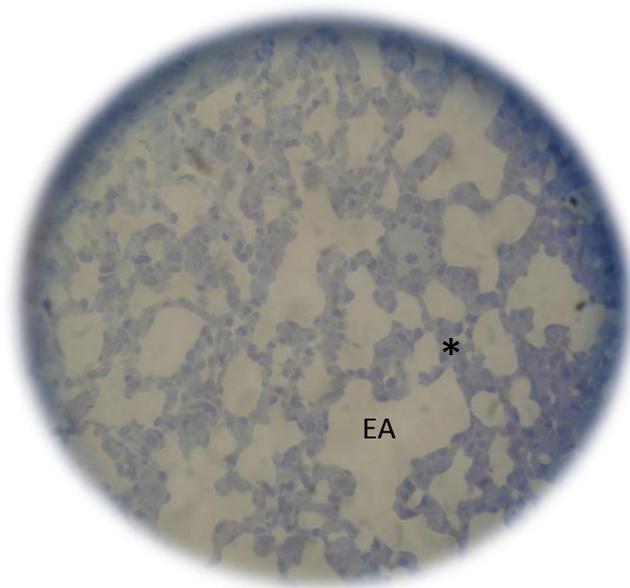


Figura 14. Corte histológico de tejido pulmonar de un ratón no infectado (control), donde se evidencian los espacios alveolares (EA) y los tabiques interalveolares (asterisco). (400X). (Coloración realizada con Azul de Toluidina)

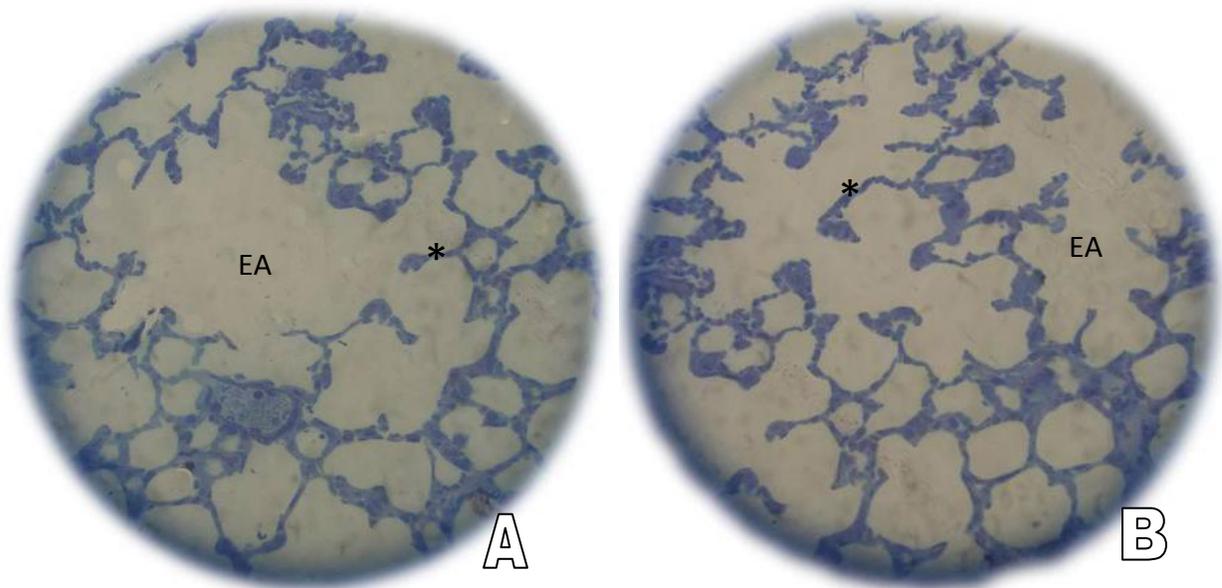


Figura 15. A. Corte histológico de tejido pulmonar a los 15 días de infección experimental con el aislado proveniente de *E. caballus* de *T. evansi*, donde se observa aumento de los espacios alveolares (EA) y ruptura de los tabiques (asterisco) (400X). B. Corte histológico de tejido pulmonar a los 30 días de infección experimental con el aislado proveniente de *E. asinus* de *T. evansi*, donde se evidencia aumento de los espacios alveolares (EA) y ruptura de los tabiques (asterisco) (400X). (Coloración con Azul de Toluidina)

DESCRIPCIÓN ULTRAESTRUCTURAL DEL TEJIDO.

A continuación se muestran una serie de micrografías tomadas durante el desarrollo experimental, correspondientes al tejido pulmonar del grupo control y de ratones infectados con los aislados provenientes de *E. caballus* y de *E. asinus* de *T. evansi*.

La Microscopía Electrónica de Transmisión muestra resultados ultraestructurales específicos, que permiten apreciar cambios submicroscópicos a nivel celular, pudiendo observar alteraciones en los organelos. De esta forma, es posible correlacionar daños en los tres niveles: submicroscópico, microscópico y macroscópico, con el fin de ahondar en la patología de la infección.

Los cambios en el tejido pulmonar incluyen, para los grupos infectados con ambos aislados, alteraciones vasculares, retículo endoplasmático hinchado (Fig. 24b), aumento en el infiltrado celular (Fig. 20b y 26b), vacuolización (Fig. 20b y 25a) y presencia de parásitos en el lecho capilar pulmonar (Fig. 18a, 19a, 20a, 23a, 23b, 24a, 26a).

El daño vascular es apreciable desde el día 9 en los individuos infectados con el aislado procedente de *E. caballus* (Fig. 18a y 18b) y 13 en *E. asinus* (Fig. 23a y 23b.), incluyendo engrosamiento de la membrana basal (Fig. 18a, 18b, 19a 19b, 20a, 23b, 24a, 25a, 25b, 26a y 26b), prolongaciones del endotelio (Fig. 19a y 24a) y disminución de caveolas y vesículas pinocíticas (Fig.18a, 19a, 20a, 23a, 24a y 26b).

El aumento en el número de células del sistema inmune se hace evidente hacia los últimos días de la infección, para ambos grupos experimentales, apreciándose macrófagos (Fig. 20b y 26b) y neutrófilos (Fig. 20b).

Las micrografías muestran alteraciones mas marcadas en los últimos días de infección, sin embargo éstas se presentan mas temprano en el aislado *E. caballus*, donde la infección comprende aproximadamente 17 días.

Los neumocitos tipo I y neumocitos tipo II no experimentan alteraciones perceptibles a lo largo de la infección experimental, tanto en el grupo infectado con el aislado de *E. caballus* como en el de *E. asinus*.

Figura 16. Micrografía del tejido pulmonar de un ratón no infectado (control).

Figura 16. a. Se muestran tres capilares (CAP) sin alteraciones con eritrocitos y células del sistema inmune, además de células del endotelio vascular (rectángulo). Un neumocito tipo II (NII) con sus cuerpos laminares (estrellas) y microvellosidades características (flecha). Se evidencia colágeno (triángulo) en el tejido conectivo y el espacio alveolar (EA).

Figura 16. b. Se observan dos capilares (CAP), la membrana basal (flecha) y sus células endoteliales. Un neumocito tipo II se hace evidente con numerosos cuerpos multilamelares (estrella), mitocondrias (circulo) y microvellosidades (elipse).

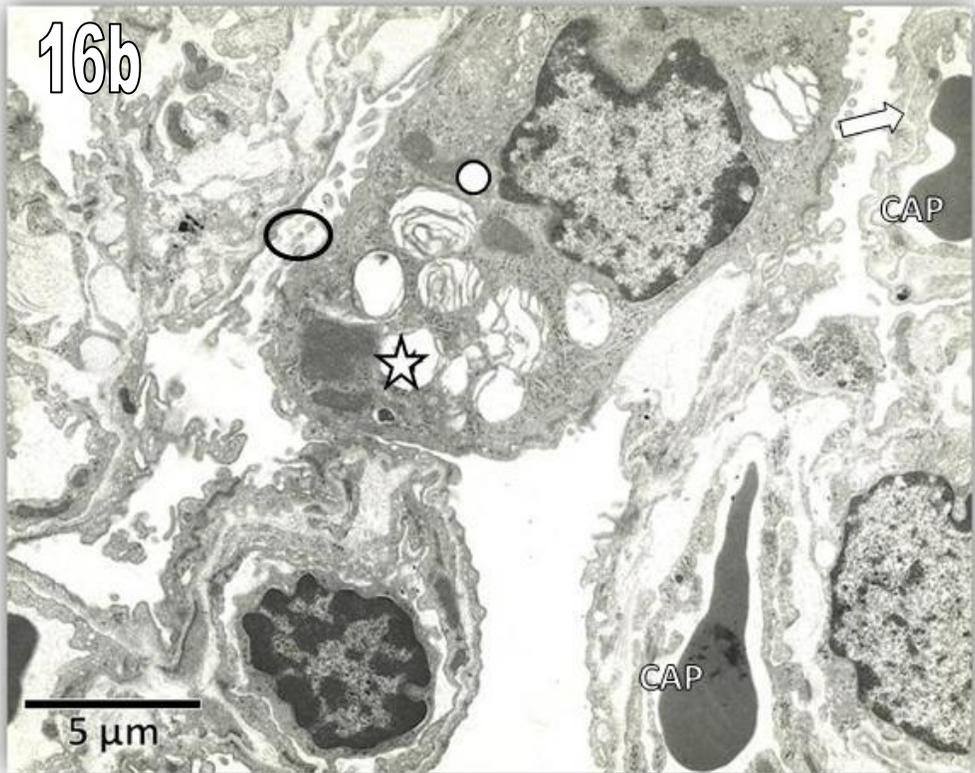
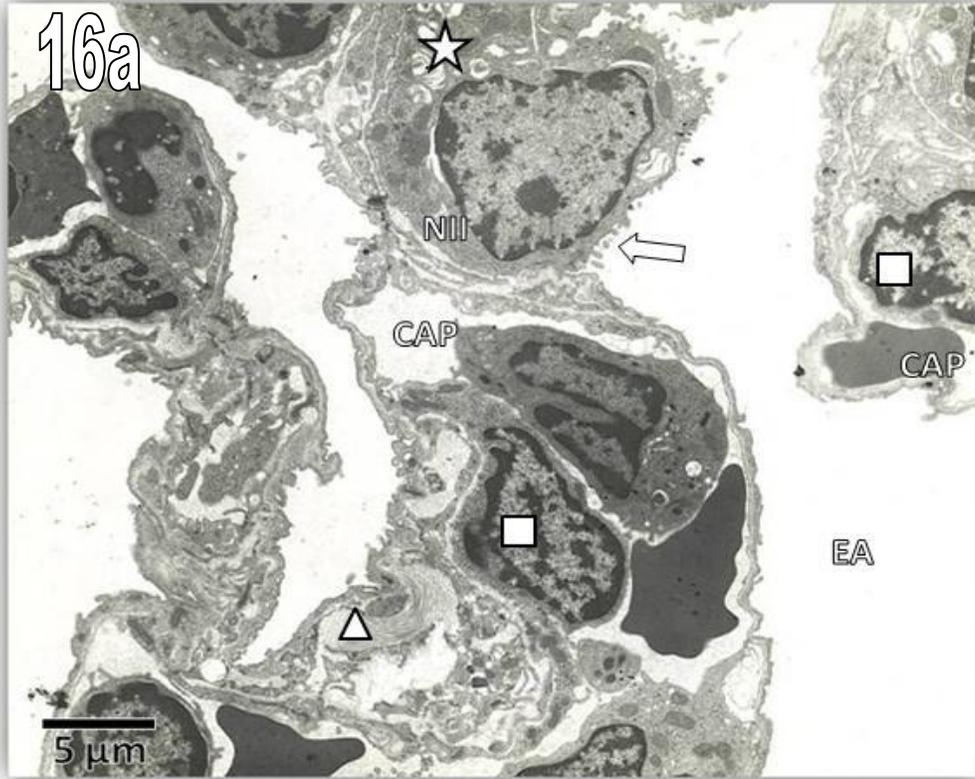


Figura 17. Micrografía del tejido pulmonar de un ratón a los 5 días de infección con el aislado *E. caballus* de *T. evansi*.

Figura 17. a. Se aprecian células del tejido conectivo (triángulo) con sus mitocondrias (estrella) y un capilar (CAP) con su membrana basal poco alterada (flecha).

Figura 17. b. Se observan los tres tipos celulares característicos del tejido pulmonar: un macrófago alveolar (M), un neumocito tipo I (NI) en la pared del alveolo (EA) y un neumocito tipo II (NII) con cuerpos laminares (estrella).

SERIE DE MICROGRAFÍAS CORRESPONDIENTES A LA INFECCIÓN CON EL AISLADO PROVENIENTE DE *E. caballus*

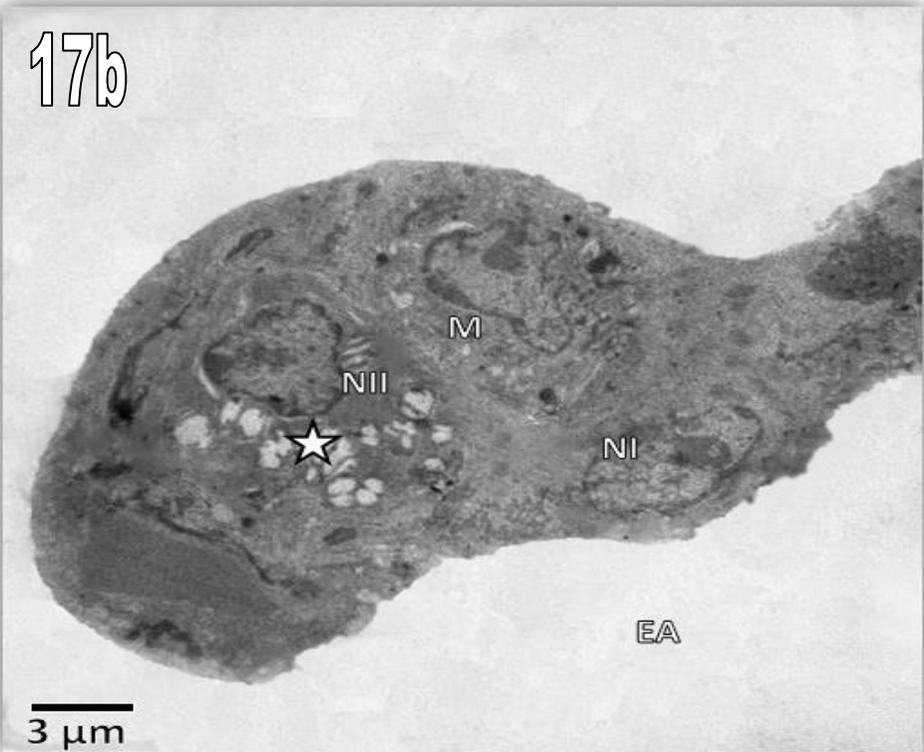
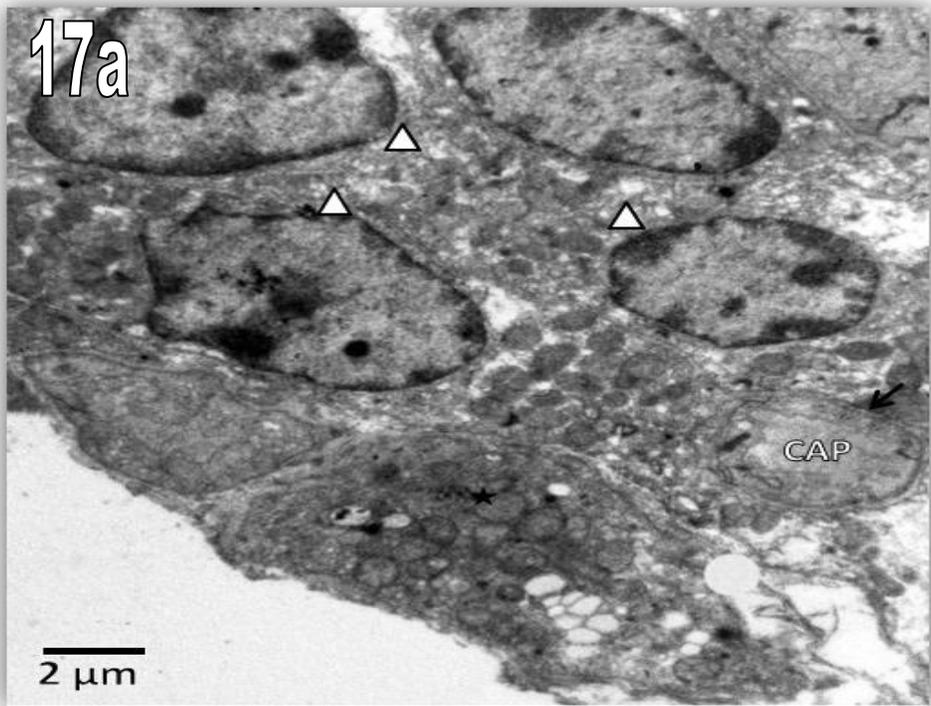


Figura 18. Micrografía del tejido pulmonar de un ratón a los 9 días de infección con el aislado *E. caballus* de *T. evansi*.

Figura 18. a. Los tripomastigotes se hacen evidentes en la luz del capilar (CAP), se percibe engrosamiento de la membrana basal (flecha) y una ligera disminución en el número de caveolas (elipse). Se observa además un neumocito tipo I (NI) típicamente alargado en la pared alveolar.

Figura 18. b. Se muestran dos capilares (CAP), uno con la luz ocluida (superior), indicador de daño, y otro sin alteraciones. Se señala la membrana basal de cada uno (flecha) y la célula endotelial de uno de los capilares (cuadro).

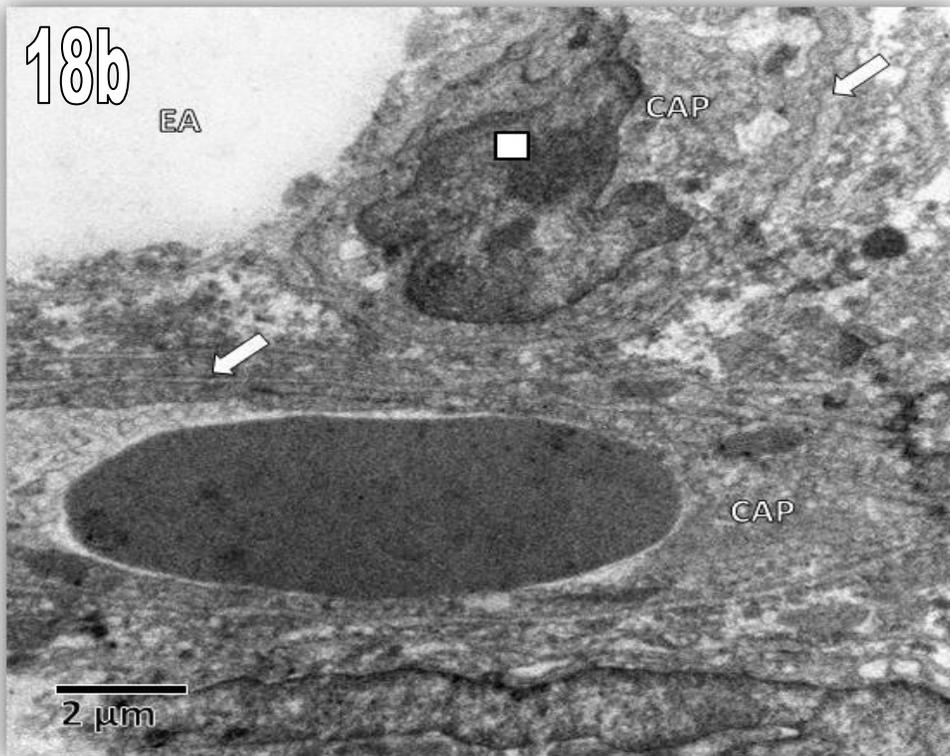
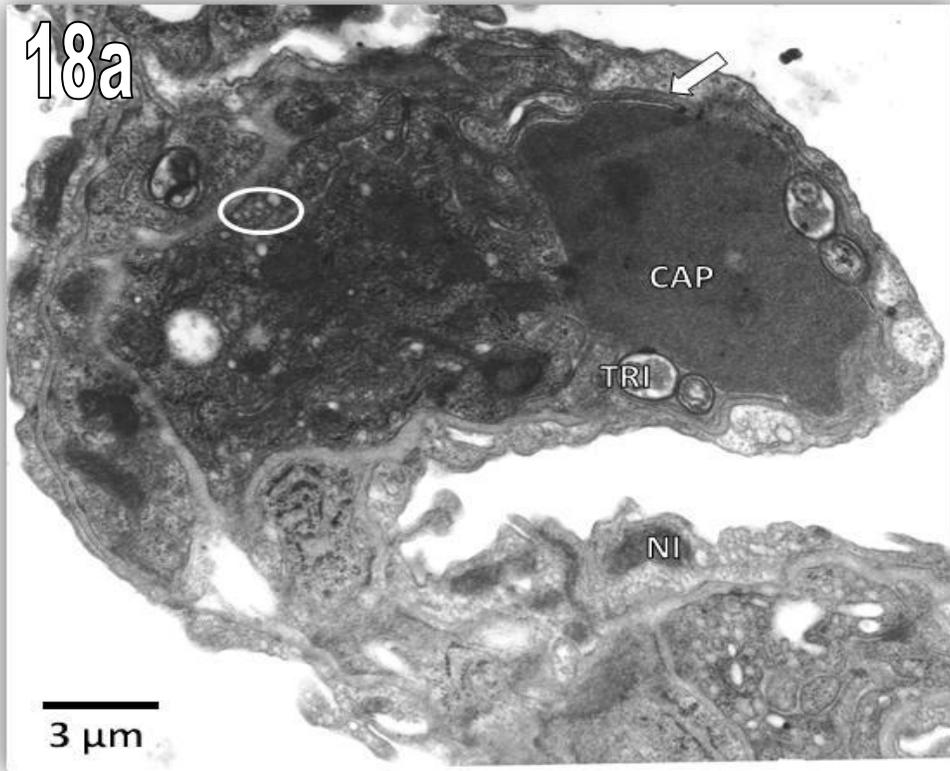


Figura 19. Micrografía del tejido pulmonar de un ratón a los 13 días de infección con el aislado *E. caballus* de *T. evansi*.

Figura 19. a. Se observa un tripomastigote (TRI), dentro del capilar (CAP) con membrana basal engrosada (flecha) y disminución notable del número de caveolas (elipse). La estrella señala prolongaciones endoteliales del capilar.

Figura 19. b. Se aprecian células del tejido conectivo (triángulo) y sus mitocondrias (estrella), así como un capilar (CAP) con membrana basal engrosada (flecha).

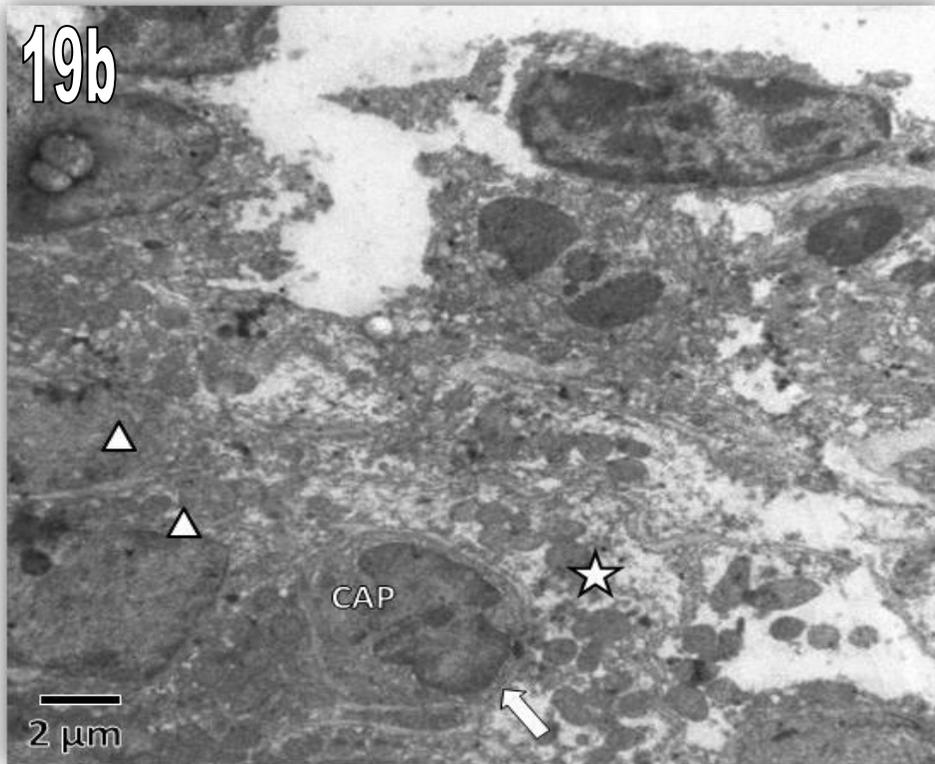


Figura 20. Micrografía del tejido pulmonar de un ratón a los 17 días de infección con el aislado *E. caballus* de *T. evansi*.

Figura 20. a. Se evidencia un tripomastigote (TRI), en el cual se observan acidocalcisomas (elipse), la región subpedicular (rectángulo) y flagelo (triángulo), se observa un neumocito tipo II (NII) con un cuerpo laminar (hexagono), el espacio alveolar (EA) y un capilar (CAP) con pocas vesículas pinocíticas (flecha) y membrana basal engrosada (círculo), mitocondrias sin alteración (estrella) y aparato de Golgi (rombo).

Figura 20.b. Se observa infiltrado celular en el tejido, encontrando macrofagos (M) y neutrofilos (N). Se percibe también un neumocito tipo II (NII) con sus cuerpos laminares (estrella) y microvellosidades (flecha), así como vacuolización en el tejido.

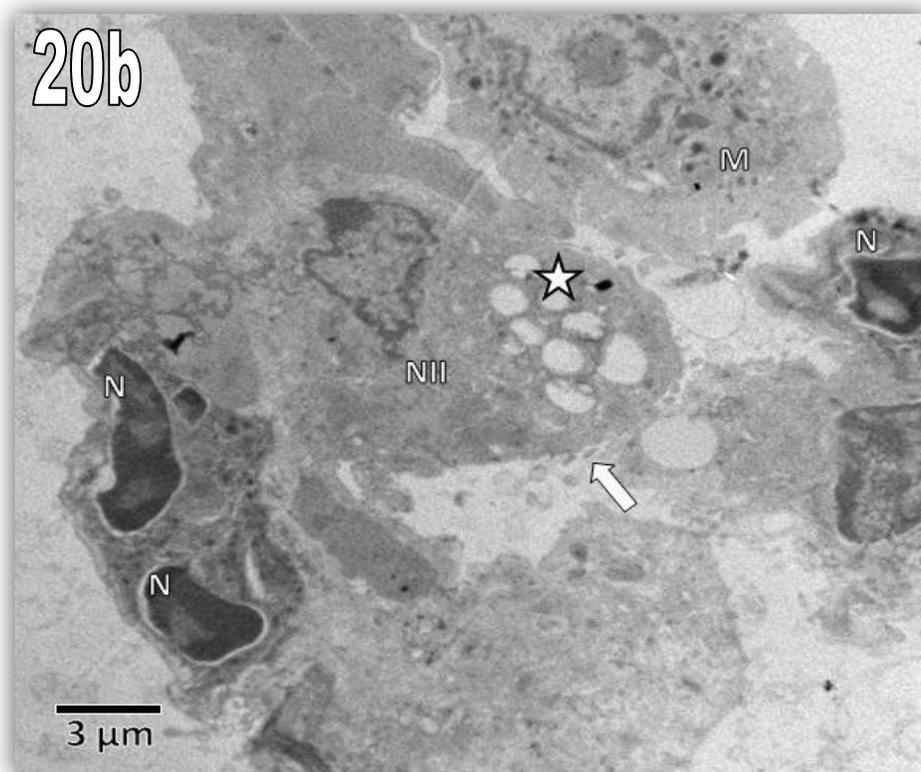
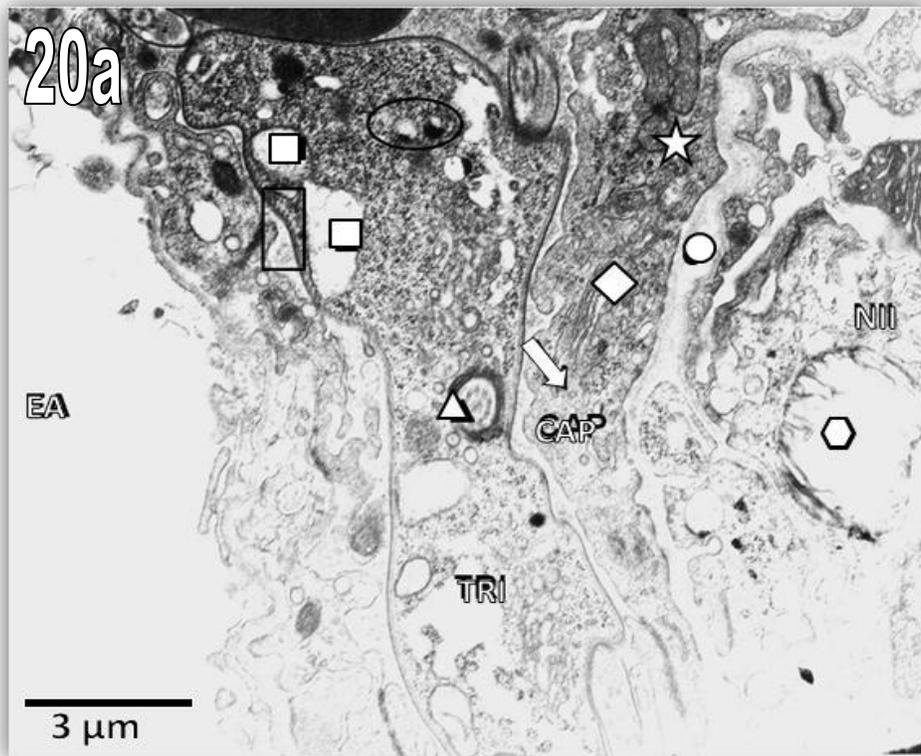


Figura 21. Micrografía del tejido pulmonar de un ratón a los 5 días de infección con el aislado *E. asinus* de *T. evansi*.

Figura 21. a. Se hace evidente un neumocito tipo II (II) con cuerpos laminares (estrella), microvellosidades (Flecha) y núcleo de redondeado y de gran tamaño (Nu).

Figura 21. b. Micrografía de pulmón en un ratón con 5 días de infección con el aislado *E. asinus* de *T. evansi*. Se observan células del tejido conectivo (triángulo) con sus mitocondrias (asterisco), así como un neumocito tipo I (NI) y un capilar (CAP) donde se señala la membrana basal (flecha).

SERIE DE MICROGRAFÍAS CORRESPONDIENTES A LA INFECCIÓN CON EL AISLADO PROVENIENTE DE *E. asinus*

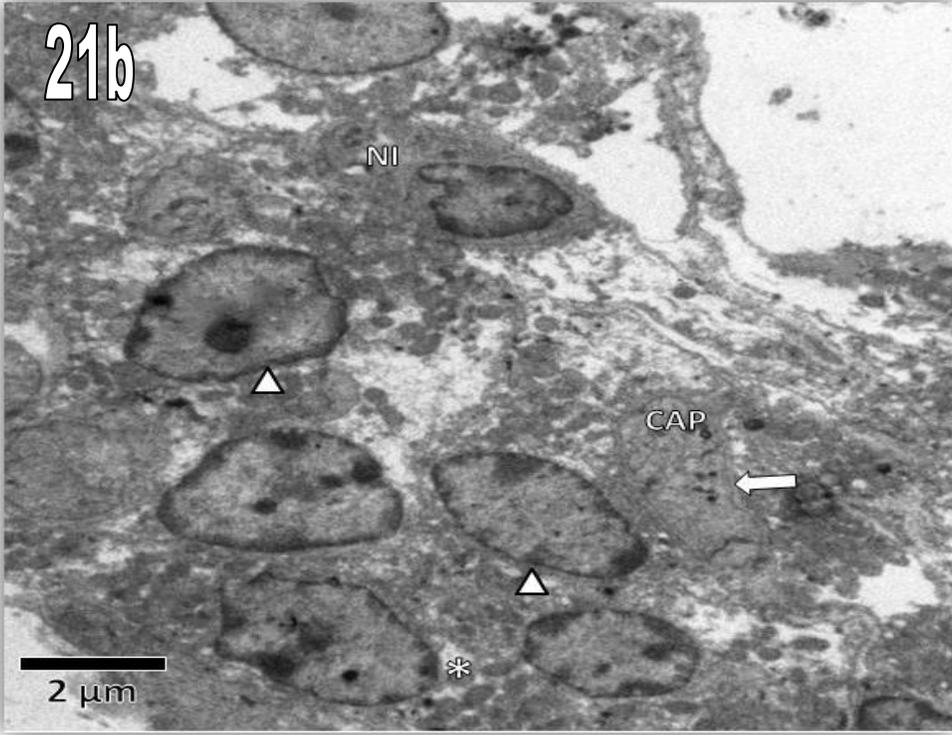
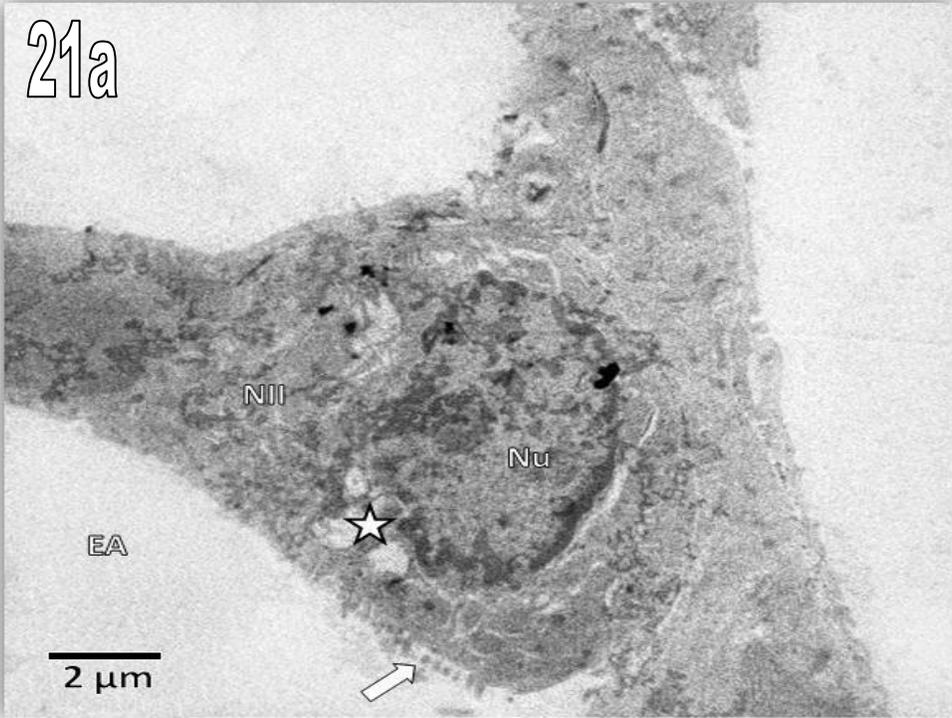


Figura 22. Micrografía del tejido pulmonar de un ratón a los 9 días de infección con el aislado *E. asinus* de *T. evansi*.

Figura 22. a. Se observa un neumocito tipo I (NI) con su núcleo (Nu) típicamente alargado. Se aprecia un daño mecánico en la preparación de la muestra que conlleva a la separación de la célula respecto al tejido.

Figura 22. B. Se evidencia un neumocito tipo II (NII), con cuerpos multilamelares (estrella), núcleo (Un) y microvellosidades (flecha).

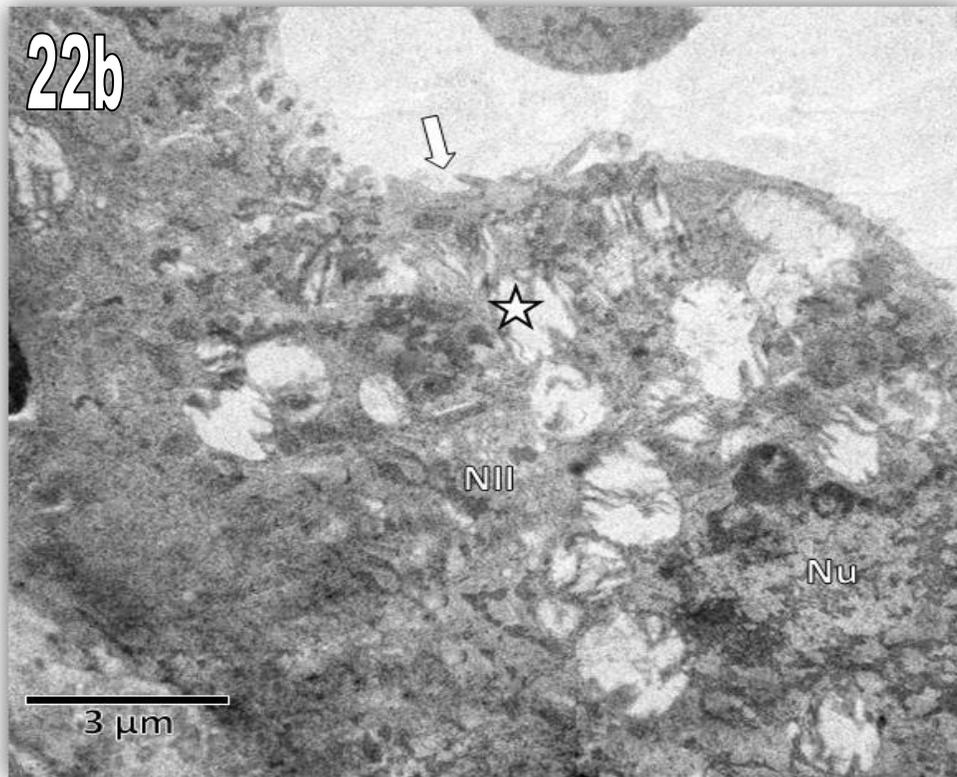
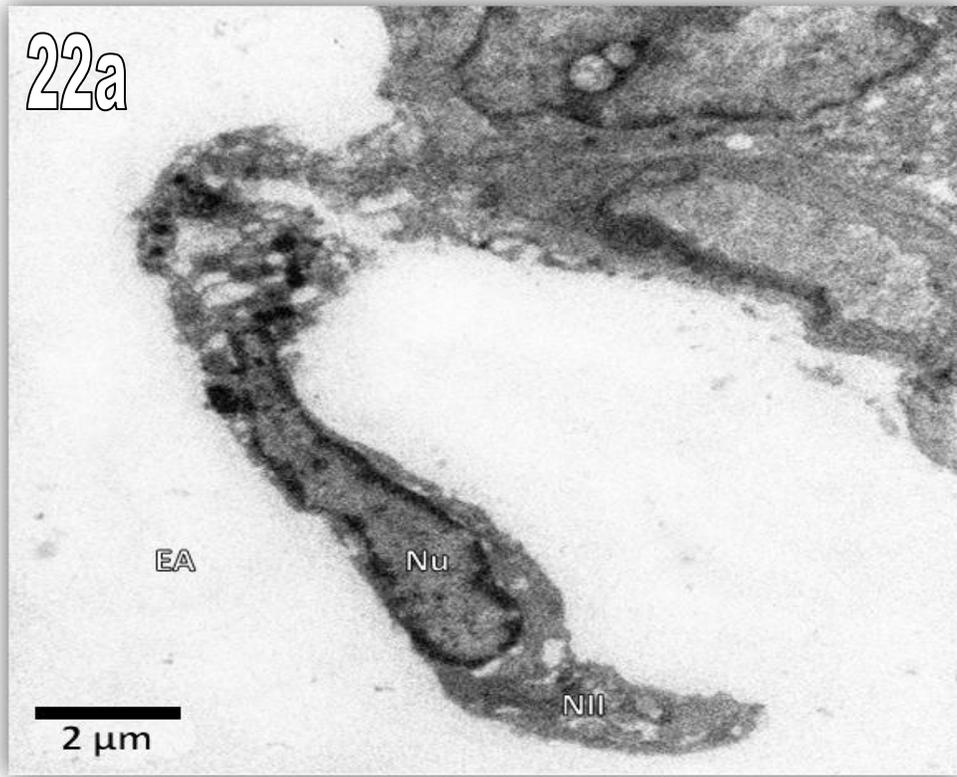


Figura 23. Micrografía del tejido pulmonar de un ratón a los 13 días de infección con el aislado *E. asinus* de *T. evansi*.

Figura 23. a. En la pared del capilar (CAP) se observan algunas vesículas pinocíticas (flechas), caveolas (cabeza de flecha) y mitocondrias bien organizadas (estrella), así como la membrana basal (elipse). En el tripomastigote se hace evidente el flagelo (triángulo) y la región subpelicular (rectángulo).

Figura 23. b. En el capilar (CAP) se perciben gran cantidad de caveolas y vesículas pinocíticas (flecha), así como la membrana basal engrosada (asterisco). En la luz se aprecia un tripomastigote (TRI) y su flagelo (estrella).

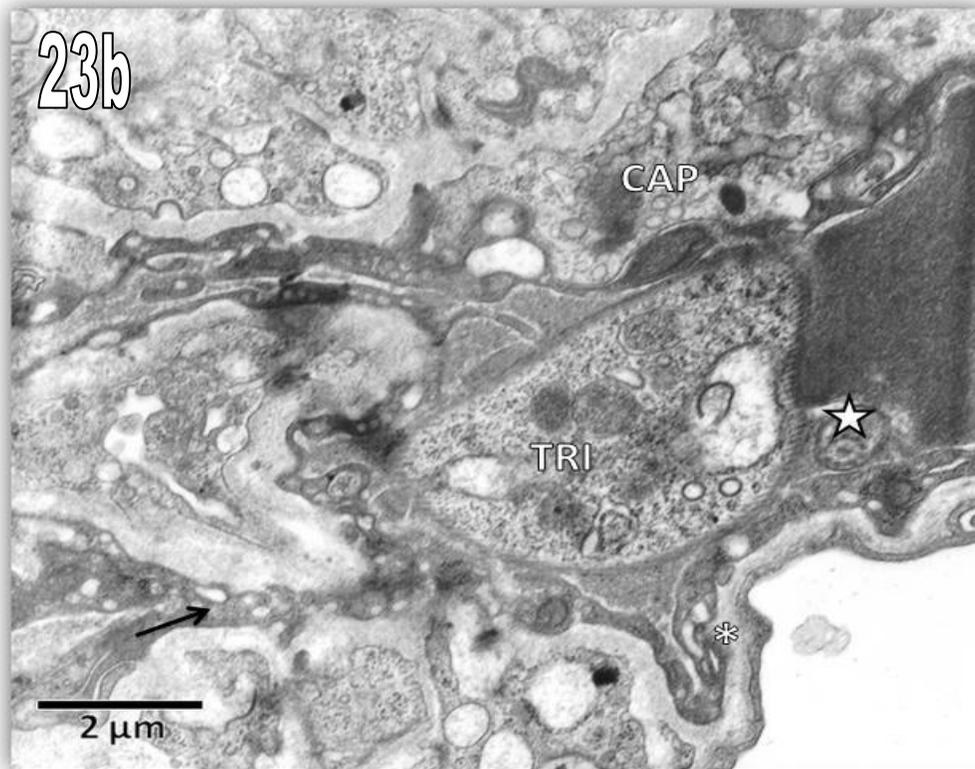
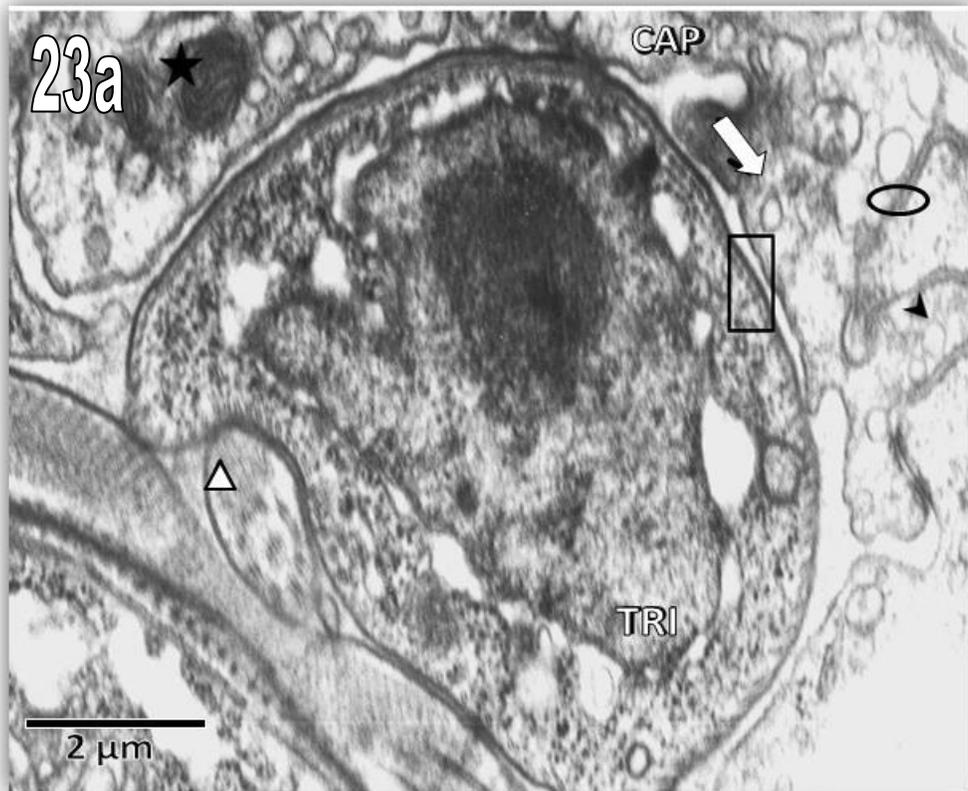


Figura 24. Micrografía del tejido pulmonar de un ratón a los 17 días de infección con el aislado *E. asinus* de *T. evansi*.

Figura 24. a. Se aprecia un tripomastigote (TRI) y flagelos (triángulo) en la luz de un capilar (CAP), en el cual se evidencia la disminución de caveolas (flecha) y prolongaciones endoteliales (estrella). Se observa también un neumocito tipo II (NII) con cuerpos laminares (rombo).

Figura 24. b. Se evidencia un capilar (CAP) y su membrana basal (flecha), una célula de tejido conectivo (estrella) y una porción celular mostrando retículo endoplasmático edematizado (asterisco)

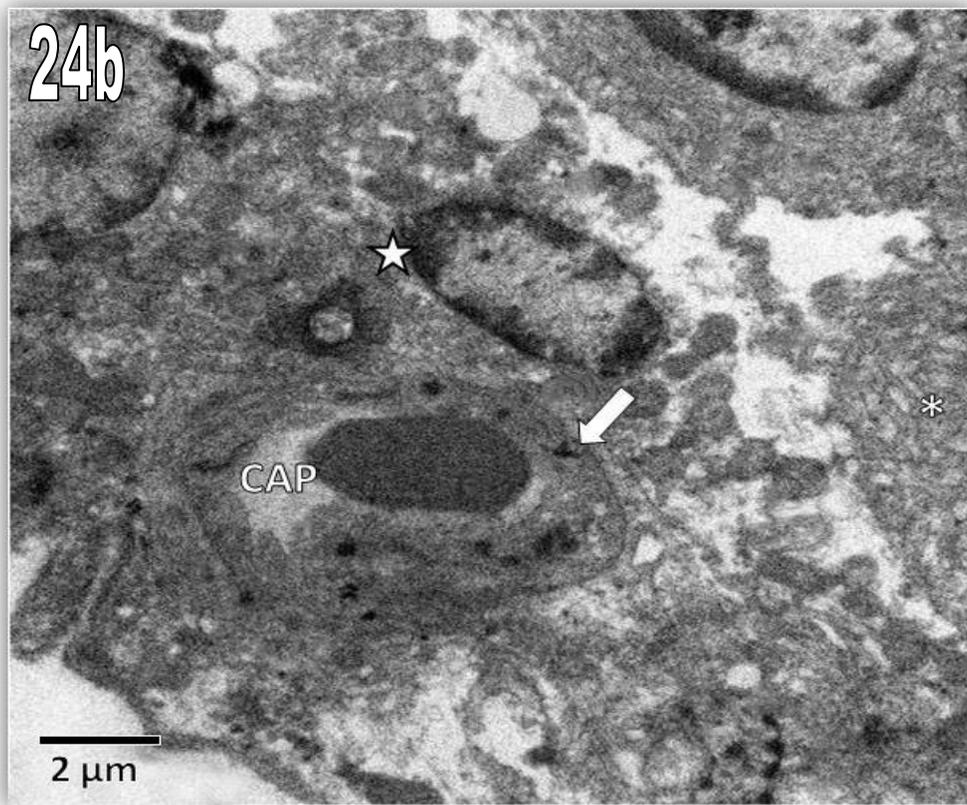
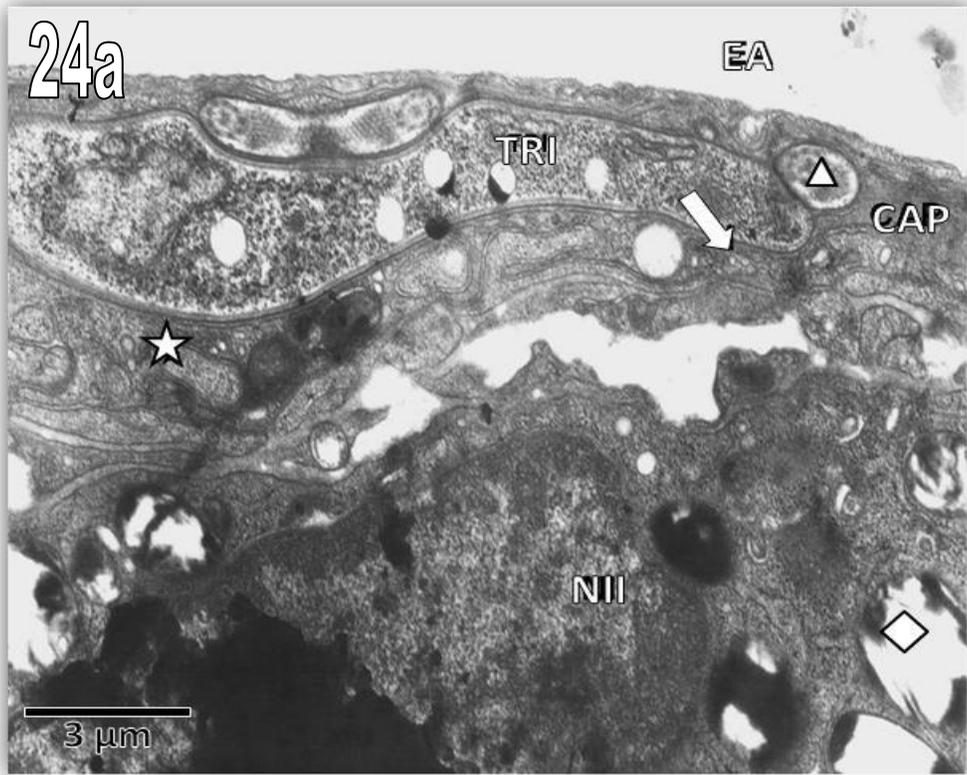


Figura 25. Micrografía del tejido pulmonar de un ratón a los 25 días de infección con el aislado *E. asinus* de *T. evansi*.

Figura 25. a. Se aprecian dos capilares (CAP) con eritrocitos en la luz y membrana basal engrosada (flecha), una célula endotelial (triángulo) y células del tejido conectivo (asterisco). La vacualización del tejido se hace evidente (estrella).

Figura 25. b. Se observan células del tejido conectivo (asterisco), un neumocito tipo I (NI) en la pared del espacio alveolar (EA). Se aprecian también dos capilares (CAP) con engrosamiento de la membrana basal (flecha).

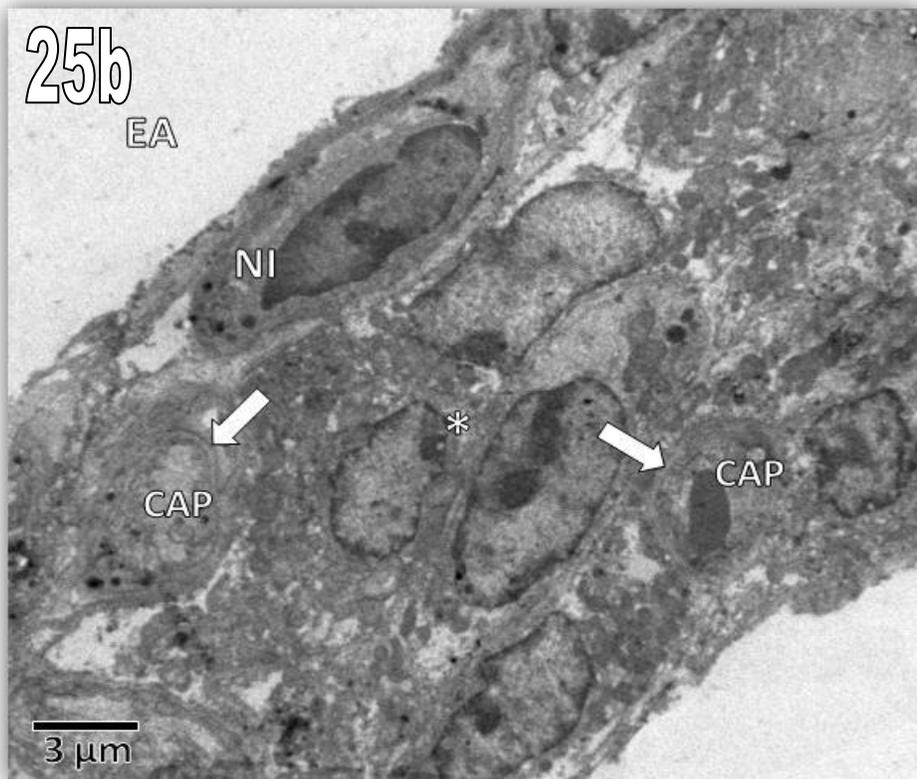
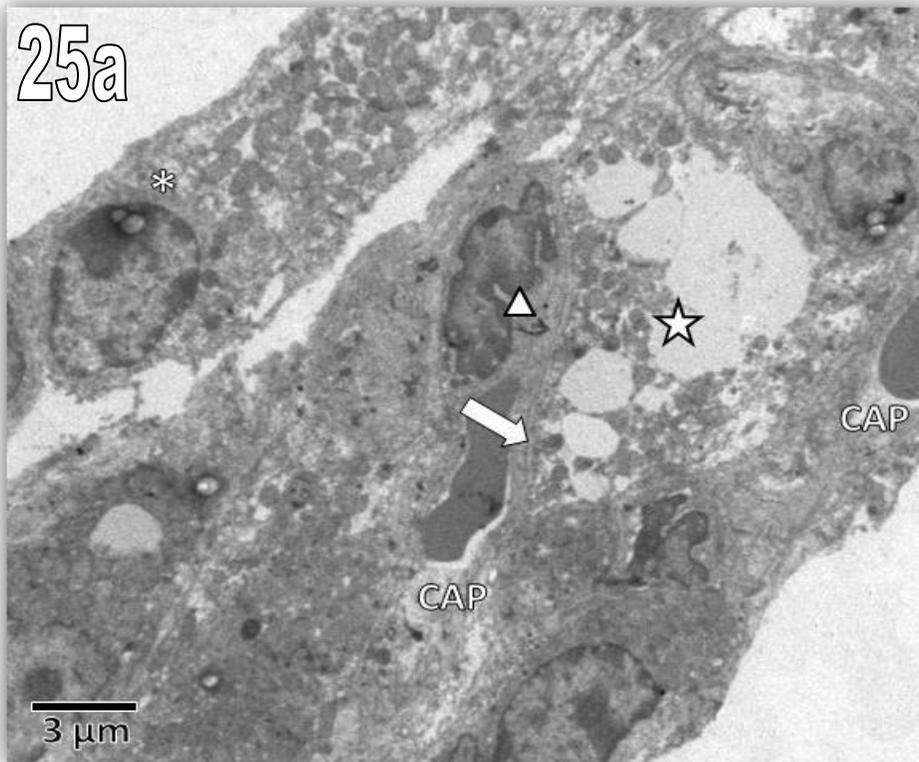
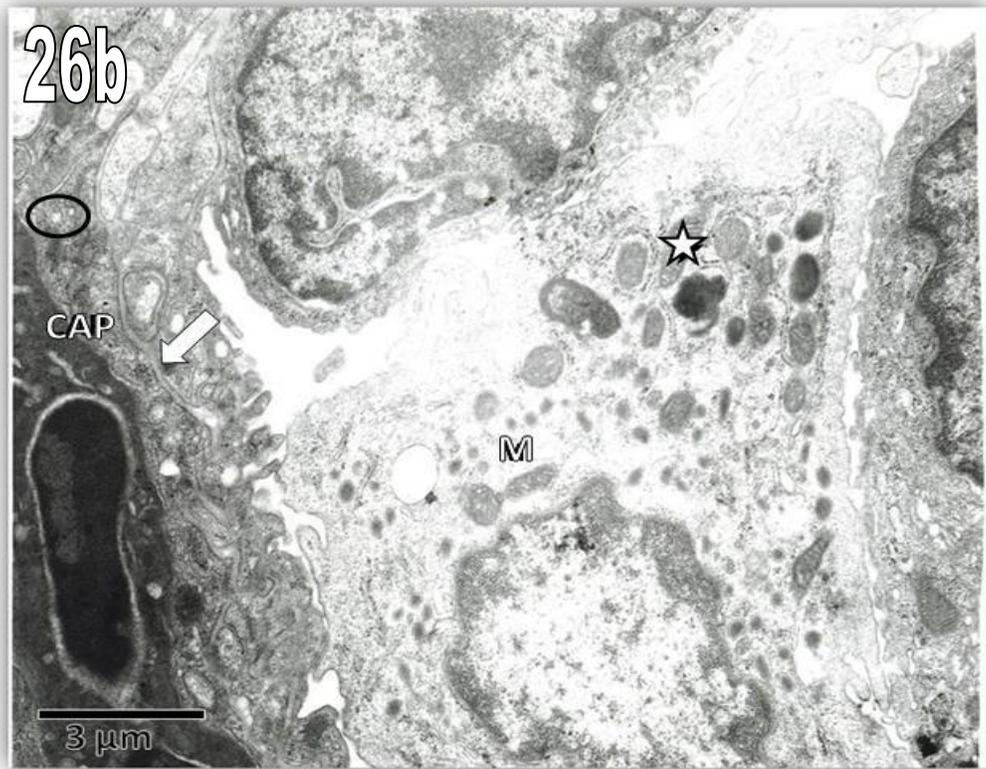
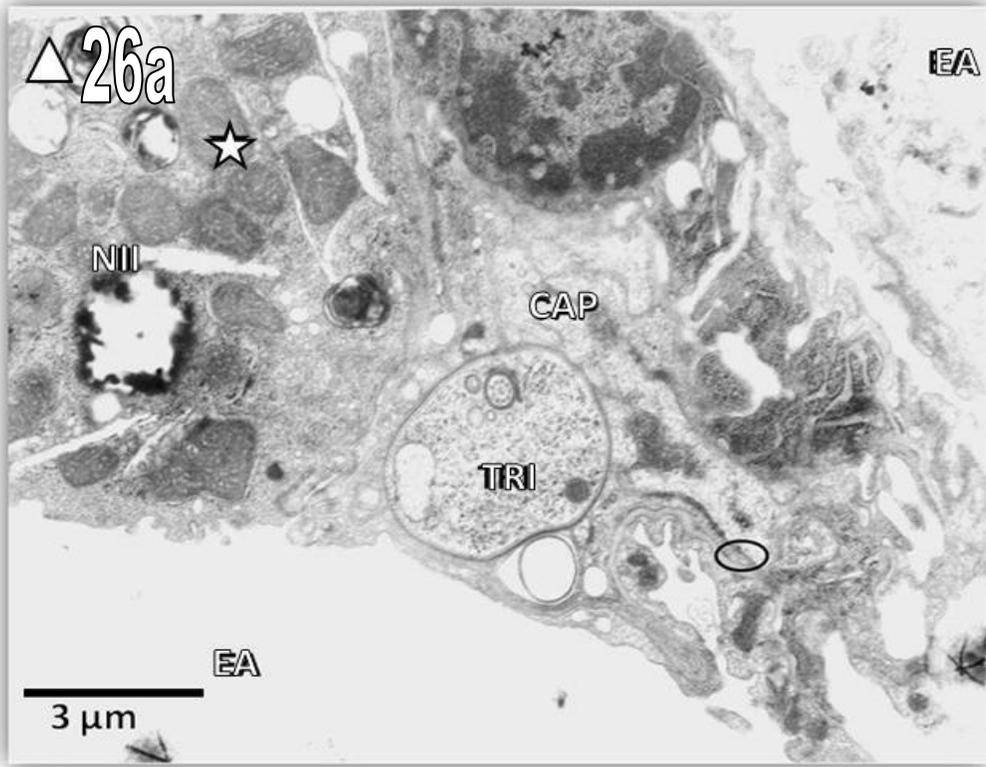


Figura 26. Micrografía del tejido pulmonar de un ratón a los 33 días de infección con el aislado *E. asinus* de *T. evansi*.

Figura 26. a. Se observa un tripomastigote (TRI) en la luz del capilar (CAP), el cual presenta engrosamiento de la membrana basal (elipse). Se aprecia también un neumocito tipo II (NII) con sus cuerpos laminares (triángulo) y mitocondrias donde se evidencian las crestas (estrella).

Figura 26. b. Se hace evidente un macrófago (M) y sus mitocondrias (estrellas), así como un capilar (CAP) con membrana basal engrosada (flecha) y pocas caveolas (elipse).



III. DESCRIPCIÓN CUANTITATIVA DE LAS ALTERACIONES EN CELULAS ALVEOLARES Y MICROVASCULATURA

Diámetro mayor de los espacios alveolares

Al cuantificar el diámetro mayor de los alvéolos se observa una gran diferencia, representada en la gráfica (Fig. 27), entre cada grupo experimental, siendo mayor el promedio de los espacios alveolares en los individuos infectados con *E. caballus*. La prueba estadística (ANOVA) confirma este hecho, arrojando diferencias significativas entre los aislados y estos a su vez, varían significativamente respecto al grupo control ($p=1 \times 10^{-7}$).

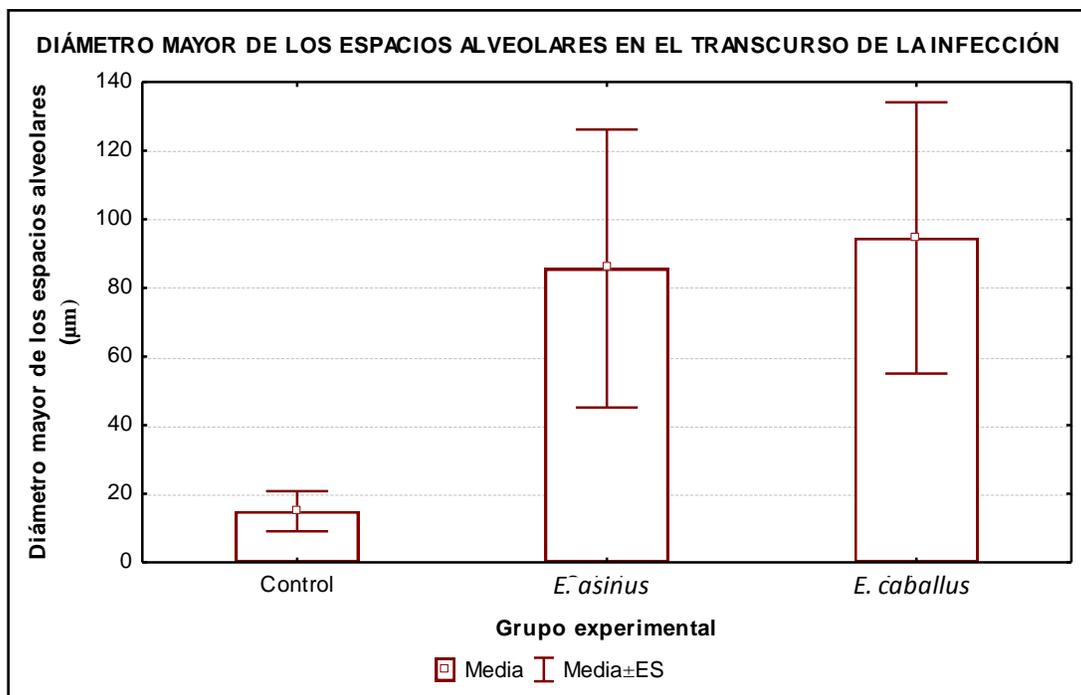


Figura 27. La gráfica indica en el eje Y los valores estimados del promedio del diámetro mayor de los espacios alveolares (EA) en murinos infectados experimentalmente con el aislado *E. caballus*, *E. asinus* y grupo control (Eje X). Las barras (ó bigotes) de cada promedio corresponden al error estándar asociado a cada media aritmética.

	Suma de cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrado medio	F	p
GRUPO	241089,2	2	120544,6	156,08	0,0000001
Error	113531,0	147	772,3		

Tabla 1. Resultados de ANOVA sobre los valores presentados en el gráfico correspondientes al diámetro mayor de los espacios alveolares.

Membrana basal del Capilar

La gráfica (Fig. 28) que muestra la variación en el grosor de la membrana basal del capilar a lo largo de la infección, evidencia un aumento de la misma para ambos aislados, con tendencias similares, sugiriendo lesiones capilares semejantes debido a *E. caballus* y *E. asinus*.

Al observar los análisis de la varianza (ANOVA) (Tabla 2), se obtienen diferencias significativas entre los grupos experimentales ($p < 0,05$), pues la curva correspondiente a los ratones no infectados (control) se mantiene casi constante, en discrepancia con las tendencias de los otros grupos.

Adicionalmente, los resultados indican una diferencia significativa respecto a la variación del grosor en el tiempo ($p = 0,002$) y respecto a los cambios ocurridos interdiariamente en cada aislado ($p = 0,007$), los cuales a pesar de presentar la misma tendencia al aumento, difieren en cuando a la variación observada para cada día.

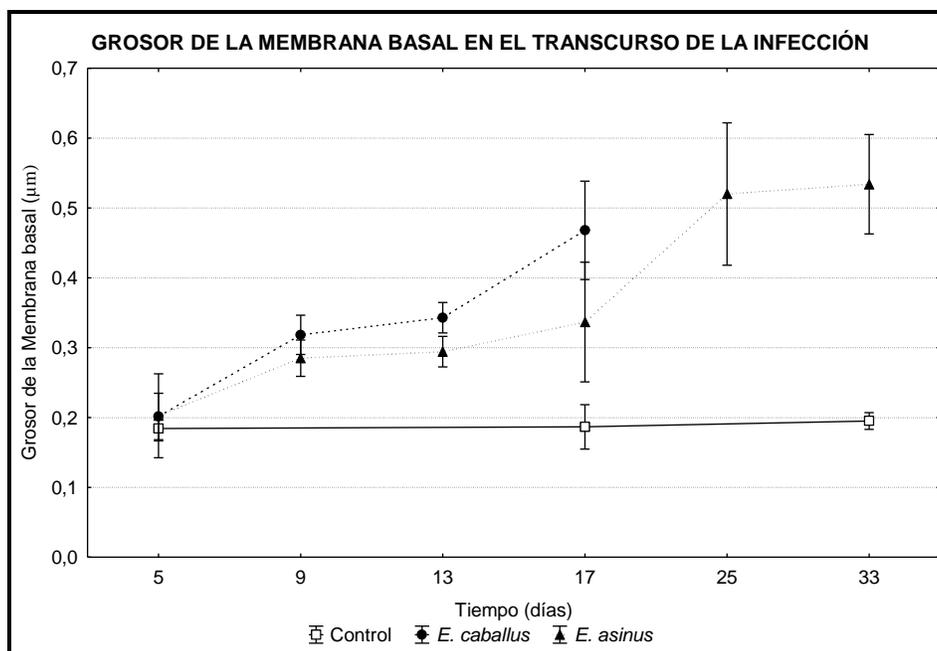


Figura 28. La gráfica indica en el eje Y las variaciones estimadas del promedio del Grosor de la Membrana basal del capilar (GM) en murinos infectados experimentalmente con *T. evansi*, en el transcurso del tiempo (eje X). Cada curva corresponde a un grupo experimental. La línea punteada y triángulos señala el curso y promedio interdiario de GM, en los animales infectados con *E. asinus*, la línea discontinua y círculos indican el curso y promedio de GM, en los animales infectados con *E. caballus* y la línea continua y cuadros muestra el comportamiento del grupo control. Las barras (ó bigotes) de cada promedio corresponden al error estándar asociado a cada media aritmética.

	Suma de cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrado medio	F	p
GRUPO EXPERIMENTAL	0,403811	2	0,201905	11,23560	0,000360
TIEMPO	0,115878	1	0,115878	9,876911	0,002567
GRUPO*DIÁ	0,207708	5	0,041542	3,540815	0,007020
Error	0,727396	62	0,011732		

Tabla 2. Resultados de ANOVA sobre los valores presentados en el gráfico correspondientes al grosor de la membrana basal de los capilares.

Área de los neumocitos I

Los resultados morfométricos obtenidos respecto al área de los neumocitos I sugieren que no existen mayores variaciones entre los grupos experimentales, a lo largo de la infección (Fig. 29). Efectivamente, los análisis de la varianza (Tabla 3) indican que no existe una discrepancia significativa entre los individuos infectados con *E. caballus* y *E. asinus* ($p=0,856$), ni cambios en esta variable a través del tiempo ($p=0,416$), así como en los valores interdiarios para cada aislado.

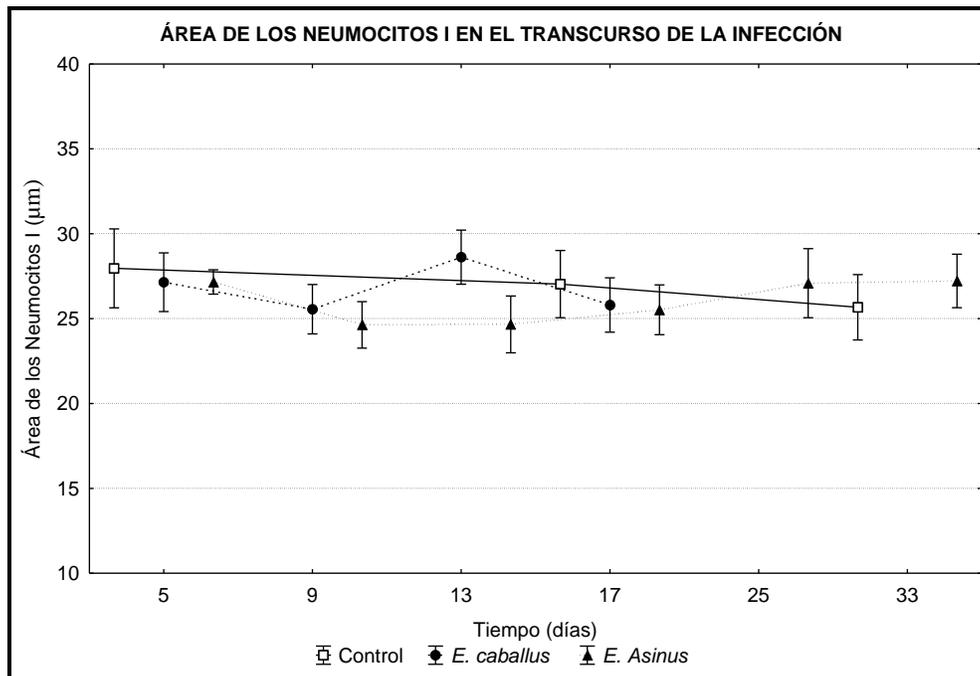


Figura 29. La gráfica indica en el eje Y las variaciones estimadas del promedio del área de los neumocitos I (AI) en murinos infectados experimentalmente con *T. evansi*, en el transcurso del tiempo (eje X). Cada curva corresponde a un grupo experimental. La línea punteada y triángulos señala el curso y promedio interdiario de AI, en los animales infectados con *E. asinus*, la línea discontinua y círculos indican el curso y promedio de AI, en los animales infectados con *E. caballus* y la línea continua y cuadros muestra el comportamiento del grupo control. Las barras (ó bigotes) de cada promedio corresponden al error estándar asociado a cada media aritmética.

	Suma de cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrados medios	F	p
GRUPOS	7,54	2	3,77	0,15	0,856
TIEMPO	122,38	5	24,48	1,01	0,416
GRUPO* DIA	85,06	10	8,51	0,35	0,964
Error	2844,06	117	24,31		

Tabla 3. Resultados de ANOVA sobre los valores presentados en el gráfico correspondientes al área de los neumocitos I

Área de los neumocitos II

La gráfica (Fig. 30) muestra que no existen variaciones en el área de los neumocitos II en el transcurso de la infección en ninguno de los grupos experimentales. Los resultados del análisis de la varianza (ANOVA) (Tabla 4) confirman este planteamiento, evidenciando que no existen cambios significativos ($p > 0,005$) en esta variable a lo largo de la infección para ninguno los dos aislados.

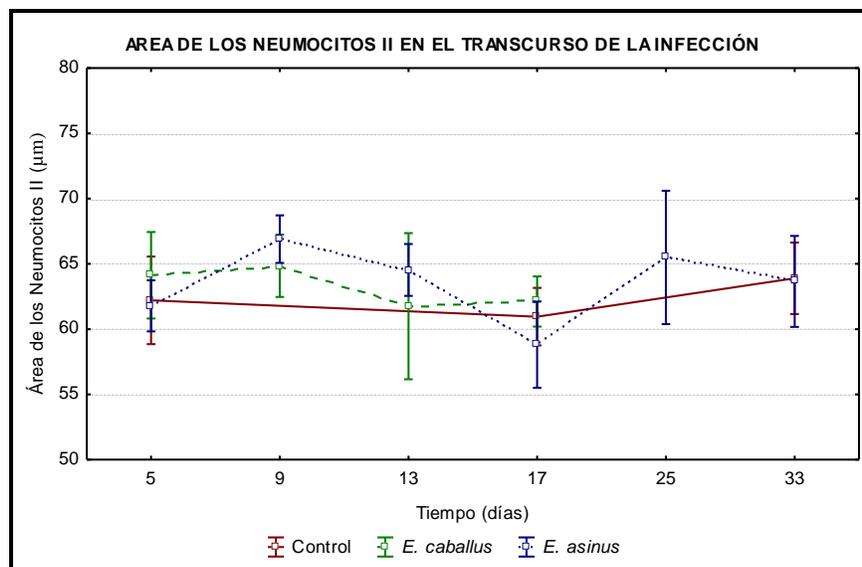


Figura 30. La gráfica indica en el eje Y las variaciones estimadas del promedio del área de los neumocitos II (AII) en murinos infectados experimentalmente con *T. evansi*, en el transcurso del tiempo (eje X). Cada curva corresponde a un grupo experimental. La línea punteada y triángulos señala el curso y promedio interdiario de AII, en los animales infectados con *E. asinus*, la línea discontinua y círculos indican el curso y promedio de AII, en los animales infectados con *E. caballus* y la línea continua y cuadros muestra el comportamiento del grupo control. Las barras (ó bigotes) de cada promedio corresponden al error estándar asociado a cada media aritmética.

	Suma de cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrado medio	F	p
GRUPO	103,3	2	51,6	0,903	0,408329
DIA	564,5	5	112,9	1,973	0,087695
GRUPO*DIA	500,8	10	50,1	0,875	0,558420
Error	6694,8	117	57,2		

Tabla 4. Resultados de ANOVA sobre los valores presentados en el gráfico correspondientes al área de los neumocitos tipo II

Área nuclear de los Neumocitos II

Los resultados obtenidos muestran que no se presentan variaciones importantes en el área nuclear de los neumocitos II a lo largo de la infección experimental en ninguno de los aislados (Fig. 31). Resultados que pueden corroborarse con el análisis de la varianza (ANOVA) donde se evidencia que no existen cambios significativos ($p > 0,005$) respecto al área nuclear de los Neumocitos II entre los aislados en el curso de la infección.

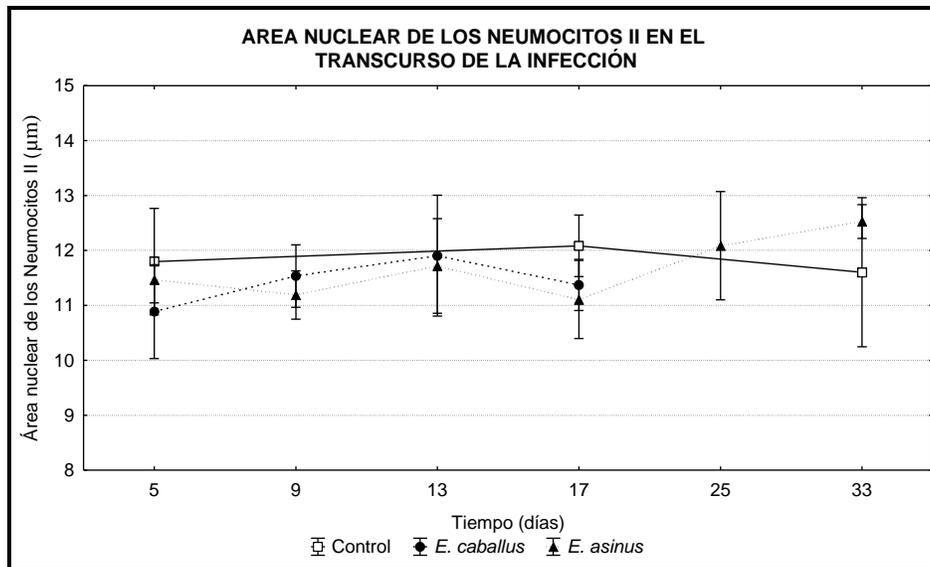


Figura 31. La gráfica indica en el eje Y las variaciones estimadas del promedio del área nuclear de los neumocitos II (AN) de en murinos infectados experimentalmente con *T. evansi*, en el transcurso del tiempo (eje X). Cada curva corresponde a un grupo experimental. La línea punteada y triángulos señala el curso y promedio interdiario de AN, en los animales infectados con *E. asinus*, la línea discontinua y círculos indican el curso y promedio de AN, en los animales infectados con *E. caballus* y la línea continua y cuadros muestra

el comportamiento del grupo control. Las barras (ó bigotes) de cada promedio corresponden al error estándar asociado a cada media aritmética.

	Suma de cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrado medio	F	p
GRUPO	10,09	2	5,04	1,309	0,274093
DIA	2,91	5	0,58	0,151	0,979430
GRUPO*DIA	23,35	10	2,34	0,606	0,806100
Error	450,82	117	3,85		

Tabla 5. Resultados de ANOVA sobre los valores presentados en el gráfico correspondientes al área nuclear de los neumocitos tipo II

Diámetro de los cuerpos laminares

La gráfica (Fig. 29) y los resultados del análisis de la varianza (ANOVA) (Tabla 3), evidencian que no existen diferencias significativas ($p > 0,05$) respecto al cambio en el diámetro de los cuerpos laminares de los neumocitos II a lo largo de la infección, así como entre los grupos experimentales.

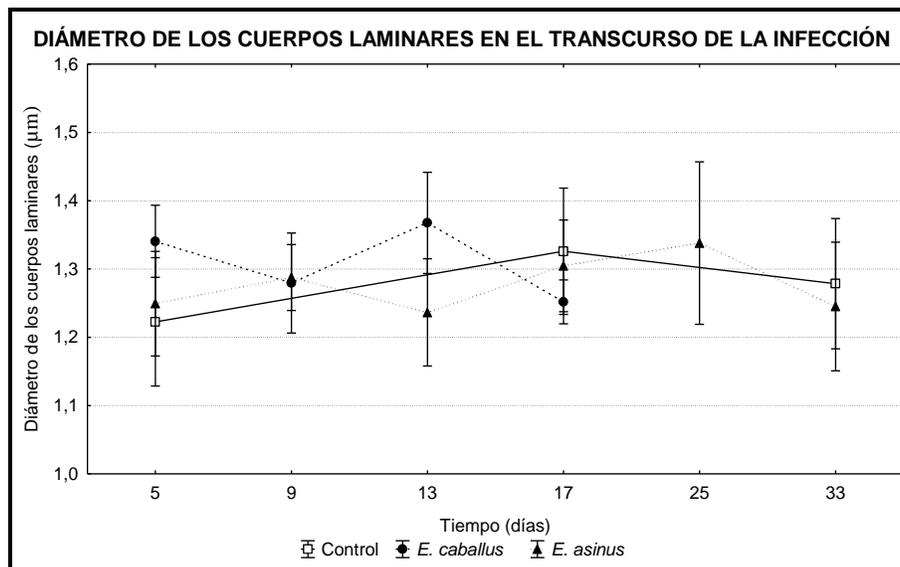


Figura 32. La gráfica indica en el eje Y las variaciones estimadas del promedio del diámetro de los cuerpos laminares de los neumocitos II (CL) de en murinos infectados experimentalmente con *T. evansi*, en el transcurso del tiempo (eje X). Cada curva corresponde a un grupo experimental. La línea punteada y triángulos señala el curso y promedio interdiario de CL, en los animales infectados con *E. asinus*, la línea discontinua y círculos indican el curso y promedio de CL, en los animales infectados con *E. caballus* y la

línea continua y cuadros muestra el comportamiento del grupo control. Las barras (ó bigotes) de cada promedio corresponden al error estándar asociado a cada media aritmética.

	Suma de cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrado medio	F	p
GRUPO	0,0002	2	0,0001	0,002	0,998240
DIA	0,1398	5	0,0280	0,617	0,686745
GRUPO*DIA	0,4409	10	0,0441	0,974	0,470254
Error	5,2987	117	0,0453		

Tabla 6.Resultados de ANOVA sobre los valores presentados en el gráfico correspondientes al diámetro de los cuerpos laminares de los neumocitos II.

Las infecciones causadas por *T. evansi* han sido observadas en numerosos hospedadores mamíferos (Losos, 1980; Nunes y col., 1993; Arias y col., 1997; Desquesnes, 2004, Desquesnes y col., 2008), presentando notables diferencias en cuanto a la patogenicidad y virulencia, según el aislado, la zona geográfica de origen y la especie de hospedador vertebrado involucrado (Hoare, 1972). En Venezuela, se han descrito variaciones patogénicas y parasitológicas en modelos murinos infectados con aislados del parásito provenientes de mamíferos venezolanos.(Perrone y col., 2006; Tejero y col., 2006; 2008).

Los resultados obtenidos en este estudio concuerdan con la afirmación anterior, mostrando diferencias importantes en la parasitemia y sobrevivencia, entre aislados venezolanos provenientes de *E. caballus* y *E. asinus* (Fig. 10). El aislado *E. caballus*, presenta siempre una mayor parasitemia y un aumento exponencial de la misma, mientras que *E. asinus* muestra una parasitemia menor, presentando fluctuaciones en la carga parasitaria a lo largo de la infección. La supervivencia de los ratones infectados consistió en 17 días, para *E. caballus* y 35 días para *E. asinus* (Fig. 11), pudiendo especular acerca de la diferencia en los patrones de virulencia de ambos aislados. Resultados similares han sido reportados por Perrone (2003), Tejero y col. (2006; 2008) y González (2010).

Esta heterogeneidad en la conducta parasitológica de los aislados ha sido atribuida por Dávila (1998), a las particularidades de los mecanismos de interacción parásito-hospedador, y asociada por Menezes y col. (2004) y Tejero y col. (2008) a la transformación de los tripomastigotes en relación a la ontogenia del parásito en el mamífero.

Normalmente en las infecciones de modelos murinos con *T. evansi*, la parasitemia aumenta progresivamente hasta la muerte de los animales, tal como se evidenció en el grupo experimental correspondiente al aislado *E. caballus* (Fig. 10). No obstante, se observó un comportamiento oscilatorio en la carga parasitaria de los individuos infectados con *E. asinus* (Fig. 10). Esta tendencia ha sido señalada por Roitt (1994), en grandes hospedadores mamíferos, como el producto de la variación antigénica expresada por los parásitos, cambio que les permite evadir la acción de los anticuerpos humorales del hospedador, por lo cual se infiere que los tripanosomas, al formar complejos antígeno – anticuerpo con los anticuerpos sintetizados, exponen una variante antigénica inicial, representada por una onda de parasitemia. Este complejo (tripanosoma-anticuerpo) es reconocido y progresivamente eliminado, razón por la cual la parasitemia tiende a disminuir, a pesar que algunos parásitos permanezcan viables, ya que habrían adquirido una nueva constitución antigénica. Los tripomastigotes de esta nueva variante, se multiplicarían hasta ser “neutralizados” por la respuesta primaria de los anticuerpos y, por ende, serían sustituidos por una tercera variante (Cross, 1996).

El peso corporal evidencia la condición física de los animales. Los resultados obtenidos, para ambos grupos experimentales, muestran una disminución del mismo en el progreso de la infección (Fig. 12). Resultados similares han sido reportados por otros autores en caballos, búfalos, cabras y ovejas infectadas con *T. evansi*, y vinculados a la pérdida de apetito asociada a la enfermedad (Damayanti, 1994; Desquesnes, 2004). En el modelo murino, González (2010) atribuye este hecho a la activación de fuentes energéticas alternas por parte del hospedador, como la liberación de ácidos grasos, debido a la pérdida

sustancial de glucosa plasmática. Cabe destacar que en términos energéticos, después de la glucosa, los lípidos son la principal fuente de energía para la célula (Michael y Cox, 2000).

Además del peso corporal, el hematocrito es un indicador clínico de anemia, que se usa en estudios de parasitología para evaluar cambios en la química sanguínea del hospedador. En el curso de la infección experimental, se aprecia una tendencia general al descenso de los valores de hematocrito (Fig. 13), revelando que la presencia del parásito disminuye el número de eritrocitos, tal como lo plantean García y col. (2009) en ovejos infectados experimentalmente con *T. vivax*, un parásito filogenéticamente cercano a *T. evansi*. Babatunde y col. (1982), describen complejos inmunes sobre la membrana plasmática de los eritrocitos de animales infectados experimentalmente con *T. evansi*. Tales complejos, serían capaces de fijar el complemento, desatando hemólisis eritrocitaria o activación del sistema mononuclear, lo que favorecería la eritrofagocitosis. Este planteamiento sugeriría que la anemia observada es de tipo autoinmune. Sin embargo, es importante destacar que la patogénesis de la anemia es un cuadro multifactorial complejo que, según el estado de desarrollo de la infección, puede deberse a la hemólisis, a lisis eritrocitaria, a eritrofagocitosis por acción de macrófagos mononucleares y/o hipervolemia por aumento del volumen plasmático (Babatunde y col., 1982).

Además de alteraciones en la química sanguínea, los tripanosomas provocan lesiones anatomopatológicas importantes en sus hospedadores, entre las que se destacan, enfisema, edema y congestión pulmonar (Damayanti y col., 1994; Audu y col., 1999; Biswas y col., 2001; Dargantes y col., 2005). Sin embargo no se han descrito cambios ultraestructurales en este tipo de tejido, así como el progreso de estas alteraciones a lo largo de la infección.

En el pulmón se llevan a cabo los procesos de intercambio gaseoso, que conllevan al suministro de oxígeno en todos los grupos celulares del organismo (Muñoz y García, 1997). De esta forma, se hace evidente el papel de la gran vascularización en este órgano. Por lo tanto, es lógico suponer que alteraciones en el sistema circulatorio por efecto del parásito estén vinculadas a daños en el tejido pulmonar y cambios histopatológicos a este nivel, tal como lo describen Cadioli y col., (2006) al reportar congestión pulmonar en asnos infectados experimentalmente con *T. evansi*.

Los resultados obtenidos en cuanto a cambios histopatológicos, que incluyen el aumento de espacios alveolares, en ambos grupos experimentales infectados (Fig. 15), corresponden en gran medida con los reportados por Damayanti y col. (1994) y Herrera y col. (2002), quienes manifiestan haber encontrado áreas focales de enfisema en pulmones de búfalos y coatíes infectados experimentalmente.

Tales alteraciones requieren un análisis morfométrico que permita corroborar los cambios observados. Efectivamente, los resultados estadísticos confirman este aumento, mostrando diferencias significativas ($p=1 \times 10^{-7}$) entre los individuos infectados y los no infectados (Tabla 1), así como entre los aislados de *T. evansi* utilizados (Fig. 27) respecto al espacio alveolar.

El enfisema pulmonar implica exceso de aire en los pulmones, se usa habitualmente para describir al proceso obstructivo o destructivo de estos órganos y evidencia un daño en los tabiques alveolares (Guyton y Hall, 2006), tal como se observa en los resultados presentados (Fig. 15). Algunos autores atribuyen estas alteraciones al desarrollo

inflamatorio desencadenado por la presencia del parásito (Damayanti y col., 1999; Biswas y col., 2001).

En este estudio se describen cambios ultraestructurales del tejido pulmonar de ratones en el transcurso de una infección experimental, simulando dentro de lo posible las condiciones naturales de inoculación del parásito, siendo la presencia de infiltrado celular el posible factor con mayor influencia en la ruptura alveolar.

Particularmente, en las infecciones por *T. evansi* las células del sistema inmunológico tienen gran importancia, pues el parásito implica un componente inmunológico. Las células que forman parte de la defensa del individuo migrarán hacia los tejidos a través del sistema vascular, con el fin de proteger al organismo del antígeno, en este caso los tripomastigotes en sangre.

En el pulmón, la acumulación de células inmunitarias, conlleva a una patología denominada neumonía, la cual implica un desarrollo inflamatorio del pulmón en el que algunos o todos los alveolos están llenos de líquido y células sanguíneas provenientes del sistema inmunológico, esto genera una disminución en la eficiencia del intercambio gaseoso (Guyton y Hall, 2006). Por tal motivo se consideró la presencia de infiltrado celular observado en las micrografías (Fig. 21b y 27b) como un factor primordial, tomando en cuenta referencias previas que describen neumonía, en enfermedades infecciosas causadas por otros tripanosomatídeos como *T. cruzi* (Diego y col., 1998; Melnikov y col., 2005) y *Leishmania chagasi* (Alves y col., 2010), donde se destaca una respuesta inflamatoria incrementada, caracterizada principalmente por células mononucleares y macrófagos. Asimismo, Damayanti y col. (1994); Biswas y col. (2001) y Dargantes y col. (2005),

reportan gran cantidad de células inmunológicas en el tejido pulmonar que conllevan a daño tisular en infecciones experimentales con *T. evansi*

El aumento del desarrollo inflamatorio, en ambos aislados, se observó hacia los últimos días de infección, mostrando neutrófilos (Fig. 21b) y macrófagos (Fig. 27b). Esto sugiere una acumulación de células del sistema inmune en el transcurso de la enfermedad que traen como consecuencia una lesión pulmonar severa.

Alves y col. (2010), proponen una explicación al aumento de los espacios alveolares en las infecciones de perros con un tripanosomatídeo (*Leishmania chagasi*), sugiriendo que el infiltrado inflamatorio tiene un efecto importante en la patogénesis de la lesión, por cuanto la presencia del parásito en el lecho capilar pulmonar genera una estimulación antigénica continua.

Los macrófagos alveolares, forman parte de los tipos celulares característicos del pulmón, estos fagocitan las partículas que ingresan y activan otras células del sistema inmune a través de la secreción de citoquinas (Tizard, 2009).

El papel de los macrófagos alveolares parece ser esencial en el desarrollo de las lesiones y su estimulación constante conlleva a daño tisular por hiperactividad de la células (Alves y col., 2010). Asimismo, el infiltrado inflamatorio conlleva al engrosamiento de algunos tabiques, debido a la migración de células sanguíneas hacia el tejido (Biswas y col., 2001; Dargantes y col., 2005; Melnikov y col., 2005).

Los macrófagos fagocitan también parte del surfactante producido por los neumocitos II, con el fin de evitar la acumulación excesiva de éste en los alvéolos. Así, conociendo que las

funciones del surfactante pulmonar son: la prevención del colapso alveolar y la disminución del trabajo de insuflación pulmonar, a través de la reducción de la tensión superficial de las moléculas de agua en la superficie luminal de las células alveolares (Canby, 2007); es posible suponer que el aumento descrito en la población de macrófagos implica también una disminución en la cantidad de surfactante, lo cual a juzgar por sus funciones, conlleva a un aumento en la tensión superficial entre los tabiques, generando el colapso alveolar observado en esta investigación y reportado en estudios histopatológicos anteriores (Biswas y col., 2001; Dargantes y col., 2005; Melnikov y col., 2005; Alves y col., 2010).

La causa fundamental de la respuesta inmune provocada en el tejido pulmonar se hace evidente, al observar los parásitos, tanto en el aislado *E. caballus* (Fig. 19a, 20a, 21a) como en *E. asinus* (Fig. 24a, 24b, 25a, 27a), donde a pesar de no encontrar tripomastigotes en el tejido, se aprecian en días de alta parasitemia en el sistema vascular y es posible distinguir su estructura, de la misma manera que ha sido observado en el sistema vascular de otros tejidos (Rossi y col. 2008; Tejero y col., 2009).

Entre las alteraciones observadas a nivel ultraestructural, se puede destacar la edematización de retículo endoplasmático (Fig. 25b), lo cual ha sido descrito en otros tejidos. Al respecto, Finol y col. (2001) reportan retículo endoplasmático edematizado en musculo esquelético de ratones infectados experimentalmente con *T. evansi*. Soulsby (1987) señala que el hinchamiento de las cisternas del retículo endoplasmático no está relacionado con un aumento en la actividad, sino que podría deberse a sustancias tóxicas. Es oportuno recordar que la presencia del parásito en el sistema vascular genera en cierta forma sustancias ajenas al organismo, que podrían considerarse “toxinas”. Estos compuestos

pueden ser biotransformados y reaccionar con ácidos grasos no saturados de lípidos de membrana, desencadenando tumefacción en del retículo endoplasmático (Soulsby, 1987).

Notables cambios ultraestructurales fueron observados en los capilares del tejido pulmonar, similares para ambos grupos experimentales, los cuales son atribuidos a la presencia del parásito y sus actividades metabólicas, que conllevan a un mecanismo de hipoxia inducido por el parásito, debido probablemente al daño de hematíes y acción de toxinas parasíticas, descrito anteriormente en musculo cardíaco de ratones infectados experimentalmente con *T. evansi*. (Tejero y col., 2010).

Algunos de los cambios observados incluyen la formación de prolongaciones endoteliales hacia la luz (Fig. 20a y 25a), engrosamiento de la pared endotelial (Fig. 21a y 24b) y la membrana basal (Fig. 19a, 19b, 20a, 20b, 21a, 24a, 24b, 26a, 26b, 27a y 27b). Tales alteraciones han sido relacionadas con distintas patologías causadas por *T. evansi* (Rossi y col., 1999; Finol y col., 2001, Tejero y col., 2009; Tejero y col., 2010), así como por otros protozoarios. Bruzual y col, (1999), reportan anomalías similares en capilares del musculo esquelético de ratones infectados con *Toxoplasma gondii*.

El aumento del grosor de la membrana basal del capilar fue corroborado por métodos estadísticos a través del análisis de la varianza de los valores correspondientes al grosor de la misma para cada grupo experimental, encontrando diferencias significativas entre los aislados y el control ($p=0,003$), así como el incremento a lo largo de la infección ($p=0,002$), en concordancia con los resultados cualitativos.

Adicionalmente, se presenta una disminución en el número de caveolas y vesículas pinocíticas en el endotelio vascular (Fig.19a, 20a, 21a, 24a, 25a y 27b), hacia los últimos

días de la infección experimental, en concordancia con lo planteado por Tejero y col. (2010), quienes sugieren que el daño vascular y hemático, incluyendo la pérdida de caveolas, puede ser atribuido a la acción de enzimas proteolíticas secretadas por el parásito y catabolitos parasíticos tóxicos desconocidos.

Las caveolas son abundantes en células endoteliales y neumocitos tipo I, dos constituyentes mayoritarios de los alveolos, por lo que son fácilmente identificables en los análisis ultraestructurales de tejido pulmonar. El hecho de que las caveolas incrementen en la superficie celular, sugiere que las mismas están implicadas en procesos de transporte macromolecular (Gómez, 2009).

Partiendo de este planteamiento, es posible suponer que una disminución en la cantidad de caveolas como la observada en esta investigación, implica un efecto negativo en el traslado de macromoléculas. En este sentido, Tejero y col. (2010) lo vinculan al proceso hipóxico generado por los tripomastigotes en el sistema vascular.

El tejido pulmonar se encuentra formado, en su mayoría, por Neumocitos tipo I y II. Los primeros constituyen un revestimiento alveolar y su morfología permite la eficiencia del intercambio gaseoso. Los segundos, no se encuentran vinculados directamente a este proceso, sin embargo, son los responsables de producir el agente tensioactivo pulmonar o surfactante, cuyas funciones ya fueron mencionadas (Reyes y Aristizábal, 2006).

Particularmente, en este estudio, las micrografías que muestran neumocitos tipo I (Fig. 18b, 19a, 22b, 23a y 26b) y neumocitos tipo II (Fig. 18b, 21a, 21b, 22a, 23b, 25a y 27a) , tanto del aislado *E.caballus* como *E. asinus* no evidencian cambios perceptibles, en cuanto a su morfología y estructura en el transcurso de la infección. Cuantitativamente tampoco

presentan diferencias estadísticamente significativas respecto al tamaño de los mismos. Esto puede ser atribuido al hecho que el daño pulmonar comprende, en esencia, el colapso de los alveolos por los factores vasculares e inflamatorios descritos. No obstante, se observó la separación de una célula alveolar I (Fig. 23a) del tejido, lo cual puede atribuirse a daño mecánico producto del procesamiento de la muestra. Según nuestro conocimiento, no han sido descritos daños en células alveolares I y II en infecciones experimentales con tripanosomatídeos.

Las diferencias observadas entre los animales infectados con los aislados procedentes de *E. caballus* y *E. asinus*, en cuanto a las alteraciones ultraestructurales, se restringen al tiempo en el cual comienzan hacerse notables, mientras que los daños tisulares y celulares son similares. Por lo cual puede establecerse una diferencia en la virulencia o infectividad de los aislados, tomando en cuenta las variables parasitológicas, en concordancia con lo propuesto por Tejero y col. (2008). Es importante acotar que la infectividad ha sido definida por Losos (1980), como la habilidad de los tripanosomas para invadir y multiplicarse en un hospedador, siendo el primer criterio usado para describir la interacción entre tripanosomas patógenos y sus hospedadores. El aislado *E. caballus*, presenta una mayor infectividad, respecto al aislado *E. asinus*, y los individuos infectados con éste presentan, según los resultados obtenidos, alteraciones en etapas más tempranas de la infección, así como un desarrollo inflamatorio mayor, diferencias que han sido descritas anteriormente y que son atribuidas a la heterogeneidad de los aislados, según lo propuesto por, Perrone (2003), Tejero y col. (2008) y González (2010).

- Existe correspondencia entre la parasitemia y las alteraciones ultraestructurales observadas para los individuos infectados con ambos aislados, evidenciándose con mayor notoriedad en el progreso de la infección.
- En todos los casos se apreció una disminución de peso corporal y hematocrito, que evidencia la condición física y cambios en la química sanguínea de los roedores infectados.
- Se observó la presencia de tripomastigotes en el lecho capilar pulmonar de los animales infectados con los aislados *E. caballus* y *E. asinus* de *T. evansi*.
- Las infecciones en modelos murinos, con cada uno de los aislados venezolanos de *T. evansi*, conllevan a un daño histopatológico en el tejido pulmonar, evidenciando la ruptura de los tabiques interalveolares y áreas de enfisema.
- No se detectó cambios ultraestructurales en las células alveolares I y II, a lo largo de la infección experimental, de los individuos infectados con cada uno de los aislados.
- Se observó alteraciones ultraestructurales en la microvasculatura pulmonar en el transcurso de la infección experimental con cada uno de los aislados, que incluyen el engrosamiento de la membrana basal capilar, prolongaciones endoteliales hacia la luz y disminución de caveolas.

- En los animales infectados con el aislado *E. caballus* y *E. asinus* de *T. evansi*, se evidenció un aumento en el infiltrado celular hacia el tejido pulmonar, trayendo como consecuencia el aumento de los espacios alveolares.
- Existen variaciones en el comportamiento parasitológico y sobrevivencia de cada uno de los aislados en los modelos murinos, así como en el tiempo en el cual comienzan a ser apreciables los cambios ultraestructurales. No obstante, las alteraciones observadas a nivel tisular y celular son similares para cada grupo experimental infectado.

Alves, G., Pinho, F., Silva, S., Cruz, M. y Costa, F. 2010. Cardiac and pulmonary alterations in symptomatic and asymptomatic dogs infected naturally with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Braz J. Med Biol Res*, **43(3)**: 310-315.

Arborgh, B., Bell, P., Brunk, U., Collins, V.P. 1976. The osmotic effect of glutaraldehyde during fixation. A transmission electron microscopy, scanning electron microscopy and cytochemical study. *J. Ultra. Mol. Struct. R.* **56**: 339-350.

Arias, J., García, F. Rivera, M., López, R. 1997. *Trypanosoma evansi* in capibara from Venezuela. *Journal of Wildlife Disease*, **33**: 359-361.

Audu, P.A., Esievo, K.A., Mohammed, G. y Ajanusi, O.J. 1999. Studies of infectivity and pathogenicity of an isolate of *Trypanosoma evansi* in Yankasa sheep. *Vet. Parasitol.* **86**:185-190.

Babatunde, A., Allen C. y Hannah, L. 1982 Pathogenesis of anemia in *Trypanosoma brucei*-infected mice. *Infection and immunity.* **36**: 1060-1068

Biswas, D., Choudhury, A., Misra, K.K. 2001. Histopathology of *Trypanosoma (Trypanozoon) evansi* infection in bandicoot rat. I. Visceral organs. *Exp. Parasitol.* **99**:148-159.

Bozzola, J.J., Russell, L.D. 1992. Electron Microscopy. Specimen staining and contrast methods for transmission electron microscopy. Lones & Bartlett Publishers: Sudbury.

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

Brun, R., Hecker, H., Lun, Z-R. 1998. *Trypanosoma evansi* and *T. equiperdum*: distribution, biology, treatment and phylogenetic relationship (a review). *Vet. Parasitol.* **2**: 95-107.

Bruzual, E., Finol, H., Arcay, L. 1999. Alteraciones ultraestructurales del musculo esquelético de ratones parasitados con una cepa considerada no patógena de *Toxoplasma gondii*. *Acta Biol. Venez.*, **19(1)**: 11-16.

- Cadioli, F., Marques, L., Machado, R., Alessi, A. Aquino, L., Barnabé, P. 2006. Experimental *Trypanosoma evansi* infection in donkeys: hematological, biochemical and histopathological changes. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, **58(5)**: 749-756.
- Camargo, E.R., Uzcanga, G.L., Bubis, J. 2004. Isolation of two antigens from *Trypanosoma evansi* that are responsible for its cross-reactivity with *Trypanosoma vivax*. *Vet. Parasitol.* **13**: 67-81.
- Canby, C. 2007. Anatomía basada en la resolución de problemas. Elsevier Saunders.
- Corliss, J.O. 1994. An interim utilitarian (“user-friendly”) hierarchical classification and characterization of the protists. *Acta Protozool.* **33**: 1-51.
- Cross, G.A. (1996). Antigenic variation in trypanosomas secret surface slowly. *Bioessays.* **18**: 283-291.
- Damayanti, R., Graydon, R.J., Ladds, P.W. 1999. The pathology of experimental *Trypanosoma evansi* infection in the Indonesian buffalo (*Bubalus bubalis*). *J. Com. Pathol.* **110**:237-252.
- Dargantes, A., Campbell, R., Copeman, D., Reid, S. 2005. Experimental *Trypanosoma evansi* infection in the goat. II. Pathology. *J. Comp. Pathol.* **133**: 267-276.
- Dávila, A.M.R., Ramirez, L., Silava, R.A.M.S. 1998. Biometrical alterations of *Trypanosoma evansi* isolate in laboratory rodents. *Vet.y Parasitology*, **76**: 149-152.
- Desquesnes M. 2004. Livestock Trypanosomoses and Their Vectors in Latin America. World Organization for Animal Health. Paris, Francia.
- Desquesnes, M., Bossard, G., Patrel, D., Herder, S., Patout, O., Lepetitcolin, E., Thevenon y col. 2008. First report of a *Trypanosoma evansi* outbreak in camels in metropolitan France. *Vet. Rec.* **162**: 750-752.
- Dia M.L., Diop C., Aminetou M., Jacquiet P., Thiam A. 1997. Some factors affecting the prevalence of *Trypanosoma evansi* of camels in Mauritania. *Vet. Parasitol.* **72**: 111-120
- Diego, J., Palau, M., Gamallo, C. y Penin, P. 1998. Relationships between histopathological findings and phylogenetic divergence in *Trypanosoma cruzi*. *Trop. Med. Int. Health.* **3(3)**:222–233.

Dobson, R., Dargantes, A., Mercado, R., Reid, S. 2009. Models for *Trypanosoma evansi* (surra), its control and economic impact on small-hold livestock owners in the Philippines. *Int. J. Parasitol.* **39**: 1115–1123.

Finol H., Boada-Sucre A., Rossi M., Tejero F. 2001. Skeletal muscle ultrastructural pathology in mice infected with *Trypanosoma evansi*. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* **33(1-2)**:65-71.

García, H., Rangel-Rivas, A., Contreras, I., García, M., García, F. y Perrone, T. (2009). Caracterización molecular de *Trypanosoma vivax* en ovinos naturalmente infectados en dos hatos de los municipios San Fernando y Biruaca, estado Apure, Venezuela. *Revista Científica, FCV-LUZ / Vol. XIX, N° 3, 230 – 237.*

Gardiner, C.H., Fayer, R., Dubey, J.P. 1988. An atlas of protozoan parasites in animal tissues. U.S. Department of Agriculture Handbook #651. Washington D.C.

Garrido, L., Gledhill, T., Fuentes, Z., Roa, J., Suarez, R., Tamayo, G. 2003. Bronquiolitis Respiratoria como causa de Fibrosis Pulmonar (Br-Fp): Estudio Histopatológico y Ultraestructural de tres casos. *RFM, Caracas*, **26(2)**: 112-115.

Gibson, W.C., Parr, C.W., Swinglehurst, C.A., Welch, S.G. 1978. A comparison of the isoenzymes, soluble proteins, polypeptides and free aminoacids from isolates of *Trypanosoma evansi*. *Comp. Biochem. and Physiol.* **60B**: 137-142.

Gómez, J. 2009. Efectos de los isómeros del resveratrol sobre la homeostasis del calcio y del óxido nítrico en células vasculares. Tesis Doctoral. Universidad de Santiago de Compostela.

González, E., González, B. Gonzalez, R., Linares, N., Mijares, A., Perrone, T., Mendoza, M. 2006. Estandarización de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa para el diagnóstico de la tripanosomosis animal causada por *Trypanosoma evansi*. *Agronomía Trop.* **56(4)**: 495-499.

González, R. 2010. Aproximación cuantitativa al análisis de la heterogeneidad de aislados venezolanos de *Trypanosoma evansi*. Tesis Doctoral en ciencias, Mención Zoología. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.

Greep, R. & Weiss, L. 1973. Histology. Third Edition, McGraw-Hill Book Company, New York.

Gutierrez, C., Montoya, J.A., Padron, M., Corbera, J.A., Juste, M.C., Molina, J.M. 1998. Descripción de un caso de Tripanosomosis en el dromedario por *T. evansi* en Canarias. *Med. Vet.***15**: 356–357.

Gutierrez, R.O. 1958. El mal de caderas de los equinos. *Revista de Investigaciones ganaderas*, **4**: 177.

Guyton, A., Hall, J. 2006. Tratado de Fisiología Médica (11 ed.). Philadelphia: Elsevier Saunders. Madrid.

Herrera, H. M., Alessi, A. C., Marques, L. C., Santana, A. E., Aquino, L., Menezes, R., Moraes, M. y col. 2002. Experimental *Trypanosoma evansi* infection in South American coati (*Nasua nasua*): hematological, biochemical and histopathological changes. *Acta Trop.***81**: 203–210.

Herrera, H.M., Dávila, A.M., Norek, A., Abreu, U.G., Souza, S.S., Jansen, A.M. 2004. Enzootiology of *Trypanosoma evansi* in Pantanal, Brazil. *Vet. Parasitol.***125**: 263-275.

Hib, J., Di Fiore, M. 2001. Histología de Di Fiore: Texto y Atlas. 1ª Edición. Editorial El Ateneo. Buenos Aires.

Hoare, C. A. 1956. Morphological and taxonomic studies on mammalian trypanosomes. VIII. Revision of *Trypanosoma evansi*. *Parasitology*, **46**: 130-172.

Hoare, C. A. 1964. Morphological and taxonomic studies on mammalian trypanosomes. X. Revision of the systematics. *J. Protozool*, **11**: 200-207.

Hoare, C. A. 1972. The Trypanosomes of Mammals. A Zoological Monograph. Blackwell Scientific Publications: Oxford.

Holland, W. 2003. The diagnosis of *trypanosoma evansi* and its immunosuppressive effect in water buffaloes and pigs. Tesis Doctoral. Universidad de Gante. Gante, Bélgica.

Jittapalapong, S., Pinyopanuwat, N., Inpankaew, T., Sangvaranond, A., Phasuk, C., Chimnoi, W., Kengradomkij, C. y col. 2009. Prevalence of *Trypanosoma evansi* Infection Causing Abortion in Dairy Cows in Central Thailand. *Kasetsart J. (Nat. Sci.)***43**: 53 – 57.

Joshi, P., Shegokar, V., Powar, R., Herder, S., Katti, R., Salkar, H., Dani, V., Bhargava, A., Jannin, J., Truc, P. 2005. Human trypanosomiasis caused by *Trypanosoma evansi* in India: the first case report. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **73**(3): 491–495

Kubes, V. 1939. Estudio acerca de la anemia infecciosa de los equinos en la América del Sur. Su presencia en Venezuela y confusión con la tripanosomiasis caballar. Las llamadas pestes bobas y derrengadera. Ministerio de Agricultura y Cría: Caracas.

Leeson, C. R., Leeson, T.S., Paparo, A.A. (1987). Histología. 5ª Edición. Editorial Interamericana. México.

Losos, G.J. 1980. Diseases caused by *Trypanosoma evansi*, a review. *Vet. Res. Commun.*, **4**: 165-181.

Luckins, A.G. 1988. *Trypanosoma evansi* in Asia. *Parasitol. Today*.**5**: 137-142.

Luft, J. H. 1961. Improvements in epoxy resin embedding methods. *J. Biophys. Biochem. Cy.* **9**: 409-414.

Mahmoud, M.M., Gray, A.R. 1980. Trypanosomiasis due to *Trypanosoma evansi* (Steel, 1885) Balbiani 1888. A review of recent research. *Trop. Anim. Health Pro.***12**: 35-47.

Marrero, F., Roschman-González, A., Finol, H.J., Boada-Sucre, A., Tejero, F. 2009. Descripción morfométrica y ultraestructural de cortes de pulmón en ratones infectados experimentalmente con *Trypanosoma evansi*. *Acta Odontológica Venezolana*, **47**(4): 30

Melnikov, V., Velasco, F., Espinoza, F., Guzman, F., Dobrovinskaya, O. 2005. Pathologic changes in lungs caused by mexican isolates of *trypanosoma cruzi* in the acute phase of infection in mice. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **73**(2); 301–306.

Menezes, V., Queiroz, A., Gomes, M., Marques, M. y Jansen, A. 2004. *Trypanosoma evansi* in inbred and Swiss-Webster mice: distinct aspects of pathogenesis. *Parasitol. Res.***94**: 193- 200.

Millonig, G.A. 1961. Advantages of a phosphate buffer for OsO₄ solutions in fixation. *J. App. Physiol.***32**: 1637.

Milton, J.S. 2001. Estadística para Biología y Ciencias de la salud. Mc Graw-Hill Internamericana, Madrid.

Muñoz, J. y García. X. 1997. Fisiología: células, órganos y sistemas. 1ª edición. Fondo de cultura económica, D.F., México.

Nunes V., Oshiro E., Dorval M., Garcia L., Silva A., Bogliolo A. 1993. Investigaçãõ epidemiolõgica sobre Trypanosoma (Trypanozoon) evansi no pantanal sul-mato-grossense. Estudo de reservatõrios. *Ver. Bras. Parasito.* **12**: 41-44.

Perrone, T. 2003. Tipificaci3n de aislados venezolanos de *Trypanosoma evansi*. Tesis doctoral. Universidad Sim3n Bol3var. Caracas, Venezuela.

Ram3rez, L., D3vila A. M., Victorio, A. M., Silva R. A., Trajano, V., Jansen, A. M. 1997. Measurements of *Trypanosoma evansi* from the Pantanal. *Mem. I. Oswaldo Cruz* **92**(4): 483-484.

Randall, d., Burggren, w. y French, K. 1998. Fisiolog3a animal. Mecanismos y Adaptaciones (Eckert). 4ª Edici3n. Editorial MacGraw-Hill. Interamericana. Madrid.

Rangel, R. 1905. Nota preliminar sobre la peste boba y la derrengadera de los 3quidos de los llanos de Venezuela (tripanosomiasis). *Gac. Med. Car.*, **12**: 105-112.

Reyes, M. y Aristiz3bal, G. 2006. Neumolog3a Pediatrica: Infecci3n, Alergia y enfermedad respiratoria en el niõo. 5ta edici3n. Editorial M3dica Panamericana. Bogot3.

Reynolds, E. S. 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.* **17**: 208-212.

Roberts, L.S., Janovy, J. 2000. Foundations of Parasitology. McGraw-Hill: Boston.

Roitt, I. 1994. Essential immunology. 8th ed. Blackwell Scientific Publications.

Rossi, M., Boada-Sucre, A.A., Hern3ndez, G., Bello, B., Finol, H.J., Payares-Trujillo, G., Aso, P.M. 2008. An3lisis ultraestructural del h3gado en ratones infectados experimentalmente con un aislado venezolano del *Trypanosoma evansi* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). *Acta Microsc3pica.* **17**(2): 5-12.

Rossi, M., Boada-Sucre, A., Finol, H.J., Tejero, F., Bello, B., Aso, P.M. y Hernandez, G. 1999. Itraestructural alterations in the adrenal gland cortex of mice experimentally infected with a Venezuelan isolate of *Trypanosoma evansi*. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* **31**(4):509-13.

Soulsby, E.J. 1987. Parasitología y enfermedades parasitarias de los animales domésticos. Nueva Interamericana, México, D.F.

Stevens, A., Lowes, J., 2006. Histología Humana. Elsevier España. 3era Edición. Madrid, España.

Tejero, F., Roschman-González, A., Perrone-Carmona, T.M., Aso, P.M. 2008. Trypanosoma evansi: A quantitative approach to the understanding of the morphometry-hematology relationship throughout experimental murine infections. *J. Protozool. Res.* **18**: 34-47

Tejero, F., Brun, S., Roschman-gonzález, A., Velazco, E., Aso, P., Finol, H. 2009. Ultraestructura renal en infecciones murinas experimentales con un aislado venezolano de Trypanosoma evansi. *Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel*, **40(2)**: 44-49.

Tejero, F., Arias-Mota, L., Roschman-González, A., Aso, P. y Finol, H. 2010. Trypanosoma evansi: Ultraestructural cardiac muscle and cardiac microvasculature changes in experimental murine infections. *Acta Scien. Vet.***38(3)**: 279-285.

Tizard, I. 2009. Inmunología Veterinaria. 8ª Edición. Elsevier Saunders. Barcelona, España.

Vickerman, K. 1977. The diskynetoplasty mutation in Trypanosoma evansi and other flagellates. *Protozoology*, 3: 57-69.

Watson, M. L. 1958. Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals. *J. Biophys. Biochem. Cy.* **4**: 475-481.

Welsch, U. y Sobotta, J. 2009. Histología. 2ª Edición. Editorial Médica Panamericana. Madrid, España.

Woo, P.T. 1969. The haematocrit centrifuge for the detection of trypanosomes in blood. *Can J Zool.***47(5)**: 921-3

Consultas en línea:

<http://www.testudines.org/Articulos/Apendices-y-Glosarios/Ecologia-Botanica-Edafologia/Ecozonas.aspx> [Consulta: 04 de Febrero de 2011]

<http://cuerpohumanocuerpo.blogspot.com/2009/03/dibujo-de-los-pulmones.html> [Consultada 09 de Febrero de 2011]

<http://www.flickr.com/photos/11052268@N03/1033197410/> [Consultada el 02 de noviembre de 2010]