

**AVANCES EN LA CARACTERIZACION DE BIODEMES DE *TRYPANOSOMA*
(*SCHIZOTRYPANUM*) *CRUZI* AISLADO DE URBANIZACIONES Y PARQUES
RECREACIONALES DEL VALLE DE CARACAS (VENEZUELA).**

**PROGRESS IN THE CHARACTERIZATION OF BIODEMES OF *TRYPANOSOMA*
(*SCHIZOTRYPANUM*) *CRUZI* ISOLATED IN RESIDENTIAL ZONES AND
RECREATIONAL PARKS OF CARACAS VALLEY (VENEZUELA).**

Leidi Herrera y Servio Urdaneta-Morales

Laboratorio de Biología de *Trypanosoma* de mamíferos, Instituto de Zoología Tropical, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela, Apartado 47058, Los Chaguaramos, Caracas 1041-A, Venezuela. Autor para correspondencia: surdanet@strix.ciens.ucv.ve

RESUMEN

Intentamos precisar el Biodeme que incluya los aislados de *Trypanosoma cruzi* obtenidos de vectores y reservorios capturados en urbanizaciones y parques de Caracas. Inoculamos ip en ratones NMRI (15 gr prom) 70 metacíclicos/gr provenientes de: 1. *Rhodnius prolixus* usados para xenodiagnósticos de *Didelphis marsupialis* (rabipelado) y de *Rattus rattus* (rata casera) naturalmente infectados y de ratones infectados con heces de *Panstrongylus geniculatus*; 2. Fluido de glándulas anales (odoríferas) de rabipelados parasitados. Parasitemias cortas (5-15 días), con prevalencia de tripomastigotes rechonchos en niveles muy bajos ($0.06-6 \times 10^5$ tripomastigotes/ml), produjeron marcado miotropismo cardíaco y esquelético y 100% de mortalidad. Estos resultados muestran características comunes a los Biodemes II y III propuestos por la Escuela de Andrade. Organos poco estudiados (páncreas y urogenitales) fueron frecuentemente invadidos. Se plantea la importancia de estos hallazgos relacionándolos con el origen de los aislados (vectores capturados en viviendas de urbanizaciones y reservorios sinantrópicos del peridomicilio y de parques recreacionales) cuyo riesgo potencial para el humano aumenta por la constante invasión de los ecotopos naturales de estos animales, lo cual se realiza por la intensa y descontrolada urbanización del valle de Caracas. Discutimos la posibilidad de transmisión de *T. cruzi* por vía venérea así como por contaminación con fluidos glandulares de rabipelados.

ABSTRACT

We have attempted to identify the Biodeme corresponding to the isolates of vectors and reservoirs captured in residential zones and parks in Caracas. We inoculated i.p. in mice NMRI (15 gr av.) 70 metacyclics/gr. harvested from: 1. *Rhodnius prolixus* used for xenodiagnosis of naturally infected *Didelphis marsupialis* (opossum) and *Rattus rattus*, and mice infected with feces of *Panstrongylus geniculatus*; 2. Fluid of anal (odoriferous) glands of parasited opossums. Short parasitemias (5-15 days), with a predominance of stout trypomastigotes at very low levels ($0.06-6 \times 10^5$ trypomastigotes/ml), produced marked cardiac and skeletal myotropism and 100% mortality. These results reveal characteristics common to the Biodemes II and III proposed by the Andrade school. Organs that have been rarely studied (pancreas and urogenitals) were frequently invaded. We suggest that these results have important implications because of the origin of the isolates (vectors captured in houses in urban areas and synanthropic reservoirs of peridomicilium and recreational parks). The potential risk to human is increasing because of the constant invasions of the natural ecotopes of these animals due to the intensive and uncontrolled urbanization of the Valley of Caracas. We discuss the possibility of *T. cruzi* venereal transmission as well as contamination of the glandular fluids of opossums.

Palabras clave: *Trypanosoma cruzi*, *Didelphis marsupialis*, *Rattus rattus*, *Pastrongylus geniculatus*, zoonosis urbana, Venezuela.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*, *Didelphis marsupialis*, *Rattus rattus*, *Pastrongylus geniculatus*, urban zoonosis Venezuela.

INTRODUCCION

Trypanosoma cruzi es un hemoflagelado (Kinetoplastida; Trypanosomatidae) agente etiológico de la Enfermedad de Chagas, uno de los problemas más importantes en Salud Pública del Continente Americano, el cual afecta a 16-18 millones de personas (W.H.O, 1995).

Una parte del ciclo de vida del parásito se lleva a cabo en mamíferos y, accidentalmente, en el hombre en los cuales produce una fase hematozoica y una fase tisular proliferativa. El protozooario completa su desarrollo en el intestino de insectos hematófagos estrictos (Hemiptera; Reduviidae; Triatominae), los cuales conviven con reservorios silvestres, peridomésticos y domésticos a los cuales infectan por contacto con sus excretas contaminadas (Hoare, 1972). Algunas especies de triatominos colonizan la vivienda humana, en tanto que otras son visitantes ocasionales atraídos por la luz (Barretto, 1979).

La Enfermedad de Chagas es endémica de las zonas rurales; pocos estudios han caracterizado a cepas aisladas de zonas urbanizadas a pesar de que esta parasitosis, primitivamente silvestre, se ha transformado en urbana en algunas zonas del Neotrópico (referencias en Sampson-Ward y Urdaneta-Morales, 1988).

Basados en estudios previos (Sampson-Ward y Urdaneta-Morales, 1988; Herrera y Urdaneta-Morales, 1992; 1997), hemos investigado cepas de *T. cruzi*, del valle de Caracas, provenientes de mamíferos (*Didelphis marsupialis*; *Rattus rattus*) y del único vector existente en esta área geográfica, *Panstrongylus geniculatus* (Pifano, 1986), capturados en urbanizaciones, barrios y parques recreacionales, con el objeto de determinar los parámetros que nos permitan conocer los Biodemes potenciales del área, de acuerdo con Andrade y Magalhaes (1997). En este trabajo reportamos, así mismo, resultados preliminares acerca del tropismo tisular particular que estas cepas presentan hacia órganos de las vías urogenitales y algunas glándulas, las cuales han sido poco investigados (Vianna, 1911; Watkins, 1966; Lenzi y Col., 1996).

MATERIALES Y METODOS

Se realizó un muestreo aleatorio de mamíferos en las zonas urbanizadas de Petare, Alta Florida, Colinas de Bello Monte y en parques recreacionales como Parque del Este (La Carlota) y zonas circunvecinas al Parque de La Aguada (El Marqués). Para ello, se usaron 22 trampas *Tomahawk* para animales de mediano porte y 12 trampas *Sherman* para roedores, formando en ambos casos, una doble fila de doce mts de ancho; cada trampa, separada por 12 mts, fue cebada con frutas o cebo *universal* (Herrera y Urdaneta-Morales, 1992). En estas mismas zonas se hizo la búsqueda de *P. geniculatus* en fuentes de luz de las viviendas, debido al marcado fototropismo del vector (Barretto, 1979).

De los mamíferos capturados se tomó sangre de la vena de la cola, la cual se examinó al fresco (400 X) y en extendidos delgados (1000 X) teñidos con solución de Giemsa, para determinar la presencia y morfología de los tripanosomas (Hoare, 1972).

Cada animal fue xenodiagnosticado (Perlowagora y Moreira, 1994) con 12 ninfas de III-IV estadios de *Rhodnius prolixus* sanos, criados en el insectario del Laboratorio de Biología de *Trypanosoma* de mamíferos, Instituto de Zoología Tropical, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela.

Los chipos fueron disecados en solución salina estéril (0,85%) para examinarles sus heces, hemolinfa y glándulas salivales a partir de la primera semana post-ingurgitación y luego cada quince días, hasta tres meses, para determinar la presencia de *T. cruzi* (Barretto, 1979) y/o *T. rangeli* (D'Alessandro y Saravia, 1992).

Los *P. geniculatus* fueron disecados y examinados al ser capturados; por otra parte, el contenido de las glándulas perianales (odoríferas) de los marsupiales capturados, fue examinado según Urdaneta-Morales y Nironi (1996), para determinar la presencia de estadios flagelados de *T. cruzi* (Deane y Col., 1986). Con ambos materiales se inocularon por vía i.p. lotes de 3 ratones albinos NMRI de 15 gr prom los cuales fueron xenodiagnosticados, como ya fue descrito.

Heces de *R. prolixus* de los xenodiagnósticos positivos para *T. cruzi* fueron diluidas en solución salina e inoculadas (70 metatrimastigotes/gr de peso del animal) por vía i.p. en lotes de tres ratones albinos. Muestras de sangre de la cola se examinaron en fresco a partir del tercer día post inoculación y luego tres veces por semana, hasta la desaparición de la parasitemia o la muerte de los animales, con el propósito de determinar el período pre-patente y el pleomorfismo del parásito (Hoare, 1972) y cuantificar la parasitemia según Brener (1962); la mortalidad fue anotada diariamente.

Fragmentos de corazón, hígado, bazo, pulmón, páncreas, duodeno, colon, órganos génito-uritarios y músculo esquelético, tomados de los ratones de más alta parasitemia, en la fase aguda, fueron fijados en formalina al 10%, embebidos en parafina, cortados en secciones de 5 μ , teñidos con hematoxilina/eosina y examinados en un doble ciego (1000 X).

Parásitos encontrados en los frotos de sangre y del material glandular de rabipelados, así como en las secciones de las vísceras, fueron fotografiados con un Microscopio Nikon Microflex HPX-35 cargado con película Ilford Pan F.

RESULTADOS

De catorce *R. rattus* (rata casera) capturadas en Colinas de Bello Monte, dos resultaron parasitadas por *T. cruzi* al xenodiagnóstico; en este estudio caracterizamos una de estas cepas (CO84). Uno de seis rabipelados de Alta Florida (cepa CO57), uno de cinco de El Marqués (cepa CO62) así como dos de seis capturados en Parque del Este, resultaron infectados al xenodiagnóstico. Uno de éstos últimos presentó, además, invasión de las glándulas perianales (odoríferas) mostrando en su fluido un número muy elevado de estadios polimórficos de *T. cruzi* (Fig. 1-A; cepa CO79). Ninguno de los mamíferos estudiados presentó infección por *T. rangeli*.

Los vectores (*P. geniculatus*) capturados en las zonas de Colinas de Bello Monte (cepa VP24) y Petare (VP28) resultaron infectados por *T. cruzi* y negativos a *T. rangeli*.

Con excepción de la cepa CO57 de *D. marsupialis*, todas las cepas restantes presentaron valores bajos de parasitemia los cuales se extendieron durante 5-15 días en promedio (Fig. 2).

Todos los ratones experimentales murieron mostrando pelo hirsuto, seguido de alopecia, frecuente micción, parálisis de las extremidades posteriores y temblor general, características de una severa infección por *T. cruzi*.

Los animales presentaron al inicio de la infección tripomastigotes delgados, los cuales fueron substituidos rápidamente por formas rechonchas (Fig. 1-B).

La invasión tisular por las cepas estudiadas, independientemente de su origen, mostró un marcado miotropismo por el corazón y el músculo esquelético. Tropicismo particular hacia los acinos del páncreas (Fig. 1-C) se observó en cinco de seis de las cepas estudiadas; por otra parte, se observó histotropismo moderado hacia órganos del sistema urogenital como vejiga urinaria, ovarios, útero, conducto deferente, testículos y próstata (Fig. 1-D).

DISCUSION

Los flagelados presentes en la sangre de los mamíferos, en las glándulas anales de los rabipelados y en el intestino de los chipos naturalmente infectados, fueron identificados como estadios de *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* Chagas 1909, basados en los criterios morfológicos sustentados por Barretto (1979) y Deane y Col. (1986).

Nuestros resultados confirman los hallazgos de Pifano (1986), Sampson-Ward y Urdaneta-Morales (1988) y Herrera y Urdaneta-Morales (1992; 1997) quienes hallaron al parásito en focos peridomésticos constituidos por *D. marsupialis*, *R. rattus* y *P. geniculatus*, en zonas altamente urbanizadas de Caracas; nuestras investigaciones han extendido estos hallazgos a parques recreacionales.

T. cruzi constituye un grupo heterogéneo de poblaciones del parásito (Briones y Col., 1999) sobre el cual presiones artificiales y naturales tales como

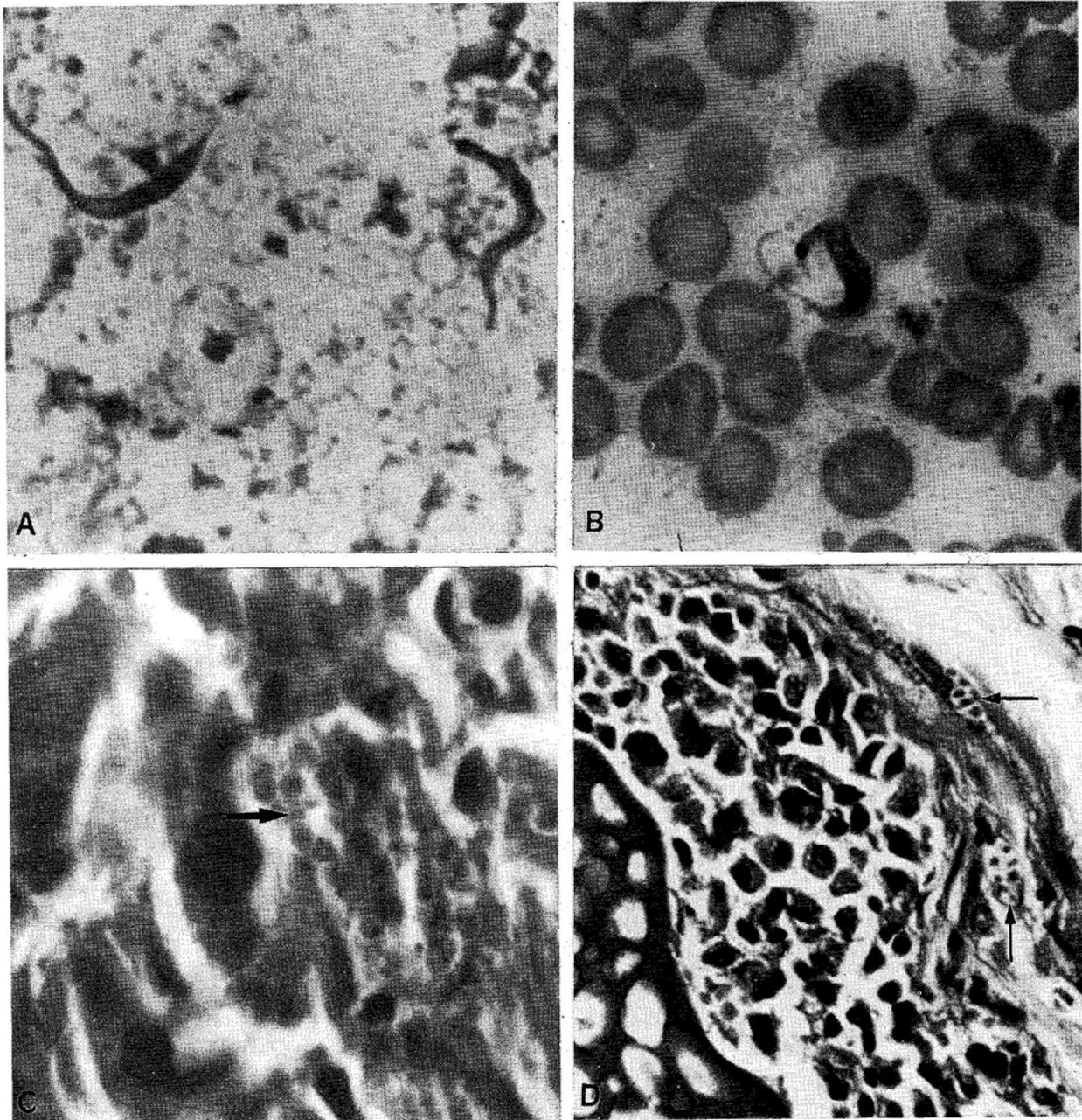


Figura 1. Estadios de *Trypanosoma cruzi*. A. Metatrypomastigote y epimastigote del fluido de glándulas anales de *D. marsupialis* naturalmente infectado (cepa CO79); B. Tripomastigote rechoncho de ratones experimentalmente infectados (cepa VP24). (Giemsa; 1400X). Secciones histológicas de ratones albinos mostrando pseudoquistes (flechas) de *T. cruzi* con estadios amastigotes en: C. Célula acinar del páncreas (cepa CO57); D. próstata (cepa CO79). (Hematoxilina-Eosina; 1400X).

número elevado de reservorios y vectores, corrientes migratorias del campo a la ciudad, extensión incontrolada de las urbes hacia sabanas y bosques, provocan cambios ecológicos importantes; los cuales seleccionan subpoblaciones con características

morfológicas y de comportamiento particulares a diferentes regiones geográficas (Barretto, 1979; Walsh y Col. 1993; Tibayrenc y Ayala, 1988) los cuales conforman Biodemes diferentes (Andrade y Magalhaes, 1997).

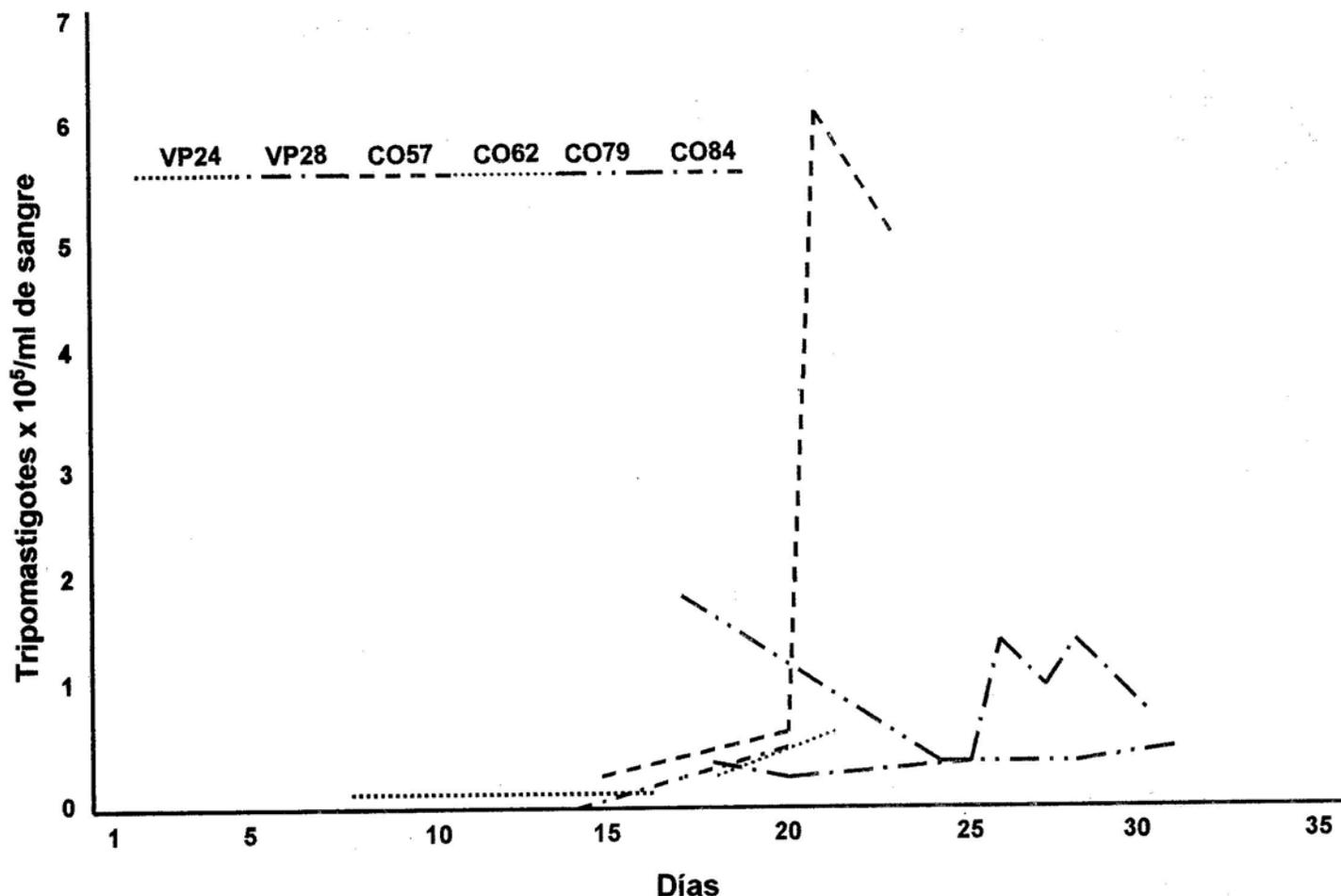


Figura 2: Parasitemias observadas en ratones NMRI inoculados con cepas de *Trypanosoma cruzi* aisladas de *Panstrongylus geniculatus* (VP24, 28), *Didelphis marsupialis* (CO57, 62, 79) y *Rattus rattus* (CO84).

Los valores bajos de las parasitemias obtenidas contrastaron con las altas tasas de mortalidad (100%) así como con la amplia gama de tejidos que fueron invadidos en forma moderada a abundante, en forma similar a lo reportado por nosotros al trabajar con cepas aisladas de *R. rattus* y de glándulas anales de rabipelados (Herrera y Urdaneta-Morales, 1997; Urdaneta-Morales y Nironi, 1996).

Este comportamiento difiere del producido por aislados obtenidos de reservorios de otras áreas geográficas (Barretto, 1979; Pietrzak y Pung, 1998) así como por cepas provenientes de *D. marsupialis* del valle de Caracas, no adaptadas a animales de laboratorio, las cuales mostraron baja mortalidad aún cuando el histotropismo fue elevado en numerosos tejidos y órganos (Herrera y Urdaneta-Morales, 1992). Así mismo, nuestros resultados coliden con los de Hanson y Roberson (1974) que

plantean una correlación directa entre parasitemia y densidad de parásitos en los tejidos durante la infección aguda experimental por *T. cruzi*.

Todas las cepas provocaron miotropismo marcado; llama la atención la frecuente invasión de los acinos del páncreas, hallazgo que rara vez se ha reportado en la literatura (Watkins, 1966; Scorza y Col., 1989).

El parasitismo provocado, por las cepas estudiadas, en varios órganos urogenitales nos sugiere que, al igual que en otros Kinetoplastida (Symmers, 1960), puede existir la posibilidad de transmisión de *T. cruzi* a través de vías venéreas como ha sido planteado por Vianna (1911); Bice y Zeledón (1979); Tavares y Col. (1994); Scorza y Col. (1996).

A pesar del número limitado de cepas que hemos estudiado, lo que hemos discutido parece indicar la existencia de subpoblaciones de *T. cruzi* en

la urbe caraqueña que representarían Biodemes diferentes con características particulares, lo cual sería el resultado de ciclos de transmisión muy aislados mantenidos por una única especie de vector y un número de especies de mamíferos que se ha reducido por los cambios urbanísticos sufridos por el Valle de Caracas (Scorza y Col., 1996).

Finalmente pensamos que, la presencia de metacíclicos en las glándulas anales de rabipelados capturados en Caracas, las cuales expulsan su contenido cuando el animal es atacado o cuando demarca territorio (Deane y Col., 1986), podría representar un peligro potencial para una población humana que constantemente invade los habitats de

estos animales, al contaminar alimentos que sean ingeridos crudos o bien a través de la contaminación de mucosas como la oral y ocular (Urdaneta-Morales y Nironi, 1996).

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean agradecer a: Marlene Rodríguez y Julio Zambrano por la asistencia técnica; Estefanía Flores por el trabajo histológico; Vilma C. y María M. Urdaneta por ayuda en preparar el manuscrito. Al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad Central de Venezuela por el financiamiento otorgado (Proyecto N° 03.31.37 - 0298).

LITERATURA CITADA

ANDRADE, S.G. Y J.B. MAGALHAES.

1997. Biodemes and Zymodemes of *Trypanosoma cruzi* strains: correlations with clinical data and experimental pathology. *Rev. Soc. Brasil. Med. Trop.*, 30: 27-35.

BARRETTO, M.P.

1979. Epidemiología. En: *Trypanosoma cruzi* doença de Chagas. Brener y Andrade (Eds.) Brasil, Guanabara Koogan, pp.89-151.

BICE, D. Y R. ZELEDON

1970. Comparison of infectivity of strains of *Trypanosoma cruzi*. *J. Parasit.*, 56: 663-670.

BRENER, Z.

1962. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Inst. Med. Trop. S. Paulo.*, 4: 389-396.

BRIONES, M., R. SOUTO, B. STOLF Y B. ZINGALES

1999. The evolution of two *Trypanosoma cruzi* subgroups inferred from rRNA genes can be correlated with the interchange of American mammalian faunas in the Cenozoic and has implications to pathogenicity and host specificity. *Mol. Bioch. Parasit.*, 104: 219-232.

D'ALESSANDRO, A. Y N. SARAVIA

1992. *Trypanosoma rangeli*. En: Parasitic Protozoa. Vol. 2. Kreier y Baker (Eds.) N. York. Academic Press pp. 1-54.

DEANE, M., H. LENZI Y A. JANSEN

1986. Double development cycle of *Trypanosoma cruzi* in the opossum. *Parasit. Today*, 2: 146-147.

HANSON, W. Y E. ROBERSON

1974. Density of parasites in various organs and the relation to numbers of trypomastigotes in the blood during acute infections of *Trypanosoma cruzi* in mice. *J. Protozool.*, 21: 512-517.

HERRERA, L. Y S. URDANETA-MORALES

1992. *Didelphis marsupialis*: a Primary reservoir of *Trypanosoma cruzi* in urban areas of Caracas, Venezuela. *Ann. Trop. Med. Parasit.*, 86: 607-612.

1997. Synanthropic rodent reservoirs of *Trypanosoma cruzi* in the valley of Caracas, Venezuela. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo.*, 39: 279-282.

HOARE, C.

1972. *The Trypanosomes of mammals*. Oxford. Blackwell. p.749.

LENZI, H., D. OLIVEIRA, M. LIMA Y C. GATTASS

1996. *Trypanosoma cruzi*: paninfectivity of CI strain during murine acute infection. *Exp. Parasit.*, 84: 16-27.

PERLOWAGORA, A. Y C. MOREIRA.

1994. In vivo differentiation of *Trypanosoma cruzi*. *Mém. Inst. Oswaldo Cruz*, 89: 603-618.

PIETRZAK, S. Y O. PUNG

1998. Trypanosomiasis in raccoons from Georgia. *J. Wild. Dis.*, 34: 132-136.

PIFANO, F.

1986. El potencial enzootico del complejo Schizotrypanum cruzi - *Didelphis marsupialis* - *Panstrongylus geniculatus* y sus incursiones a la vivienda humana del Valle de Caracas, Venezuela. *Bol. Acad. Cienc. Fis. Mat. Nat.*, (Caracas). XLVI: 9-37.

SAMPSON-WARD, L. Y S. URDANETA-MORALES

1988. Urban *Trypanosoma cruzi*: biological characterization of isolates from *Panstrongylus geniculatus*. *Ann. Soc. belge Méd. Trop.*, 68: 95-106.

SCORZA, C., S. URDANETA-MORALES Y L. SAMPSON-WARD.

1989. Urban *Trypanosoma cruzi*: pathology in white mice of isolates from *Panstrongylus geniculatus*. *Ann. Soc. belge Méd. Trop.*, 69: 283-289.

SCORZA, C., L. HERRERA Y S. URDANETA-MORALES

1996. *Trypanosoma cruzi*: histopathology in mice infected with strains isolated from *Didelphis marsupialis* from the Valley of Caracas (Venezuela). *Acta. Cient. Venez.*, 47: 244-247.

SYMMERS, W.

1960. Leishmaniasis acquired by contagion. *Lancet Jan.*, 127-132.

TAVARES, M., A. CARRARO, A. FAVARETTO, S. PETENUSCI Y T. CARVALHO

1994. The male reproductive organs in experimental Chagas' disease. *Exp. Toxic. Pathol.*, 46: 243-246.

TIBAYRENC, M. Y M. AYALA

1988. Isoenzyme variability in *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas' disease: genetical, taxonomical, and epidemiological significance. *Evolution*, 42: 277-292.

URDANETA-MORALES, S. Y I. NIRONI

1996. *Trypanosoma cruzi* in the anal glands of urban opossums. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 91: 399-403.

VIANNA, G.

1911. Contribuicao para o estudo da anatomia patologica da «Molestia de Chagas». *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 3: 276-294.

WALSH, J., D. MOLYNEUX Y M. BIRLEY

1993. Deforestation: effects on vector-borne disease. *Parasitology*, 106 (Sup.): 55-75.

WATKINS, R.

1966. Comparison of two strains of *Trypanosoma cruzi* in mice. *J. Parasit.*, 52: 958-961.

W.H.O.

1995. Tropical Disease Research. Twelfth Prog. Report. Geneva., p.167.