

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA

CONTRIBUCION AL ESTUDIO DE *ENDOTRYPANUM SCHAUDINNI*

(*Trypanosomidae*)

Tesis de Grado presentada a la Facultad de Ciencias

Sección de Microbiología

por

FERNANDO MONTERO GEL

1955

Trabajo realizado en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias y en el Laboratorio Bacteriológico del Hospital San Juan de Dios.

**A mi Madre y a
mis Hermanos**

A mi maestro Profesor

Alfonso Trejos Willis

SUMARIO

I.	INTRODUCCION.....	5
II.	REVISION HISTORICA.....	8
III.	POSICION TAXONOMICA Y CARACTERISTICAS DE LOS GENEROS <u>BRADYPUS</u> Y <u>CHOLOEPUS</u>	11
	a- Estudio hematológico.....	29
IV.	MORFOLOGIA.....	42
	a- En la sangre de <u>Bradypus</u> y <u>Choloepus</u>	42
	1- Preparaciones a fresco	
	2- Preparaciones teñidas	
	b- En los medios de cultivo.....	57
V.	CICLO EVOLUTIVO.....	65
	a- Reproducción en el huésped vertebrado.....	65
	b- Salida de los eritrocitos.....	71
	c- Investigación sobre invertebrados transmisores. Xenodiagnóstico.....	74
VI.	INOCULACIONES.....	79
	a- En animales de Laboratorio.....	79
	b- En embrión de pollo.....	84
VII.	REACCIONES INMUNOLOGICAS.....	86
VIII.	CARACTERISTICAS DEL GENERO <u>ENDOTRYPANUM</u>	91
IX.	RESUMEN Y CONCLUSIONES.....	94
X.	BIBLIOGRAFIA.....	99

INTRODUCCION

En el año de 1951, cuando recibíamos la cátedra de Protozoología en la Facultad de Ciencias, nos llamó considerablemente la atención la familia Trypanosomidae, y en ella uno de sus géneros menos conocido en la actualidad, en el cual los investigadores habían trabajado poco; nos referimos al género Endotrypanum, Mesnil y Brimont 1908.

Endotrypanum schaudinni no es parásito del hombre y por lo tanto nuestro trabajo no tiene importancia médica, ya que su huésped vertebrado lo vamos a encontrar en desdentados del género Choloepus y Bradypus. Sin embargo, desde el punto de vista biológico es un protozoario sumamente interesante que difiere notablemente de las especies del género Trypanosoma.

El profesor Alfonso Trejos Willis despertó en nosotros la inquietud científica, y colaboró enormemente proporcionándonos parte de la literatura necesaria para llevar a cabo la búsqueda de este tripanosómido en Costa Rica.

En el mes de octubre de 1951, con mi compañero de estudios Sr. Roger Bolaños Herrera, nos trasladamos a las montañas del Tablazo al Sur de San José, donde capturamos una hembra adulta de Choloepus en la que encontramos por primera vez en nuestro país el tripanosoma de Mesnil y

Brimont.

El presente trabajo contiene una revisión cronológica de la literatura existente y además el relato de nuestras experiencias.

Sería largo enumerar las razones por las cuales nos obliga a estar agradecidos con el profesor Trejos Willis, basta decir que gracias a sus enseñanzas y colaboración fue posible la realización de este trabajo, enseñanzas que nunca terminaremos de agradecer los que tuvimos la suerte de ser sus alumnos.

Además, queremos dejar constancia de nuestro agradecimiento a las siguientes personas: Profa. Cecilia Lizano, Prof. Armando Ruiz, Prof. Pedro Morera, Prof. Rafael L. Rodríguez, Ing. Agr. Alfonso Jiménez, Dr. Manuel Aguilar, Dr. Hernán Collado, por sus valiosas colaboraciones en el aspecto técnico y bibliográfico.

Al Prof. Rodrigo Brenes y al Sr. Jorge Sáurez por sus valiosas indicaciones en la corrección del manuscrito.

En forma especial comprometen mi gratitud el amigo y compañero Prof. Pedro Vieta Asch por su amplia colaboración, y mis compañeros de trabajo Sra. Rosario Zumbado, Sres. Carlos Pérez, Rafael Barquero, Evangelista Sánchez y José Navarro. Vayan también mis agradecimientos a los campesinos que como Domiciano Segura, nos brindó su techo y acompañó en los bosques durante la búsqueda de los desdentados.

Para finalizar, quiero dejar constancia de reconocida gratitud a mi padrino de tesis, Prof. Renato Soto Pacheco.

Fernando Montero Gei.

Noviembre de 1955.

II REVISIÓN HISTÓRICA

El género Endotrypanus fue creado por Mesnil y Brimont en el año de 1908 (15) para incluir en él a un nuevo hematozoario descubierto por ellos en la sangre de un desdentado, Choloepus didactylus L. vulgarmente conocido con el nombre de "peresoso" el cual vive principalmente alimentándose con hojas de árboles del género Cecropia. Los autores franceses con base en su observación en el Laboratorio de Microbiología de la Administración Penitenciaria de Saint-Laurent du Maroni, en la Guayana Francesa, realizaron la descripción morfológica del parásito. En 1914 Barling (9) en Panamá reportó la presencia de este tripanosómdo, en observaciones de sangre a fresco y en frotis teñidos, completando así datos sobre su morfología y detalles sobre las costumbres de su huésped vertebrado Choloepus didactylus L.

Labernadie y Hulse en 1923 (12) publicaron sus resultados en relación al Endotrypanus dando datos respecto a su morfología y a las condiciones necesarias para el mantenimiento en cautiverio de los desdentados, principalmente en lo referente a su alimentación.

Wenyon y Scott en 1925 (18) publicaron una pequeña nota acerca de la observación del Endotrypanus schaudinni. en láminas coloreadas de sangre periférica de un "peresoso" llamado

por ellos Bradypus didactylus, y que había muerto en el Jardín Zoológico de Londres. El nombre científico del desdentado no coincide en la actualidad con ninguna de las especies, pero suponemos se trataba de un Choloepus, ya que los animales del género Bradypus soportan muy mal el cautiverio.

En 1944 Marquez da Cunha y Julio Muniz (B) de la Sección de Protozoología del Instituto Oswaldo Cruz, publicaron en nuestro concepto el trabajo más completo sobre Endotrypanum schauinslandi.

En 1936 uno de estos autores, Cunha, en el estado de Pará, tuvo ocasión de observar dos ejemplares de Choloepus didactylus L. pertenecientes al Museo Goeldi, que se encontraban parasitados por Endotrypanum, y debido a su corta permanencia en Belén, no pudo proceder a mayores estudios, principalmente en la obtención de cultivo. En 1937 dos auxiliares de la Sección de Protozoología fueron designados para ir a trabajar al Instituto de Biología Experimental del Norte, en Belén de Pará, con la idea de proceder a sembrar medios de N.N.N., Noguchi y Nöller, con sangre de Choloepus didactylus L. en cautiverio, así como de otro ejemplares que pudieran ser obtenidos en aquel Estado.

En 1938 se recibían en el Instituto, tubos de medio de Nöller que habían sido sembrados con sangre de un ejemplar de Choloepus didactylus L. parasitado con Endotrypanum, tubos que presentaban

abundante crecimiento sobre la superficie del medio, constituido por flagelados con características de leptomonas.

En 1941, Emanuel Dias, en el mismo estado de Pará, tuvo ocasión de efectuar siembras en el mismo medio con sangre de Choloepus didactylus L. naturalmente infectado con Endotrypanum, obteniendo nuevamente cultivo abundante de estos flagelados. Con este material los autores brasileños hicieron la descripción morfológica del parásito en sangre periférica y de las formas de cultivo que por primera vez habían sido obtenidas por ellos. Teniendo en su poder dos cepas de Endotrypanum realizaron trabajos inmunológicos (pruebas de precipitación y de fijación del complemento) en relación con otros miembros de la familia Trypanosomidae, intentos de infección de especies del género Rhodnius por medio de un xenodiagnóstico artificial e inoculaciones en animales experimentales de Laboratorio.

En 1953 Trejos y Montero-Gel (17) reportaron la presencia de este tripanosómido en Costa Rica, parasitando Bradynus griseus griseus.

III. POSICION TAXONOMICA Y CARACTERISTICAS DE LOS GENEROS

BRADYPUS Y CHOLOPUS

Antes de entrar directamente en la morfología del hemoparásito daremos posición taxonómica y algunas características de sus huéspedes vertebrados: Bradypus y Choloepus.

<u>Taxonomía</u>	Goodwin (10)
Clase	<u>Mammalia</u>
Sub clase	<u>Theria</u>
Orden	<u>Edentata</u>

Familia Bradypodidae.

Goodwin lo define en los siguientes términos: Perezosos con tres garras largas fuertemente curvadas y ganchudas, tanto en las patas delanteras como en las traseras, cubiertas de pelo en su cara interna hasta las uñas. (Figs.1 y 7). Cabeza corta y redonda, cola corta (Fig.4) y pelaje áspero.

Género Bradypus Linnaeus

Se distingue por la posesión de tres dedos en las patas delanteras. Los machos tienen una mancha en bajo relieve de pelo corto en el lomo, de llamativo color naranja y negro (Fig.8). La distribución geográfica del género, abarca desde el sur del Río Patricia en Honduras, hasta Bolivia.

Bradypus griseus griseus (Gray 1871) Allen 1991. (13)

De tamaño mediano con el pelo de la parte superior de la

cabeza inclinado hacia adelante, (Fig. 3) cabeza, hombros y miembros delanteros, más oscuros que el resto del cuerpo. Pelaje áspero, relativamente corto y denso, con una segunda cubierta de lana. El color de los brazos hasta los hombros, del cuello y de la cabeza, grisáceo. La cara blanca, con estrías negras sobre los ojos, las cuales se extienden hacia atrás y hacia abajo, hasta la garganta (Figs. 2 y 6). En la frente una línea de pelos oscuros contrasta fuertemente con el blanco de la cara. Dorso blancusco, en donde la hembra posee una línea, media oscura.

De clima caliente, se alimenta principalmente de hojas y tallos tiernos de árboles del género Cecropia (Figs. 9 y 10) conocidos con el nombre de "guarumo", caracterizados por sus grandes hojas peltadas digitadas, y por sus tallos con nudos muy marcados. Sus uñas ganchudas están adaptadas a una vida de lento movimiento en las copas. Cuando se mueven a lo largo de ramas longitudinales, y frecuentemente al comer, se cuelgan de las garras posteriores. De costumbre no gregarias excepto durante la época del celo. De corta vista y mal oído; olfato moderadamente bueno pero inferior al promedio del de los otros mamíferos. Nunca trata de hacer nido, ni de guardarse. Normalmente duerme en una rama o tallo vertical agarrándose

fuertemente con las extremidades y descansando la cabeza entre las patas delanteras. Los recién nacidos se sostienen al vientre de la madre con las extremidades extendidas (Fig.5) y comienzan a comer hojas más o menos a las cinco semanas.

Una de sus peculiaridades es el crecimiento de algas en su pelo; de ahí que la mayor parte de los individuos presenten abundancia de estos vegetales, que pueden secarse durante el verano, pero que durante el invierno vuelven a tomar el color verde. Su captura es fácil de realizar, debido a sus movimientos lentos, de donde ha tomado el nombre de "perezoso" con que lo conocen los campesinos. Soportan muy mal el cautiverio y por esa razón no hemos podido mantenerlos por un tiempo suficiente en el laboratorio, con el objeto de estudiar su parasitismo.

Capturamos un total de seis ejemplares distribuidos en el país de la siguiente manera: dos hembras adultas en La Finca "La Lola" del Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas, situada al Norte de la Provincia de Limón en la región de Guápiles. Tres hembras adultas en otra de las Fincas del mismo Instituto, a cinco kilómetros al Sur Este de la ciudad de Turrialba, Provincia de Cartago. Un macho adulto sobre la carretera a Turrialba.

De todos ellos solamente uno presentó infección doble por Endotrypanum schaudinni y Trypanosoma legeri. Los demás no presentaron ningún hemoparásito a excepción del macho al que se le encontró una microfilaria en sangre periférica.

Bradypus griseus griseus



Fig. 1. Obsérvese la extremidad anterior con sus tres dedos característicos.



Fig. 2. Cara: blanca con estrías negras sobre los ojos, extendidas hacia atrás.



Fig. 3. Vista posterior de la cabeza, Pelaje áspero, corto y denso inclinado hacia adelante.



Fig. 4. Hembra adulta en la que se aprecia su cola corta.



Fig. 5 Hembra con su cría,



Fig. 6 Bradypus joven en el que se aprecia nítidamente el colorido de la cara,



Fig. 7 Obsérvese la cara interna de la extremidad posterior derecha cubierta de pelo.



Fig. 8 Mancha dorsal del macho.

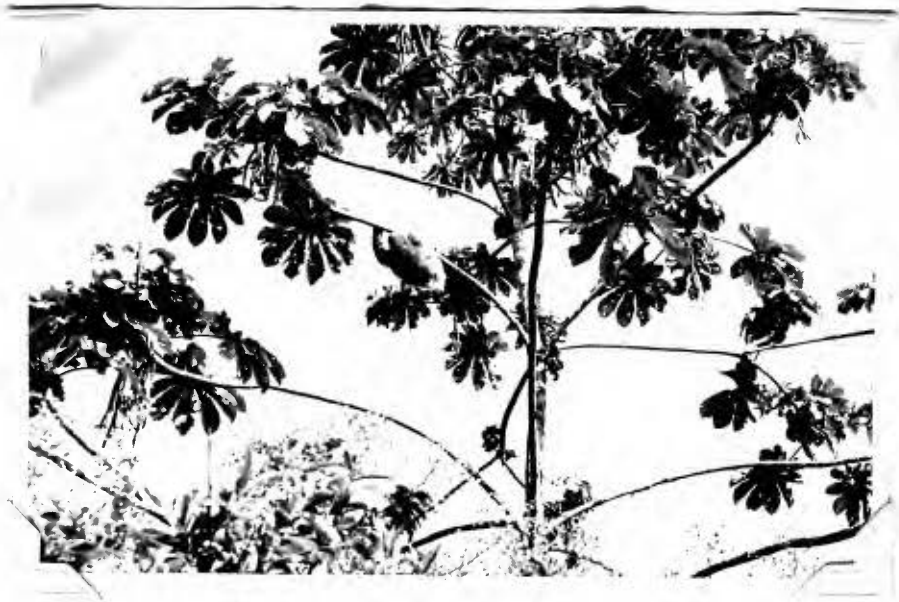


Fig. 9 y 10 Arboles de género Geeronia con sus características hojas peltadas digitadas, con Bradyrus colgando de sus ramas.



Familia Choleonidae

Sus miembros se parecen en general a los de la Bradynodidae, pero contrastan notablemente en que el número de dedos y uñas delanteras se reduce a dos (Fig. 11). El pelo de la cabeza se inclina hacia atrás sin línea en la frente, (Figs. 13 y 14) ni cola. La cara interna de las patas delanteras y traseras es glabra. (Figs. 15 y 16)

Género Choleonus Illiger 1811 (13)

Dentados de gran tamaño. Caninos muy desarrollados en ambas quijadas, agudos, triangulares, rozando el uno con el otro. (Fig. 12) Su distribución geográfica abarca desde Matagalpa en Nicaragua, hasta el Brasil.

Choleonus hoffmanni Peters 1858 (13)

Fue descrito por Peters con base en ejemplares colectados por Hoffman y Frantzius en Costa Rica. El sitio exacto de captura no es dado por los autores, pero parece ser Escasú. Distribución geográfica de Nicaragua hasta Colombia.

Características generales

Presenta extremidades largas, con pelo abundante, suelto y áspero. Ojos relativamente grandes, rodeados por una zona de pelo corto y negro, (Figs. 17 y 18) y orejas pequeñas ocultas bajo el pelaje.

Descripción:

La especie costarricense varía mucho de color, consiguiéndose ejemplares mucho más claros y oscuros que el término medio. El pelo de la cabeza y del lomo es blanquecino en su base; las extremidades delanteras, las traseras, los hombros y la grupa, de color pardo canela. La parte ventral, del mismo color con base pardusca. Aunque de movimientos lentos en comparación con la mayoría de los otros mamíferos, son mucho más rápidos que los del género Bradypus; de ahí el nombre de "perico ligero" con el cual se les conoce en nuestro país, en el cual habitan en regiones frías, presentando crecimiento de algas sobre el pelo, las que proliferan durante la estación lluviosa, teniendo la mayoría un tinte decididamente verdoso. Durante el verano las algas se secan y su color varía del pardo claro al oscuro. Este fenómeno de diversidad de colorido puede apreciarse muy bien en los ejemplares que se capturan en invierno y se mantienen en el laboratorio por un tiempo más o menos prolongado, alimentándolos con frutas muy maduras, especialmente bananos y con las hojas de una planta trepadora conocida en nuestro medio con el nombre vulgar de "churristate", perteneciente al género Convolvulus. En los bosques se alimentan generalmente durante la noche con hojas y tallos tiernos de varios árboles, pero principalmente de aquellos conocidos con el nombre de "burío"

pertenecientes al género Ancilla. Al comer jalan las ramas con las uñas anteriores hacia la boca, siendo capaces de sostenerlas entre ellas y la palma de la mano. Son sumamente agresivos, lo que dificulta en gran parte su captura y su manipuleo en el laboratorio.

A través de nuestras investigaciones hemos tenido la oportunidad de examinar un total de quince ejemplares provenientes de los siguientes lugares: nueve ejemplares de los Montes del Tablazo sitios al sur de La Provincia de San José. Tres hembras (2 adultas 1 joven) cinco machos (4 adultos 1 joven). Dos machos adultos, uno de las estribaciones del Volcán Poás Provincia de Alajuela y otro de un lugar cercano a la población del Rosario, Sur de la Provincia de San José. Tres machos jóvenes capturados en La Carpintera, Coris y Santa Cruz de Turrialba respectivamente, en la Provincia de Cartago. Una hembra adulta de Santa Cruz de Turrialba .

Encontramos parasitados por Endotrypanum schaudinni dos hembras adultas, y un macho joven procedentes del Tablazo y otro macho adulto de las estribaciones del Poás, material que nos ha servido para la realización del presente trabajo.

Choloerus hoffmanni



Fig. 11 Obsérvese los dos dedos característicos de las extremidades anteriores.



Fig. 12 Hoca con caninos muy desarrollados, agudos y triangulares.



Fig. 13 y 14 Pelaje largo y sualto. Inclínada hacia atrás en la cabeza.





Figs. 15 y 16. Cara interna de las patas delanteras y traseras
glabra.





Figs. 17 y 18. Cara con ojos relativamente grandes, rodeados por una zona de pelo corto y negro.





Figs. 19 y 20. Ejemplares jóvenes con algunas características genéricas.



a- Estudio hematológico

Ejemplar N°1

Especie Bradypus griseus griseusHEMOGRAMA

Eritrocitos....3.989.000..../ mm^3 Hemoglobina.....14.....gms.%
 Leucocitos.....12.400...../ mm^3

Recuento diferencial leucocitario

Basófilos.....0.....%	Mielocitos.....0.....
Eosinófilos.....0.....%	Metamielocitos..0.....
Linfocitos.....39.....%	Núcleos en banda. P-A.....
Monocitos.....5.....%	Segmentados....55.5.....
Neutrófilos....56.....%	
Total.....100.....%	Total.....56.0.....

Observaciones

Un 5% de los linfocitos son de tipo grande;
 cuatro metarrubricitos. Anisocitosis moderada.

Otros datos

Hematocrito..... 48 cc por 100 cc de sangre
 Velocidad de eritrosedimentación..... 9 mm en una hora
 Índice de volumen..... 1.6
 Volumen globular medio..... 160 micras cúbicas
 Diámetro globular medio..... 3.5 micras
 Media de hemoglobina globular..... 46.6 micromicrogramos
 Concentración media de hemoglobina..... 29.1 %

Ejemplar N°2

Especie Bradypus griseus griseusHEMOGRAMAEritrocitos.....2.960.000...../mm³

Hemoglobina.....11.85....gms.

Leucocitos.....3.550...../mm³Recuento diferencial leucocitario

Basófilos.....0.....%

Mielocitos.....0.....

Eosinófilos.....0.....%

Metamielocitos.....0.....

Linfocitos.....32.....%

Núcleo en banda.....6.....

Monocitos.....7.....%

Segmentados.....55.....

Neutrófilos.....61.....%

Total.....100.....%

Total.....61.....

Observaciones

Dos prolinfocitos; dos eritrocitos con cuerpos de Howell-Jolly; anisocitosis moderada.

Ejemplar N°3

Especie Bradypus griseus griseusHEMOGRAMAEritrocitos.....2.970.000.../mm³

Hemoglobina.....12.20....gms.%

Leucocitos.....5.000...../mm³Recuento diferencial leucocitario

Basófilos.....0.....%

Mielocitos.....0.....

Eosinófilos.....0.....%

Metamielocitos.....0.....

Linfocitos.....42.....%

Núcleos en banda...3.....

Monocitos.....1.....%

Segmentados.....54.....

Neutrófilos.....57.....%

Total.....100.....%

Total.....57.....

Observaciones

Un prolinfocito; cuatro linfocitos de aspecto plasmacelular; un metarrubricito; anisocitosis moderada.

Ejemplar N^o 4Especie Choloepus hoffmanniHEMOGRAMAEritrocitos.....2.796.000.../mm³

Hemoglobina.....12.....gms.%

Leucocitos.....12.700...../mm³Recuento diferencial leucocitario

Basófilos.....2:5.....%

Mielocitos.....0:0.....

Eosinófilos.....0:0.....%

Metamielocitos.....0:0.....

Linfocitos.....39:5.....%

Núcleo en banda.....0:5.....

Monocitos.....2:0.....%

Segmentados.....54:5.....

Neutrófilos.....55:0.....%

Total.....100:0.....%

Total.....55:0.....

Ejemplar N° 5

Especie Choloemus hoffmanniHEMOGRAMA

Eritrocitos.....	2.900.000.../mm ³	Hemoglobina.....	13.60.....gms.%
Leucocitos.....	15.200...../mm ³		

Recuento diferencial leucocitario

Basófilos.....	1.....%	Mielocitos.....	0.....
Eosinófilos.....	0.....%	Metamielocitos.....	0.....
Linfocitos.....	60.....%	Núcleo en banda.....	0.....
Monocitos.....	3.....%	Segmentados.....	36.....
Neutrófilos.....	36.....%	Total.....	36.....
Total.....	100.....%		

Observaciones:

Un 21 % de los linfocitos son de tipo grande con citoplasma agranular; un linfocito de aspecto plasmacelular.

Ejemplar N°6

Especie Choloepus hoffmanniHEMOGRAMA

Eritrocitos.....	2.349.000.../mm ³	Hemoglobina.....	13.80.....gms.%
Leucocitos.....	11.400...../mm ³		

Recuento diferencial leucocitario

Basófilos.....	0.....%	Mielocitos.....	0.....
Eosinófilos.....	0.....%	Metamielocitos.....	0.....
Linfocitos.....	29.....%	Núcleo en banda.....	2.....
Monocitos.....	0.....%	Segmentados.....	69.....
Neutrófilos.....	71.....%	Total.....	71.....
Total.....	100.....%		

Observaciones

Once metarrubricitos; seis eritrocitos con cuerpos de Howell-Jolly; anisocitosis moderada,

Otros datos

Hematocrito.....	46 cc por 100 cc de sangre
Indice de volumen.....	2.0
Volúmen globular medio.....	200 micras cúbicas
Media de hemoglobina globular.....	55.6 micromicrogramos
Concentración media de hemoglobina.....	27.8%

Ejemplar N°7

Especie Choloepus hoffmanniHEMOGRAMA

Eritrocitos.....2.540.000.../mm³ Hemoglobina.....11.25.....gms.%
 Leucocitos.....17.200...../mm³

Recuento diferencial leucocitario

Basófilos.....0.....%	Mielocitos.....0.....
Eosinófilos.....0.....%	Metamielocitos.....0.....
Linfocitos.....62:5.....%	Núcleos en banda...0:5...
Monocitos.....0:5.....%	Segmentados.....36:5...
Neutrófilos.....37:0.....%	
Total.....100:0.....%	Total.....37:0.....

Observaciones

Un 6% de los linfocitos son de tipo grande; un prolinfocito; ocho células desintegradas.

Otros datos

Hematocrito..... 38 cc por 100 cc de sangre
 Velocidad de eritrosedimentación..... 54 mm, en una hora
 Índice de volumen..... 1.5
 Volumen globular medio..... 152 micras cúbicas
 Diámetro globular medio..... 10.4 micras
 Media de hemoglobina globular..... 45.0 micromicrogramos
 Concentración media de hemoglobina..... 29.6 %
 Prueba de fragilidad globular(Giffin y Sanford) 0.48-0.34 %

Ejemplar N°8

Especie Choloepus hoffmanniHEMOGRAMA

Eritrocitos.....2.640.000.../mm³ Hemoglobina.....11.85.....gms.%
 Leucocitos.....15.350...../mm³

Recuento diferencial leucocitario

Basófilos.....1.....%	Mielocitos.....0.....
Eosinófilos.....0.....%	Metamielocitos.....0.....
Linfocitos.....70.....%	Núcleo en banda.....1.....
Monocitos.....2.....%	Segmentados.....26.....
Neutrófilos.....27.....%	Total.....27.....
Total.....100.....%	

Observaciones

Un 9% de los linfocitos son de tipo grande con citoplasma agranular; dos prolinfocitos; dos linfocitos de aspecto plasmacelular.

Otros datos

Hematocrito..... 43 cc per 100 cc de sangre
 Velocidad de eritrosedimentación..... 5 mm. en una hora
 Índice de volumen..... 1.6
 Volumen globular medio..... 165 micras cúbicas
 Diámetro globular medio..... 9.7 micras
 Media de hemoglobina globular..... 45.5 micromicrogramos
 Concentración media de hemoglobina..... 27.5 %
 Prueba de fragilidad globular(Giffin y Sanford) 0.48-0.34 %

Ejemplar N°9

Especie Choloepus hoffmanniHEMOGRAMA

Eritrocitos.....	2.440.000.../mm ³	Hemoglobina.....	12.20.....gms.%
Leucocitos.....	21.950...../mm ³		

Recuento diferencial leucocitario

Basófilos.....	2.....%	Mielocitos.....	9.....
Eosinófilos.....	0.....%	Metamielocitos.....	0.....
Linfocitos.....	67.....%	Núcleos en banda.....	3.....
Monocitos.....	3.....%	Segmentados.....	25.....
Neutrófilos.....	28.....%		
Total.....	100.....%	Total.....	28.....

Observaciones

Un 2 % de los linfocitos son de tipo grande con citoplasma agranular; dos prolinfocitos; tres células desintegradas.

Otros datos

Hematocrito.....42 cc por 100 cc de sangre
 Velocidad de eritrosedimentación.....44 mm. en una hora
 Índice de volumen.....1.7
 Volumen globular medio.....175 micras cúbicas
 Diámetro globular medio.....9.9 micras
 Media de hemoglobina globular.....50.8 micromicrogramos
 Concentración media de hemoglobina.....29.0 %
 Prueba de fragilidad globular(Giffin y Sanford) 0.48-0.34 %

Ejemplar N°10

Especie Choloepus hoffmanniHEMOGRAMA

Eritrocitos.....2.260.000../mm³ Hemoglobina.....12.20.....gms. %
 Leucocitos20.250...../mm³

Recuento diferencial leucocitario

Basófilos.....4.....%	Mielocitos.....0.....
Eosinófilos.....0.....%	Metamielocitos.....0.....
Linfocitos.....32.....%	Núcleo en banda.....6.....
Monocitos.....3.....%	Segmentados.....53.....
Neutrófilos.....61.....%	
Total.....100.....%	Total.....61.....

Otros datos

Hematocrito..... 46 cc por 100 cc de sangre
 Velocidad de eritrosedimentación..... 38 mm. en una hora
 Índice de volumen..... 1.7
 Volumen globular medio..... 170 micras cúbicas
 Diámetro globular medio..... 9.3 micras
 Media de hemoglobina globular..... 48.8 micromicrogramos
 Concentración media de hemoglobina..... 28,6 %
 Prueba de fragilidad globular(Giffin y Sanford) 0,44-0,30 %

COMENTARIO

No nos fué posible encontrar literatura al respecto, por lo que consideramos de valor los presentes datos, tanto para el conocimiento del cuadro hemático de estas especies, como para complementar el presente trabajo.

Debido a los pocos ejemplares examinados no nos fué posible obtener valores estimables como normales, pero servirán de base junto con otros más para su determinación.

Los ejemplares N^o 7, 8, 9, y 10 fueron examinados más o menos seis meses después de su captura, siendo el último de éstos el que nos sirvió para la inoculación; que se relata en el capítulo VI. En la serie eritrocítica llama la atención el diámetro globular medio, lo mismo que el volumen, los cuales comparados con los de otros animales (1) se encuentran entre los de mayor diámetro.

La fragilidad globular por otro lado presenta valores semejantes a los humanos 0.42-0.38 a 0.36-0.32 y de otros animales de Laboratorio como perro (0.45-0.36) cuido (0.45-0.32) rata (0.48-0.38) ratón (0.54-0.33) (1) de lo cual se desprende que la fragilidad en el presente caso no está disminuida con respecto a los anteriores animales; existe pues la incógnita si los eritrocitos parasitados modifican aumentando o disminuyendo la fragilidad, ya que ninguno de los ejemplares

examinados presentó parásito en sangre circulante.

En cuanto al cuadro de regeneración en la serie eritrocítica, creemos se deba a condiciones fisiológicas naturales y no a un estado anémico definido; debido a que la cifra total de eritrocitos, después del cautiverio, se modifica poco en relación a la obtenida en ejemplares recién capturados; además, fuera de los metarrubricitos, no se observan otras formas inmaduras, ni alteraciones en los eritrocitos como son: hipocromia, poiquilocitosis y policromatofilia, que suelen presentarse separados o en conjunto en los diferentes estados anémicos. Lo único que se presenta es una moderada anisocitosis.

Labernadie y Hubac (12) atribuyen esa regeneración al parasitismo, pero nosotros hemos tenido oportunidad de observarla en ejemplares en los cuales por métodos directos e indirectos, no se ha demostrado el parásito. Sin embargo como desconocemos su ciclo evolutivo no se puede asegurar que dichos ejemplares no estén parasitados. Vale hacer notar, que después del cautiverio no presentaron ningún indicio de regeneración en la serie eritrocítica.

A través de los datos obtenidos con ejemplares examinados recién capturados, se ve que la cifra leucocitaria es elevada con respecto a humanos; en los ejemplares en cautiverio

parece que ésta se eleva y el cuadro de predominio de neutrófilos sobre linfocitos se invierte como se puede comprobar en los ejemplares N° 7, 8 y 9.

Se hace difícil explicar la razón de esta reacción, pues no se evidencia sintomatología alguna a la cual pudiera atribuirse.

Sin embargo, existe la posibilidad que entren en juego factores psicósomáticos como se ha demostrado en humanos, en diferentes estados emocionales (3).

IV MORFOLOGIA

a- En la sangre de Bradypus y Choloepus

1- Preparaciones a fresco

Con la sangre de una hembra adulta de Choloepus hoffmanni, capturada por nosotros en las montañas del Tablazo, realizamos las siguientes observaciones a fresco, usando la óptica corriente del microscopio y la especial de contraste de fase a 1,500 diámetros.

Se observa un tripanosómdo dentro de un eritrocito con movimiento activo y ondulatorio de su extremidad anterior, movimiento éste que deforma al glóbulo, dando la impresión a veces de que la extremidad se proyectara fuera del mismo. En la extremidad posterior del parásito se ven numerosos gránulos oscuros rodeando una esfera muy refringente y clara, de una y media micras de diámetro. Cuando el movimiento cesa, éste queda inmóvil durante algunos segundos, permaneciendo la extremidad anterior plegada sobre el cuerpo. No fué posible observar núcleo ni cinetoplasto. Con óptica corriente, y 1,500 diámetros, se aprecian características semejantes a las anteriores, y se encuentran los mismos gránulos y la esfera refringente, que suponemos sea una vacuola, un poco más oscura. En la región en donde no hay gránulos, el citoplasma se muestra homogéneo.

En otro ejemplar observado, el flagelo se aprecia nítidamente,

y la vacuola localizada en el tercio anterior está rodeada por gránulos negros, que forman además un grupo en la extremidad posterior. Como en el caso anterior, no se observa el núcleo ni el cinetoplasto, y es de advertir que la estructura del eritrocito se fué perdiendo durante el tiempo de observación. Sin contraste de fase, el eritrocito no se ve, pero aquellos que están situados a su alrededor conservan claramente su morfología.

En otro parásito que se observó con contraste de fase, el eritrocito se veía perfectamente al principio, más oscuro que los demás, pero quince minutos después no fué posible observarlo, habiendo el Endotrypanum disminuido su movimiento y presentándose claramente redondeado. Además de la vacuola, apareció en la extremidad anterior una esfera rodeada por una tenue membrana clara, que pareciera ser el núcleo.

Esperando concentrar eritrocitos parasitados, centrifugamos sangre oxalatada, y tomando la parte superior más rica en leucocitos en la que esperábamos encontrar también mayor número de parásitos, hicimos preparaciones para realizar observaciones a fresco. El número de parásitos no fué mayor que en las preparaciones sin concentración, pero observamos una forma extracelular, con sus dos extremidades aguzadas, teniendo unas

dieciséis micras de longitud, por cinco de ancho en la parte media y presentando pocas granulaciones distribuidas por todo el citoplasma. Además, su flagelo con longitud igual a las dos terceras partes del cuerpo, era muy móvil, pero permanecía adherido a los eritrocitos sin poder trasladarse de un lugar a otro activamente como lo hacen las especies del género Trypanosoma. No pudimos distinguir la vacuola observada con tanta claridad en los ejemplares anteriores, ni otros detalles de la estructura interna. Sin contraste de fase se ve un citoplasma finamente granulado. En otra preparación del mismo material observamos otro parásito extracelular con movimientos flagelares muy activos, distinguiéndose la vacuola refringente rodeada de granulaciones oscuras.

2- Preparaciones teñidas

La observación de las formas parasitarias también está basada en el estudio de láminas coloreadas por el método Leishman-Giemsa, de sangre obtenida por punción venosa o cardíaca, ya que la piel de las extremidades es sumamente dura, lo que dificultó en parte la extracción de la muestra en ese sitio. Además, teníamos interés en conseguir suficiente material para realizar siembras en los diferentes medios de cultivo recomendados para la familia Trypanosomidae.

El tripanosómido de forma alargada en el interior de los

eritrocitos presenta la extremidad posterior redondeada y la anterior aguzada prolongándose por un flagelo que se adosa a la curvatura de la membrana del gíbululo, tal como se aprecia fácilmente en la Fig. N° 21. A pesar de que Darling (9) reporta y da esquemas en los cuales el flagelo sale visiblemente del eritrocito, no pudimos apreciar este fenómeno en preparaciones hechas inmediatamente después de la obtención de la sangre. En la extremidad anterior, confirmamos la presencia de una pequeña membrana ondulante bordeada en su parte superior por el flagelo, apreciándose nítidamente en algunos ejemplares Fig. N° 22. En el trabajo de Darling (9) se deja entrever la posibilidad de la existencia de esta membrana ondulante y Labernadie y Hubac (12) citan su presencia en algunos ejemplares observados por ellos. El flagelo se origina en el cinetoplasto, cuerpo baciliforme fuertemente coloreado situado a un lado y transversalmente al eje mayor del parásito.

La mayoría de los elementos presentan un núcleo generalmente esférico, bien definido, situado en la parte media o en la extremidad anterior del parásito, constituido por una cromatina fina con disposición radial. (Fig. 26) En algunos ejemplares se puede apreciar condensaciones de cromatina adheridas a la superficie interna de la membrana nuclear.

La situación del núcleo es sumamente importante para nosotros, ya que todos los autores que han trabajado sobre el tema lo sitúan en el tercio posterior, quedando el cinetoplasto anterior, dando como resultado formas de criticidia. En resumen podemos decir, que todas las formas encontradas en sangre han sido descritas hasta el momento como criticidias endoglobulares. Solamente Marquez da Cunha y Julia Muniz (8) reportan la presencia de escasas formas de tripanosoma en los medios de cultivo, aspecto que discutiremos en el capítulo correspondiente.

Hemos tenido la oportunidad de encontrar la mayoría de los parásitos como verdaderos tripanosomas, encontrando estas formas únicamente en las muestras de sangre de Choloepus donde realmente las criticidias observadas no pasan de un tres por ciento, tanto en frotis directo como en los preparados con sangre oxalada a temperatura ambiente.

Trejos y Montero-Gei 1953 (17) habían reportado ya la existencia del tripanosómico de Mesnil y Brimont en la sangre de Bradynus griseus griseus, material que tuvimos la oportunidad de estudiar nuevamente. Las formas de Endotrypanum schaudinni en la sangre del Bradynus capturado en la finca "La Lola" del Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas en la Provincia de Limón, fueron escasas. Llama la atención en este caso que

contrariamente a las formas encontradas en Choloepus, todas eran verdaderas critidias, con núcleo situado en la extremidad posterior y cinetoplasto anterior (Figs. 23 y 24). En la mayoría de las formas el citoplasma se colorea en azul pálido, presentando algunas veces manchas claras a semejanza de vacuolas, las que se sitúan cerca del núcleo o del cinetoplasto.

En otros parásitos se vieron claramente las granulaciones que se presentaban a contraste de fase muy refringentes, pero que en los frotis se ven intensamente teñidas, de preferencia en la extremidad posterior.

Con sangre oxalatada se notó un mejor desarrollo del flagelo a veces proyectado fuera del glóbulo, sin afectar su forma ni su contenido (Fig. 25). Dos minutos después a temperatura ambiente fué posible observar formas extracelulares, en las que se apreció perfectamente como el flagelo se origina del cinetoplasto y termina en la extremidad anterior bordeando la pequeña membrana ondulante (Fig. 26). Al contrario de lo que acontece con algunos esporozoarios el eritrocito no presentó pigmento alguno, ni cambios notables en sus características morfológicas. A pesar de que Mesnil y Brimont (15) reportan haber observado infección múltiple en un mismo eritrocito, no nos fué posible

a través de nuestras observaciones apreciar este fenómeno. Además, los mismos autores anotan la presencia de dos cuerpos alargados fagocitados por un monocito que suponen son parásitos, fenómeno éste que tampoco tuvimos oportunidad de confirmar.

Endotrypanum schaudinni en sangre periférica de
Cholepus hoffmanni

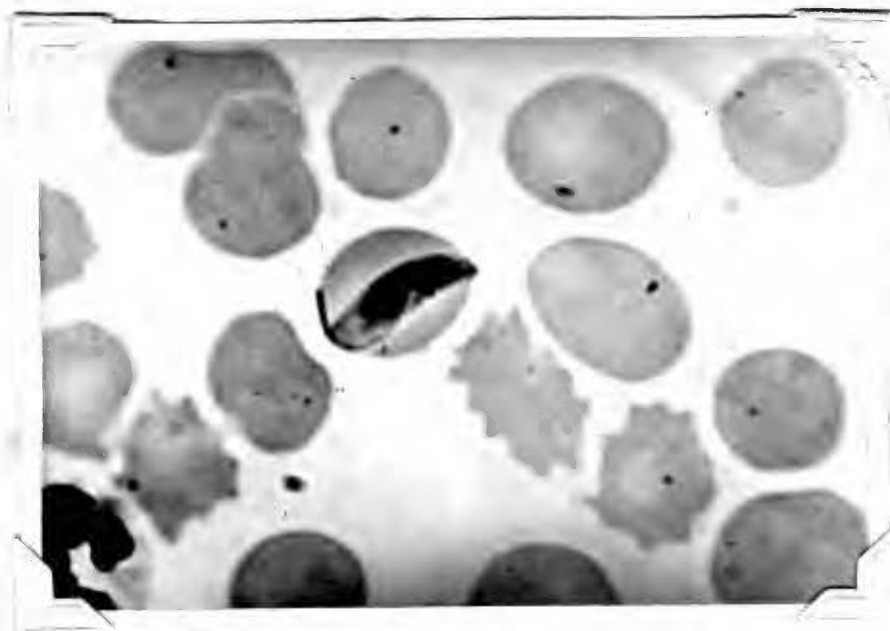


Fig. 21. Forma de tripanosoma. Nótese el flagelo adosado a la curvatura de la membrana del eritrocito. 1,425 X

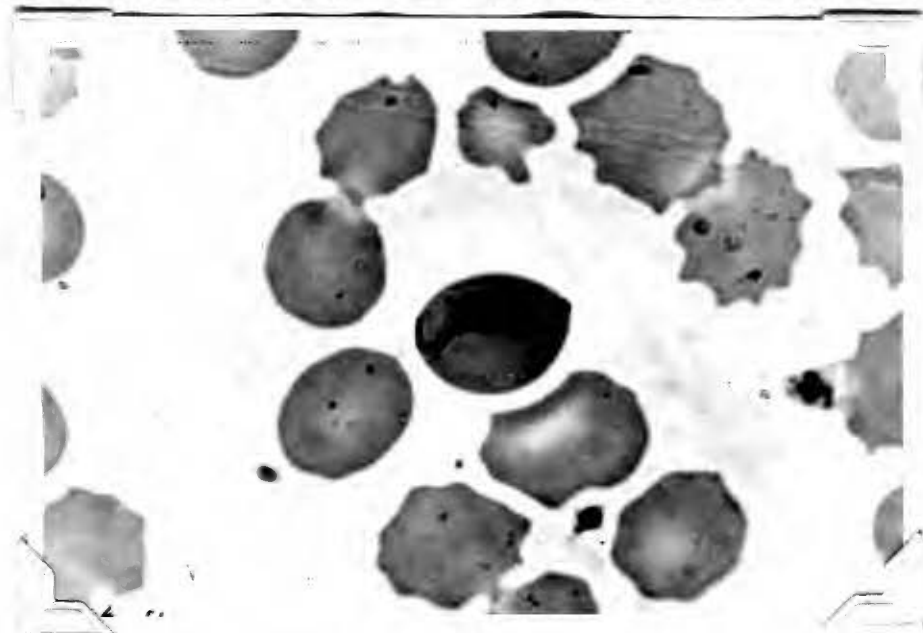
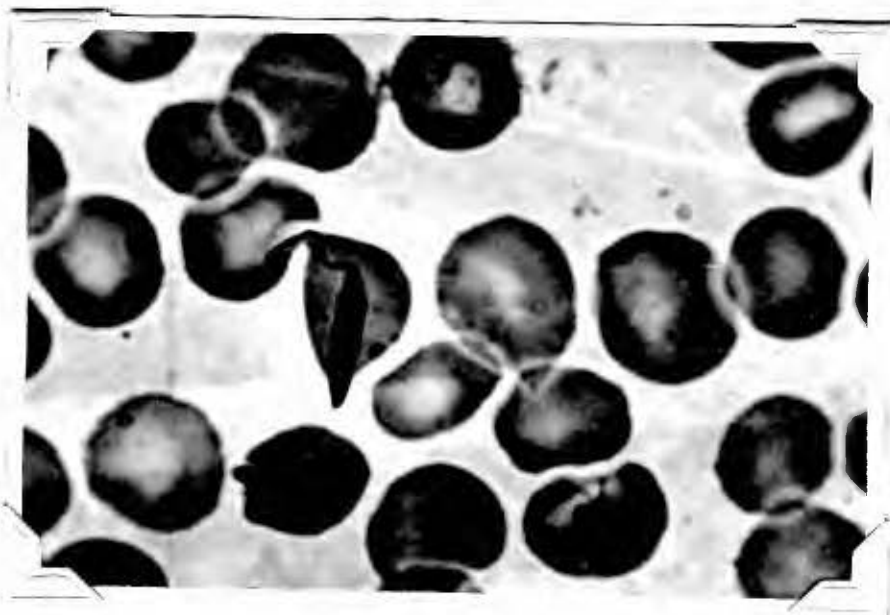
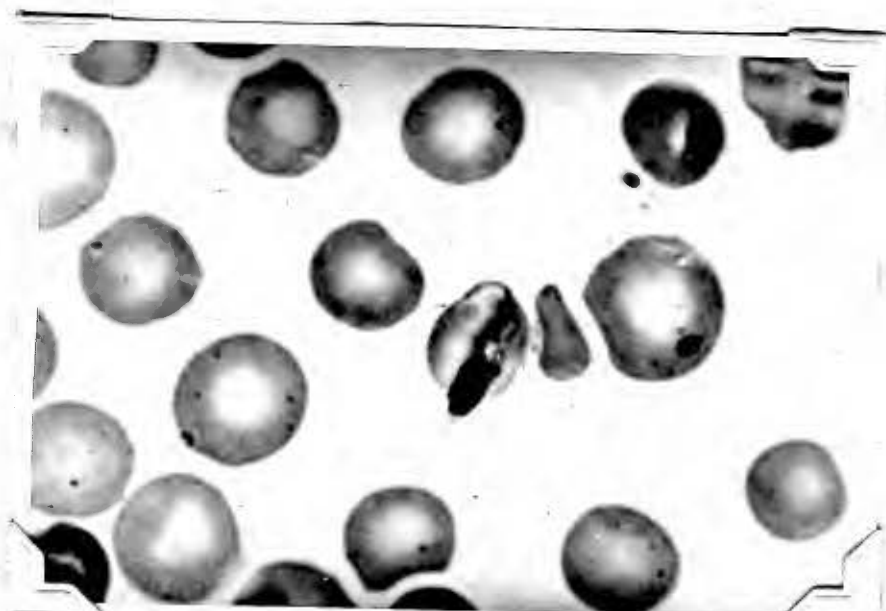


Fig. 22. Forma de tripanosoma. Membrana ondulante. 1,425 X

Endotrypanum schaudinni en sangre periférica de
Bradynus griseus griseus



Figs. 23 y 24. Critidias intracelulares. Cinetoplasto anterior al núcleo. 1,425 X



Endotrypanum schaudinni en sangre oxalada de
Cheloneus hoffmanni



Figs. 25. Flagelo proyectado fuera del eritrocito, 1,425

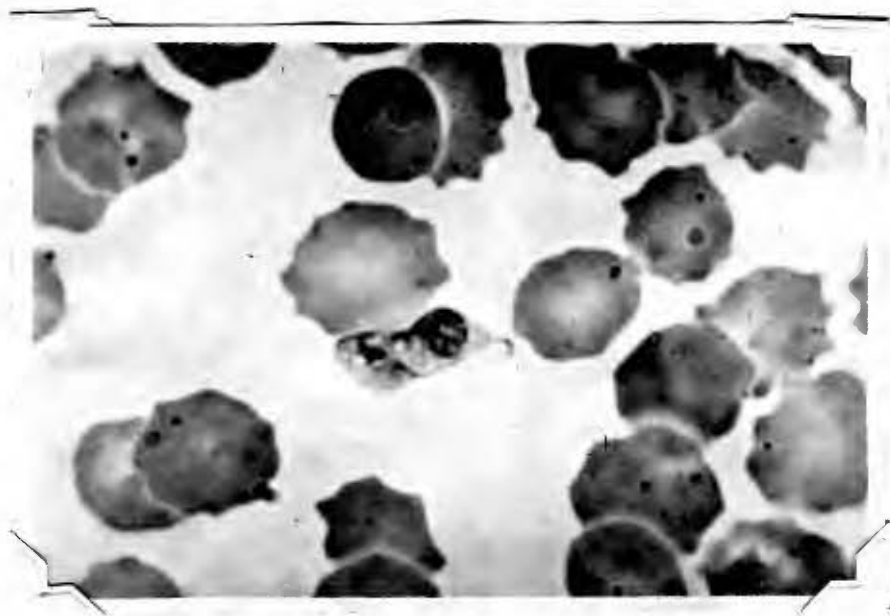


Fig. 26. Forma extracelular. Obsérvese origen del flagelo, 1,425 X

1.- En los medios de cultivo

En 1914 Darling (9) fué el primero que trató de cultivar este protozoario sembrando sangre obtenida por punción cordón en tubos de agar sangre incubados a temperatura ambiente y a 37°C. Sin embargo solamente observó formas en degeneración del parásito y nunca determinó la presencia en estos medios de formas procedentes de una activa proliferación del tripanosoma.

Marques da Cunha y Julio Hunit (8) reportan que en 1938 recibieron en la Sección de Protozoología del Instituto Oswaldo Cruz, de parte del Dr. Evandro Chagas, Director del Instituto de Biología Experimental del Norte en Belém, tubos de medio de Müller sembrados con sangre de Choloenus didactylus parasitado por Endotrypanum que presentaban abundante crecimiento sobre la superficie, constituido por flagelados con características de leptomonas.

Más tarde en 1941 el Dr. Emanuel Dias, en el Estado de Pará, tuvo ocasión de sembrar en el mismo medio sangre de otro Choloenus naturalmente infectado por Endotrypanum obteniendo por segunda vez cultivos abundantes de ese flagelado.

Con estas dos cepas los autores brasileños realizan experiencias inmunológicas en relación con otros miembros de

la familia Trypanosomidae, dando la descripción morfológica en los medios de cultivo. Las cepas aisladas en cultivo puro presentan un comportamiento idéntico en relación con los medios comúnmente usados para estos flagelados. El medio Agar Sangre Glucosado, al que se le agrega sangre de conejo o de caballo desfibrinada con pH final de 7.2 presenta después de tres a cuatro días de haber sido inoculado, un crecimiento exuberante en la superficie. La exuberancia de los cultivos sólo era comparable a la de ciertos flagelados de insectos, pertenecientes al género Herbertomonas. En medio de Noguchi el desarrollo se realiza en la capa superficial en donde se forma una zona intensamente turbia más o menos entre los cuatro a seis días de incubación a temperatura ambiente. En el medio de M.N.N. el desarrollo fué menos abundante, y el crecimiento no ocurría en la superficie, sino en el agua de condensación, en la que posteriormente se formó un depósito pulverulento. Los cultivos en aerobiosis se desarrollan a una temperatura entre 25 y 30°C, ya que a 37°C degeneran rápidamente hasta morir.

En el transcurso de nuestras investigaciones tuvimos la oportunidad de aislar en cultivo puro, cinco cepas de Endotrypanum schaudinnii cuatro de Cholacenus hoffmanni y una de

Bradypus griseus griseus.

Los medios usados para el aislamiento primario fueron: Agar Sangre Glucosado, Rugai y N.N.N.

a- Agar sangre glucosadoMedio base

Dextrosa..... 2 gm.

Agar..... 2 gm.

Agua destilada.....100 cc

Calentar hasta ebullición para disolver completamente el agar; distribuir en balones en cantidades de 50 cc y autoclavar a 15 libras de presión (121°C) durante 15 minutos.

Preparación

Licuar la base en baño maría, enfriar entre 45 y 50°C y agregar asépticamente sangre desfibrinada de conejo al 10 %. Distribuir en tubos estériles, inclinar y enfriar en baño de hielo para obtener mayor cantidad de agua de condensación. En algunas ocasiones agregamos a los tubos solución salina fisiológica estéril, cuando no presentaron suficiente agua de condensación.

Incubar a 37°C durante 48 horas para prueba de esterilidad. El desarrollo en este medio es bastante bueno, pero con ninguna de nuestras cepas fué posible obtener el abundante crecimiento de superficie, reportado por los autores brasileños.

El medio que nos ha dado mejores resultados por su abundante proliferación es el de Nagai (16) que ha sido empleado en la obtención de antígeno, para la intradermorreacción de Montenegro en el diagnóstico de leishmaniasis.

B- Medio de Nagai

I- Infusión de carne

Carne de buey sin grasa..... 1.000 gm

Agua destilada calentada a 80°C..... 1.000 cc

La carne molida y desengrasada, se deja en contacto con el agua agitando varias veces durante tres ó cuatro horas. El sobrenadante se decanta y el residuo se exprime a través de una toalla.

Reunir los dos líquidos y hervir durante 10 minutos para precipitar las albúminas. Filtrar y completar el volumen a 1.000cc con agua destilada. La infusión de carne se esteriliza en la autoclave a 110°C durante 20 minutos y se conserva en refrigerador.

Nosotros preparamos la infusión de carne a partir del Extracto de carne Difco al 0.5 % con lo que evitamos el procedimiento anterior, que no deja de ser molesto. La modificación nos ha dado muy buenos resultados y es por ello que la usamos desde hace tiempo en el Laboratorio.

II- Extracto de papa

Papas.....500 gm

Agua destilada.....1.000 cc

Pelar las papas y cortarlas en tiras finas de tres a cuatro mm. de espesor, suspenderlas en agua, y autoclavar a 110°C por 20 minutos.

Decantar el sobrenadante, lavar el residuo con agua destilada incorporando las porciones del lavado al líquido original hasta ajustar el volumen a 1.000 cc. Filtrar el líquido en caliente y esterilizar a 110°C por 20 minutos. Conservar en refrigerador.

Medio base

Agar..... 25 gm

Cloruro de sodio..... 12 gm

Infusión de carne (I)..... 250 cc

Extracto de papa (II)..... 80 cc

Agua destilada..... 1000 cc

pH final 6,6 - 6,8

Calentar hasta ebullición y esterilizar en autoclave a 121°C durante 20 minutos.

Agar Sengre de Russi

Licuar el medio base en baño maría; enfriar entre 45 y 50°C

y agregar asépticamente sangre desfibrinada de conejo en la proporción de 15 a 25 %.

Líquida de condensación.

Utiliza solución salina estéril al 1,2 %.

Incubar a 37°C durante 24 a 48 horas para prueba de esterilidad. Este medio fué escogido para el mantenimiento de nuestras cepas durante más o menos un mes, al final del cual efectuamos el trasplante correspondiente, y en esas condiciones hemos logrado mantener cepas durante 36 meses. El crecimiento en este medio es abundante, principalmente en el agua de condensación, ya que en la superficie crecen colonias pequeñas y transparentes, similares a las que presentan las especies del género Leishmania.

También empleamos medio de N.N.N. en aislamiento primario, pero no con iguales resultados.

La técnica consistió en la extracción de sangre de la vena cefálica del brazo con aguja hipodérmica N°22, o por punción cardíaca. Los medios fueron inoculados con tres ó cuatro gotas de sangre e incubados a temperatura ambiente, presentando más o menos entre el cuarto y quinto día un crecimiento fácilmente observable al examen microscópico en gota pendiente.

En vista de que el Bradyuz se encontró parasitado por

hemoflagelados de diferente "habitat": extra e intracelulares, se trató de hacer su separación con el objeto de obtener cultivo puro.

El procedimiento es el siguiente: extraer sangre por punción cardíaca, mezclar una parte con heparina y otra con oxalato de potasio. Centrifugar por 10 minutos a baja velocidad (1,000 r.p.m.) sembrar con pipeta Pasteur medio de Rugai con plasma y sedimento, agregando previamente 1,000 unidades de penicilina G, potásica cristalina por cada cc de medio, para controlar la posibilidad de contaminación bacteriana. El mismo procedimiento fué seguido con la sangre oxalitada. Los cultivos no presentaron ningún crecimiento de Trypanosoma legeri ni de Endotrypanum schaudinni por lo que dedujimos que ambos anticoagulantes y posiblemente el efecto físico de la centrifugación habían inhibido el crecimiento de los citados tripanosoma.

Observamos preparaciones a fresco de cultivos en medio de Rugai durante cuatro a seis días, a temperatura ambiente encontrando los siguientes elementos: formas leishmanioides de cuatro a seis micras de diámetro, sin flagelo libre e inmóviles; y formas redondeadas con flagelo corto, con predominio de formas alargadas que varían entre ocho y doce mi-

cras de longitud por dos de ancho, dotadas de un flagelo cuyo promedio de longitud oscila entre diez y veinte micras.

Estas formas recuerdan muy bien a las leptomonas, presentando movimientos flagelares muy activos que las hacen atravesar el campo microscópico con gran rapidez; presentan algunas de ellas citoplasma con gran cantidad de vacuolas a veces con cuerpos danzantes en su interior. Las granulaciones intracitoplasmáticas varían cuantitativamente en los diversos individuos siendo algunas refringentes o bien opacas.

No fué posible observar núcleo ni cinetoplasto aún en contraste de fase. En los cultivos jóvenes predominan las leptomonas que frecuentemente se reúnen formando rosetas de gran tamaño.

En los cultivos viejos la cantidad de formas leishmanioides aumenta, lo mismo que elementos en degeneración.

Basándonos en el movimiento nos fué imposible observar formas que pudieran ser consideradas como críditias o tripanosoma, lo que confirmamos en láminas preparadas a partir de colonias transparentes y superficiales, coloreadas por el método Leishman-Giemsa, y hematoxilina férrica, tratando de demostrar con esta última el núcleo vesiculoso de estos flagelados.

Las láminas preparadas a partir del agua de condensación no dieron buenos resultados, debido a la gran cantidad de pre-

capitado producido por la difusión de hemoglobina en contacto con el colorante. La técnica fué la de tomar con sumo cuidado las colonias transparentes de la superficie para realizar la coloración.

Todos los elementos presentan un núcleo con cromatina, distribuída en pequeños gránulos poco compactos, mientras que las formas en degeneración lo presentan picnótico y vacuolado. El proceso de división aparentemente se inicia por un estiramiento y estrangulamiento del núcleo, ya que no llegamos a apreciar procesos de verdadera mitosis.

El cinetoplasto baciliforme que en las formas de leishmania (Fig. 28) se sitúa a la par del núcleo, en las leptomonas se localiza en la extremidad anterior, punto en donde se origina el flagelo (Fig. 27). Formas en división fueron frecuentemente observadas y además, en menor número, elementos redondeados con un núcleo, y tres flagelos con sus respectivos cinetoplastos, a pesar de que en varias oportunidades observamos como el núcleo se divide antes que el cinetoplasto (Figs. 29 y 30). Desde luego las láminas coloreadas presentaron todas las formas intermedias entre leishmanias y leptomonas.

Las coloraciones con hematoxilina férrica se realizaron con la técnica siguiente:

Fijación.

- 1- Escoger un cultivo entre 4 a 5 días de incubación con abundante crecimiento.
- 2- Pasar el agua de condensación a un tubo de centrifuga.
- 3- Agregar formal fisiológico al 1 % con el fin de fijar los protozoarios antes de someterlos a la centrifugación, ya que si no se procede de esta manera, la morfología de los flagelados se muestra considerablemente alterada.
- 4- Suspender el sedimento en solución salina fisiológica con el objeto de eliminar la hemoglobina del líquido de condensación, y volver a centrifugar.
- 5- Hacer los frotis con el sedimento en cubre-objetos, adicionando una pequeña cantidad de albúmina de huevo.
- 6- Fijar en solución de Schaudinn a 60°C.

Coloración.

Antes de obtener láminas bien coloreadas se ensayan varias técnicas de tinción con hematoxilina, usadas para flagelados intestinales: hematoxilina de Mallory, modificación de James (4), método de Faust con hematoxilina férrica (4) método de tinción rápida de Noble, (5) método de Morris Goldman (14).

Con la tinción que se obtuvo mejores resultados, apre-

ciándose el núcleo, cinetoplasto, flagelo y estructuras citoplasmáticas fué con la hematoxilina férrica de Heidenhain (4), sin poder observar los núcleos vesiculosos, ya que en todas las formas de cultivo aparecieron como cuerpos compactos.

Marques da Cunha y Julio Muniz (8) reportan que en las preparaciones de cultivos por ellos estudiados, observaron raramente la existencia de verdaderas formas de tripanosoma con cinetoplasto en la extremidad posterior del parásito, membrana ondulante y flagelo libre. Sin embargo, en otro párrafo dicen textualmente: "En los cultivos de las dos cepas estudiadas por nosotros nunca tuvimos ocasión de observar formas de critidia! De esto se deduce que si realmente fueron formas de tripanosoma las observadas por los autores brasileños, éstas eran demasiado escasas, debido a que la fase anterior no fué reportada, lo cual va en apoyo de nuestra tesis, puesto que no encontramos en ninguna de las cinco cepas aisladas, formas en donde el cinetoplasto estuviera situado a la altura del núcleo o posterior a éste, eliminando así la posibilidad de reportar formas de critidia o de tripanosoma. Podría aducirse, tal como ocurre con especies del género Trypanosoma, que la constitución del medio influya en la mayor o menor producción de tripanosomas metacíclicos, pero no en este caso en el cual del todo no se presentaron.

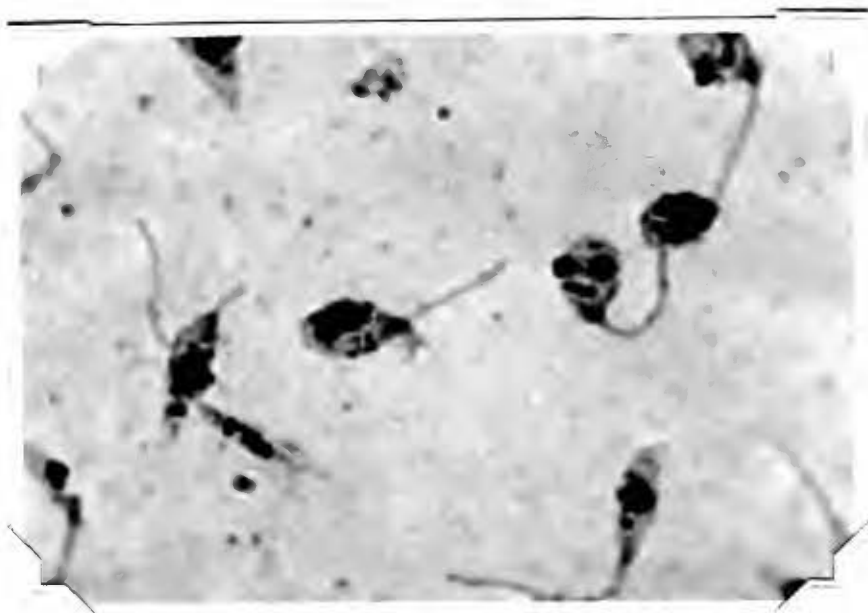
Formas de cultivo de Endotrypanum schaudinni
en medio de Nagai.



Fig. 27. *Leptomonas*, 1,425 X



Fig. 28. *Leishmania*, 1,425 X



Figs. 29 y 30. Formas en división de núcleo y cinetoplasto. 1,425 X



V CICLO EVOLUTIVO

a- Reproducción en el huésped vertebrado.

Estamos de acuerdo, al igual que otros autores, que Endotrypanum schaudinni no presenta formas de división en sangre periférica. En ningún momento durante el transcurso de las investigaciones hemos notado el menor signo de división en las estructuras que primeramente la inician como son el núcleo y el cinetoplasto.

Con la idea de que la división del flagelado se realiza en algún órgano íntimamente relacionado con el tejido sanguíneo, decidimos realizar esplenectomía y biopsia hepática a una hembra de Choloecus con abundantes parásitos, en sangre periférica. Al final de la operación, tuvo un accidente respiratorio del cual salió mediante respiración artificial, recobrándose luego completamente y retornando a su agresividad de siempre.

Con el material así obtenido se hicieron frotis por aposición y el resto fué fijado en formol al 10 % para estudio histológico posterior. Las preparaciones por aposición fueron coloreadas con Leishman-Giemsa sin observar las formas de división del tripanosómdo. Únicamente apreciamos algunas formas extracelulares que probablemente provenían de los eritro-

citos, muy abundantes en este material. En el bazo se notó abundante pigmento melánico que se forma posiblemente debido a la hemoglobina metabolizada por el parásito.

Al día siguiente, el Choloepus amaneció muy decaído y se le administró durante todo el día Prostigmina y suero fisiológico. Se le introdujo una sonda rectal sin resultado en cuanto a mejoría del meteorismo bastante acentuado. Dos días después de operado murió con fleo paralítico; se le practicó la autopsia con resultados negativos en cuanto a helmintos y protozoario del tracto digestivo. El muñón del bazo así como el hígado y la herida operatoria no sangraron. Preparamos frotis de médula ósea, riñón, cerebro y pulmón, sin haber encontrado en ninguno de ellos, evidencias de división del Endotrypanum schaudinni. Para realizar estudio histológico fijamos en formol los siguientes órganos y tejidos: músculo estriado, pulmón, piel, diafragma, vejiga, miocardio, aorta, estómago, diferentes porciones de intestino delgado y grueso, cerebro y placenta, ya que la hembra presentó el útero grávido con un feto que creemos tuviera unos cuatro meses.

Después de inclusión en parafina, el material fué cortado y coloreado con diferentes técnicas: hematoxilina y eosina y tricrómico de Gallego, no encontrándose nada que nos indicara

formas en división del flagelado.

También con el objeto de aclarar el ciclo evolutivo en el huésped vertebrado, realizamos la autopsia del Bradypus griseus griseus, con infección doble por Endotrypanum y T. legeri, que murió en el Laboratorio poco tiempo después de su captura. Para su estudio histológico, fijamos en formol: diafragma, estómago, vejiga, páncreas, bazo, hígado, glándula mamaria, músculo estriado, pulmón, riñón, mesenterio, miocardio, suprarrenal, intestino grueso y placenta ya que como en el caso anterior se trataba de una hembra grávida.

Una vez cortado y coloreado, el material se mostró negativo, a excepción del músculo esquelético proveniente de un pectoral, el que presentó varios nidos de parásitos (Fig.31).

La técnica usada en la coloración de los cortes fué la siguiente:

- 1- Desparafinar.
- 2- Hidratar.
- 3- Acido peryódico en solución acuosa al 1 %, 2 minutos.
- 4- Lavar.
- 5- Fucsina de Feulgen (Reactivo de Schiff) 20 minutos.
- 6- Lavar
- 7- Colorante de contraste Verde Luz al 5 % en solución acuosa, 5 minutos.

8- Lavar.

9- Deshidratar.

10- Aclarar en xilol.

II- Montar en bálsamo.

Se observaron elementos falciformes en los cuales se apreció bien el núcleo. Dichos nidos son de varios tamaños y en algunos cortes encontramos secciones que tenían hasta 93×465 micras. Pareciera que pueden alcanzar grandes dimensiones pues se ve la misma sección en varios cortes transversales, y de ser así estarían colocados longitudinalmente siguiendo el sentido de las fibras.

No fué posible observar con nitidez la presencia de cinetoplasto, razón por la cual no podemos afirmar que se trate de las formas tisulares de Endotrypanum o de Toxoplasma que no han sido señaladas anteriormente parasitando Bradypus. Además debemos recordar que este ejemplar presentó en su sangre periférica otro hemoflagelado.

Alrededor de los nidos no apreciamos ninguna reacción inflamatoria, y la ausencia de cápsula y trabéculas permite excluir la posibilidad de que se trate de Sarcocystis.

En los cortes con hematoxilina-eosina encontramos menos estructuras que en los coloreados con reactivo de Schiff, después

de hidrolizar con ácido peryódico. Los nidos observados con objetivo de inmersión se presentan como conglomerados de partículas azuladas de aspecto borroso, constituidos por cantidades enormes de parásitos, muy juntos unos de otros, razón por la cual no es posible individualizarlos y observar su estructura, lo que hace difícil asegurar si los elementos parasitarios tienen o no cinetoplasto.

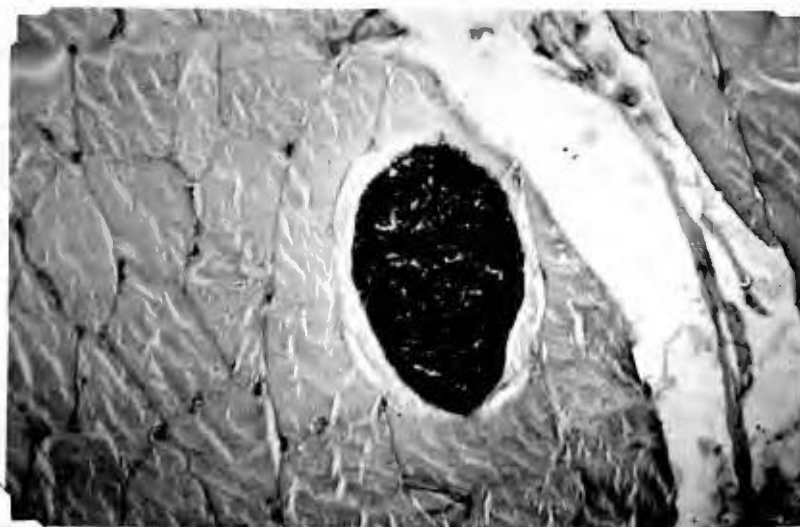


Fig. 31. Músculo de Bradypus griseus griseus, mostrando el aspecto de un nido parasitario. Col. con React. de Schiff y Acido peryódico, 375 X.

b- Salida de los eritrocitos

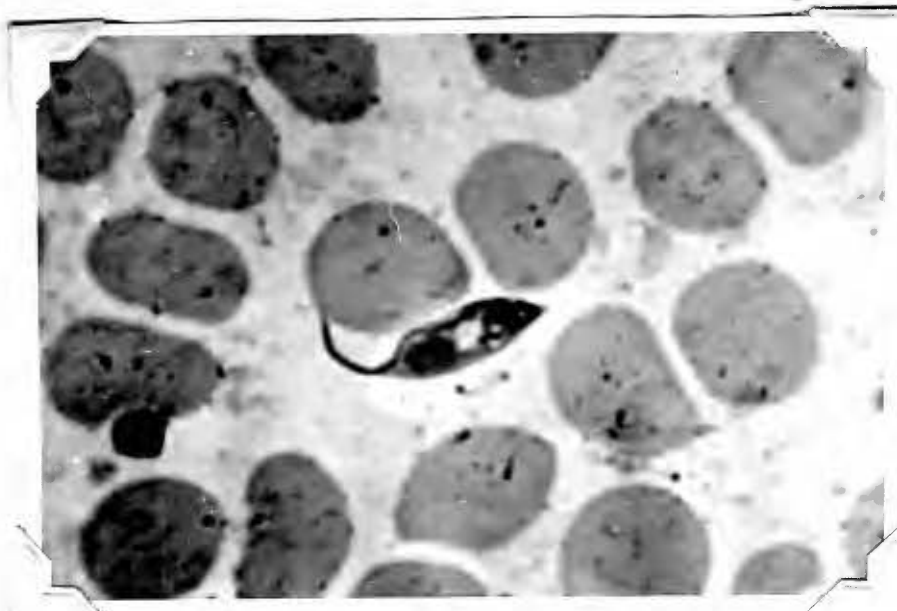
La presencia de formas extracelulares fué observada solamente en sangre que permaneció a temperatura ambiente, fenómeno que comprobamos durante el estudio de preparaciones entre lámina y laminilla, ya que al principio todos los elementos fueron intracelulares. Para comprobar lo observado anteriormente realizamos la siguiente experiencia: tomamos sangre oxalata-da de una hembra adulta de Cheloeus hoffmanni con abundantes parásitos en sangre periférica, para hacer frotis a los dos, diez, veinte, treinta, cuarenta, cincuenta minutos, una hora, hora y media y dos horas, manteniéndola a temperatura ambiente.

El examen microscópico de las láminas mostró que entre los veinte y treinta minutos los tripanosomas comenzaban a abandonar las células rojas; a las dos horas la mayoría de los elementos eran extracelulares y relativamente pocos permanecían aún dentro de los eritrocitos.

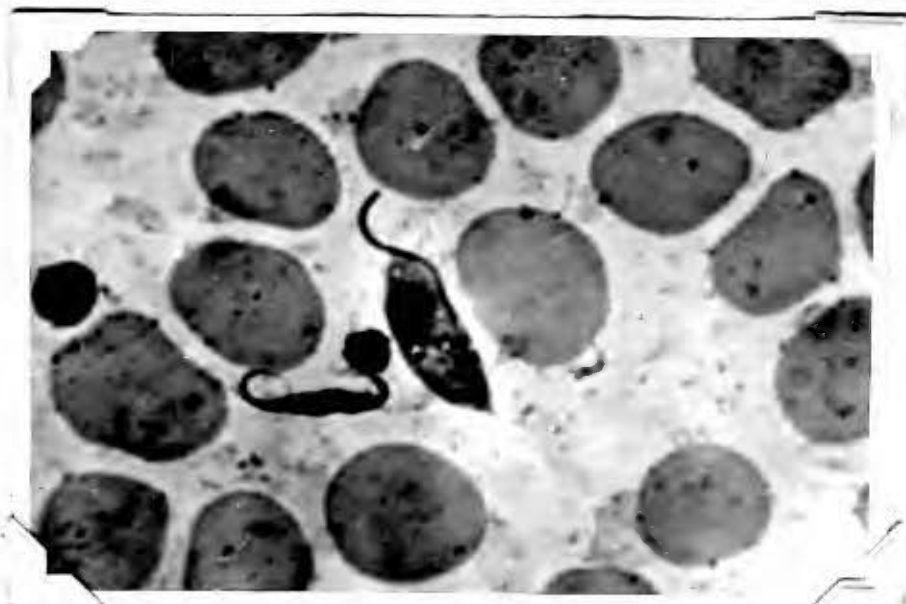
Es de interés anotar en este caso, que los parásitos extracelulares se colorean mejor que los intracelulares, apreciándose un mejor desarrollo del flagelo y membrana ondulante (Figs 32 y 33). El hecho de que en estas circunstancias desarrollen un mejor aparato locomotor , nos hace pensar en su ciclo evolutivo y en la posibilidad de que este fenómeno se lleve a cabo

en el tracto digestivo de algún artrópodo, que pueda servir como huésped intermediario.

Leishmanium schaudinni en frotis realizados con sangre oxalata, después de hora y media a temperatura ambiente.



Figs. 32 y 33. Formas de tripanosoma, mostrando un mejor desarrollo del aparato locomotor y citoplasma vacuolado, I.425 X.



c- Investigación sobre invertebrados transmisores

Con el fin de comprobar el posible papel de algún invertebrado hematófago en la transmisión de este flagelado, hemos investigado en estos desdentados la presencia de ectoparásitos.

En Choloepus hoffmanni solamente encontramos una garrapata del género Amblyomma, en un ejemplar capturado en Coris, Provincia de Cartago.

En la región del Tablazo de donde proviene el mayor número de ejemplares parasitados por Endotrypanum, no hemos determinado la presencia de ectoparásitos aún buscándolos inmediatamente después de su captura. Además, empleamos la trampa de Schannon con el objeto de capturar algún díptero o hemíptero hematófago de la región, que sirviera como transmisor de la parasitosis, pero los resultados siempre fueron negativos.

En Bradypus griseus griseus colectamos los siguientes ectoparásitos: Cryptoses choloepi Dyar (1908) insectos encontrados en gran cantidad en todos los ejemplares capturados viviendo en íntima relación con el desdentado y posiblemente alimentándose de pelos y escamas de su piel, abandonándolos en cautiverio (Fig 34).

Trichillum bradyporus Boucemont, y otro coleóptero de la familia Scarabaeidae que no fué posible clasificar.

El único ectoparásito hematófago examinando cuidadosamente con el fin de determinar su posible papel de huésped intermedio de este tripanosoma fué Amblyoma gertschi Cooley et Kohls, arácnido muy corriente en estos desdentados. Los ejemplares se colocan entre lámina y laminilla en solución salina fisiológica, y se trituran por compresión con el objeto de saber si contienen o no flagelados. Nuestra búsqueda fué infructuosa a pesar de que ellos se habían alimentado de un Bradynus que presentaba parásitos en su sangre periférica. Los artrópodos antes descritos habían sido clasificados ya por el Dr. Bequart del Museo de Zoología Comparada de Harvard (17).

Un hemíptero buscado infructuosamente fué Belminus costaricensis (11) ya que el primer ejemplar reportado en Costa Rica fué colectado en un "perezoso" por W. Schaus, en la región de Esparta. No se ha observado infección natural por tripanosomas en Belminus ni tampoco hemos tenido conocimiento de que se haya realizado la infección artificial en el Laboratorio. El hecho de que uno de los ejemplares de Costa Rica haya sido capturado sobre un "perezoso", no indica necesariamente su condición de parásito del vertebrado, ya que otros ejemplares se encontraron en nidos de Nasutitermes y Tricoma.

Resumiendo podemos decir que hasta el momento se descono-

ce la existencia de un invertabrado en el cual se realiza la evolución de Endotrypanum schaudinni y que actúe como su transmisor, pero basándonos en las características de la familia, creemos en su existencia, y desde luego seguiremos nuestras investigaciones en ese sentido.

Xenodiagnóstico

Marques da Cunha y Julio Muniz (8) partiendo de material de cultivo, hicieron experiencias para comprobar si estas formas eran capaces de sufrir adaptación o evolución en el tubo digestivo de Rhodnius prolixus. Para ello alimentaron numerosos ejemplares en varios estadios de evolución proveniente de criaderos en el laboratorio y libres de cualquier contaminación por flagelados, con una mezcla de dicho material y sangre de cebayo. Durante dos meses examinaron periódicamente el contenido de la última porción del intestino de los ejemplares, sin llegar a constatar la presencia de formas evolutivas del tripanosoma.

Realizamos xenodiagnóstico, con larvas y ninfas de Triatoma dimidiata y Triatoma infestans provenientes de nuestros criaderos, en un Choloecus con abundantes parásitos en sangre periférica.

El examen periódico del contenido intestinal de las triatomas se mostró negativo observándose únicamente con contraste de fase, en Triatoma dimidiata, elementos que por su forma tamaño y constitución podrían ser considerados como formas en degeneración de Endotrypanum schaudinni.

Veinticinco días después de la primera comida, las triatomas fueron nuevamente alimentadas en el mismo Choloepus con resultados siempre negativos.

Pareciera que el Endotrypanum schaudinni es incapaz de evolucionar en triatóminos, aunque para asegurarlo nos falta realizar algunas experiencias más.



Fig. 34. Crytosés choloepeí en un Bradypus recientemente capturado.

VI INOCULACIONES

a- En animales de Laboratorio.

Con relación a este punto, Darling (9) realizó la primera experiencia al inocular intraperitonealmente un Bradypus castaneiceps? joven, cuya sangre se mostró negativa por Endotrypanum y otros parásitos, con 2 cc de sangre cardíaca de un "peresoso" infectado con este flagelado. Los tripanosomas no aparecieron en su sangre periférica, aún cinco días después de la inoculación, período al final del cual el animal murió. El autor hace notar que posiblemente hubiese obtenido mejores resultados, de haber realizado la inoculación por vía intravenosa. Durante la autopsia no hubo evidencia de infección, y los frotis de las vísceras fueron negativos. Un perro, un gato, dos ratones blancos, dos cobayos y un conejo, fueron también inoculados dando resultados negativos después de haber sido examinados periódicamente durante dos meses después de la inoculación.

De esta serie de animales inoculados solamente un cobayo murió, presentando en los cortes de tejido muchos eritrocitos fagocitados y pequeñas áreas necróticas en el hígado, pero no parásitos.

Marquez de Cunha y Julio Muniz (8) partiendo de material proveniente de cultivos han realizado varias tentativas para

infectar diversos animales tales como: Bradypus tridactylus, Didelphis azarae, Mus musculus, y Leptodactylus ocellatus, por vía subcutánea, intraperitoneal e intravenosa, haciendo notar que algunos de estos animales habían sido esplenectomizados. Habiendo sido inoculados con grandes dosis de cultivo, todas las tentativas para transmitir la infección fueron negativas. Las investigaciones de diversos órganos, así como de fragmentos de tejido correspondientes a los puntos de inoculación en los casos de vía subcutánea, resultaron negativas. En este mismo material se observaron formas de parásitos en completa desintegración por los elementos de defensa.

A partir de sangre oxalatada de un Choloepus adulto con Endotrypanum se realizan inoculaciones por vía intraperitoneal, subcutánea e intramuscular en ratones y cobayos. Las preparaciones a fresco y coloreadas de sangre periférica de estos animales se mostraron negativas después de mantenerlos en observación por un largo período. Inoculamos también un Choloepus muy joven con 1 cc de sangre oxalatada, por vía subcutánea, manteniéndose negativo 25 días después de la inoculación, fecha en que el "perezoso" murió. En la necropsia no se encontró nada de particular obteniendo resultados negativos en la búsqueda de los parásitos.

Con formas de cultivo también realizamos inoculaciones en ratones jóvenes y cobayos, ya que podría pensarse que las formas sanguíneas de este protozoario no fueran infectantes, pero sí las de cultivo, semejantes a las que se desarrollan en el posible vector invertebrado. Sin embargo, los resultados fueron iguales a los anteriores, manteniendo el parásito gran especificidad hacia Bradypus y Choloepus.

Teniendo en nuestro Laboratorio un Choloepus macho adulto negativo por hemoflagelados tanto en preparaciones a fresco y coloreadas, como por hemocultivos, realizamos inoculaciones masivas con material de cultivo de la cepa N°5 mantenida en Rugai a temperatura de habitación durante seis días. La vía fué intravenosa y el inóculo de 10 cc, realizando en un lapso de dos meses, seis inoculaciones previa desensibilización. Después de la última inoculación el suero del animal presentó poder inmovilizante contra las formas de cultivo, lisándolas posteriormente.

La experiencia se realizó con una cepa mantenida por mucho tiempo en medios artificiales, ya que nos fué imposible trabajar con cultivos recientemente aislados como era nuestra intención, hecho que lamentamos profundamente ya que los flagelados podrían haber perdido adaptabilidad para su huésped vertebrado.

Como sabemos las cepas de los diferentes tripanosómidos pierden su virulencia cuando se mantienen por largo tiempo "in vitro" y sólo la conservan y aún la aumentan en el invertebrado transmisor.

Con el mismo material de la cepa N^o 5 se hicieron inoculaciones humanas (F.M.G.) utilizando 1 cc por vía intramuscular, observándose una reacción aparentemente positiva inmediata en el sitio alrededor del punto de inoculación, con eritema y aumento de temperatura, que desapareció después de 48 horas, mostrándose la piel aparentemente normal. A los veinticinco días el paciente denota malestar general, temperatura y sintomatología marcada del tracto digestivo, sin presentar parásitos en sangre periférica. En estas circunstancias se provoca un choque adrenalínico para contraer el bazo, tomando sangre 20 minutos después para preparación de láminas y hemocultivos, dando resultados negativos.

Además de la posibilidad de pérdida de virulencia de los tripanosómidos en los medios de cultivo, Becker y Col. de acuerdo con Von Brand (2) han demostrado la importancia de la dieta en los animales que van a ser inoculados con tripanosomas. La deficiencia de ácido pantoténico en ratas produce infecciones más intensas con Trypanosoma lewisi, y ya es conocido que

palomas con dieta exenta de complejo B, pueden adquirir infección por T. brucei para el cual, como se sabe, son normalmente resistentes. En otras palabras se ha demostrado experimentalmente la importancia que tiene el estado nutricional de un animal para adquirir la infección con tripanosomas, que naturalmente tienen como huésped otros animales, guardando para ellos una especificidad bastante grande. Otro factor digno de tomarse en cuenta es la edad de los animales inoculados, lo que nos ayudaría a explicar en parte, algunos puntos referentes a los resultados negativos en las inoculaciones de Endotrypanum schaudinni, en diferentes animales de laboratorio.

b- Embrión de pollo

Existiendo en la literatura reportes sobre el cultivo de tripanosomas en embrión de pollo, entre ellos Schizotrypanum orcesi Conejos 1948 (6) inculamos Endotrypanum en saco vitelino con la técnica siguiente: (Cox 1938) (7)

- 1- Emplear huevos embrionados de cinco a siete días de incubación.
- 2- Observar la movilidad del embrión y red de vascularización marcando con lápiz su posición, y la cámara de aire.
- 3- Desinfectar la región correspondiente a la cámara de aire con tintura de yodo.
- 4- Preparación del inóculo
- 5- Perforación a la altura de la cámara de aire, de unos 3 mm, rompiendo únicamente la cáscara y dejando intacta la membrana de la misma para evitar contaminaciones. Desinfectar de nuevo con tintura de yodo.
- 6- Introducir la aguja (nº 21) unos 3 cm. de profundidad y depositar el inóculo, que en este caso consistió de 0,5 cc de una suspensión de cultivo de E. schaudinni, de tercer pasaje, con 10 días de incubación a temperatura ambiente. El recuento en cámara cuenta glóbulos de la suspensión da un resultado aproximado de 10 millones de leptomonas por mm^3 .

7- Retirar lentamente la aguja y aplicar tintura de yodo en el sitio de inoculación.

8- Tapar el agujero con esmalte de uñas y llevar de nuevo los huevos a la incubadora.

Dos días después de la inoculación abrimos uno de los huevos con embrión móvil, realizando con este material observaciones a fresco y en preparaciones coloreadas, sin lograr poner en evidencia ninguna estructura reconocible como E. schaudinni. Abrimos otro huevo después de seis días de inculado y con once días de incubación, preparamos láminas de saco vitelino, corazón, cerebro, hígado, pulmón y membrana corioalantoidea, con resultados negativos.

VII REACCIONES INMUNOLÓGICAS

En el presente capítulo se hace un resumen y comentario sobre las experiencias de Marquez da Cunha y Julio Muniz (8) sobre el comportamiento de los cultivos de Endotrypanum schau-diini con relación a ciertas reacciones de inmunidad, con representantes de la familia Trypanosomidae, pertenecientes a los géneros Leishmania y Schizotrypanum.

En las reacciones de aglutinación se utilizan sueros específicos preparados en conejos por medio de inoculaciones por vía intravenosa de cultivos al principio muertos por formol y luego de suspensiones vivas. Las aglutininas se investigan utilizando siempre suspensiones vivas en suero fisiológico de las diversas cepas de flagelados, ya que las muertas por agentes físicos o químicos no se prestan para este estudio.

Las cepas usadas para ese fin, no presentaron el llamado tipo de aglutinación espontánea tan frecuentemente observado en estos tripanosómidos. La lectura de los resultados se realizó después de que la mezcla, antígeno anticuerpo, permaneció por dos horas en baño maría a 37°C. Los antígenos empleados en la reacción de fijación del complemento se preparan 24 horas antes de la reacción, a partir de suspensiones de cultivo en

solución salina fisiológica y conservadas durante ese tiempo en refrigerador.

Los cultivos de los diferentes flagelados se obtienen en medio de agar glucosado al 2 %, pH 7.2, al que se le adiciona sangre desfibrinada de conejo al 10 % o de caballo al 5 %. Las cepas de leishmania se cultivan en placas de Petri, tipo alto, presentando crecimiento abundante después de cinco a seis días a temperatura ambiente entre 22 a 25°C. Los cultivos de Endotrypanum se preparan en tubos de medio inclinado, los cuales se siembran con abundante inóculo, obteniéndose un buen crecimiento a los cuatro ó cinco días de incubación a temperatura de Laboratorio. Después de hacer las suspensiones en suero fisiológico se procede al examen microscópico, para comprobar la riqueza de los elementos flagelados.

Los cultivos de Schizotrypanum se preparan en frascos Erlenmeyer de 125 cc a los cuales se les agrega 50 cc de medio, cubriendo la superficie con el inóculo proveniente de tubos con medio de N.E.N., adicionando caldo glucosado. Después de seis a diez días de incubación a 29°C, se obtienen con esta técnica, cultivos ricos del protozoario.

Reacciones de aglutinación

La primera reacción se lleva a cabo utilizando un suero a-

glutinante preparado con una cepa de Leishmania visceral americana recientemente aislada, y un antígeno preparado con una suspensión de la primera cepa de Endotrypanum, denominada Endo I. Como testigo del poder aglutinante del suero se usó una cepa de Leishmania, visceral.

El antígeno homólogo aglutinó en dilución de 1:20.480 mientras que Endotrypanum no lo hizo en ninguna de las diluciones. Por medio de esta misma técnica un anti suero preparado con Leishmania brasiliensis no fué capaz de aglutinar la cepa Endo I, pero sí su antígeno homólogo, en dilución de 1:1.280.

Como uno de los autores (Cunha) había ya demostrado que las cepas de Leishmania mantenidas por largo tiempo en medios artificiales de cultivo, sufrían modificaciones en su estructura antigénica, de manera que un suero aglutinante preparado con una cepa vieja, y absorbido con una recientemente aislada, era capaz de seguir aglutinando a su antígeno, se realizan investigaciones para demostrar si esto mismo podría ocurrir con Endotrypanum. Con la cepa Endo I que venía siendo mantenida por tres años en medios artificiales se preparó un suero aglutinante. El suero así obtenido fué absorbido con la cepa Endo II recientemente aislada, observándose que no aglutinó más la Endo II con la cual se realizó la absorción, pero sí continuaba aglutinando la cepa

Endo I en títulos relativamente altos.

Después de tres años del aislamiento de la Cepa Endo II se repitió nuevamente la prueba de aglutinación utilizando el mismo suero anti Endo I, y se llegó a comprobar que la aglutinación realizada tres años atrás fué de 1:160, mientras que ahora aglutinaba en un título de 1:2,560.

El aumento del título en este caso puede ser atribuido a una modificación en la constitución antigénica de Endo II con la aparición de antígenos secundarios semejantes a los existentes tres años atrás en Endo I.

El comportamiento de los cultivos de Endotrypanum frente a un suero aglutinante para Schizotrypanum cruzi fué bien diferente con relación a los sueros específicos para Leishmania.

En esta experiencia se utilizó suero preparado con una cepa humana de S. cruzi, mantenida en cobayo y recientemente aislada en cultivo. El suero aglutinó en título relativamente alto de 1:640 a la cepa Endo I con que se trabajó en esa oportunidad.

Reacciones de Fijación del Complemento.

Por medio de este tipo de reacciones se observó el comportamiento de antígenos y sueros específicos preparados con las dos cepas de Endotrypanum en presencia de sueros específicos y antígenos de Schizotrypanum.

En una de las reacciones se utilizó antígeno de S. cruzi proveniente de una cepa aislada de Dasypus sp. mantenida por largos años en el laboratorio en medios artificiales.

Después de efectuar las reacciones cruzadas se llegó a la conclusión de que los antígenos de Endotrypanum y Schizotrypanum, son capaces de fijar el complemento en presencia de sueros específicos anti Schizotrypanum y anti Endotrypanum, presentando solamente variaciones en cuanto a la intensidad de la reacción.

VII CARACTERÍSTICAS DEL GÉNERO ENDOTRYPANUM

Mesnil y Brimont (15) manifiestan, que por el conjunto de sus características, Endotrypanum schaudinni recuerda a los tripanosomas y géneros cercanos. Por su parasitismo intracelular se asemeja a los hematozoarios, y por la forma alargada de su cuerpo y ausencia de pigmento a las hemogregarinas. En razón de lo que se sabe acerca de su "habitat", hay que pensar en crear para él un nuevo género que denominan Endotrypanum, para recordar sus dos características principales: ser intracelular, y poseer un flagelo bien definido.

Su existencia es un hecho en favor de la idea emitida por Schaudinn y expresada muy claramente por Hartmann sobre la relación filogenética entre los tripanosomas y los hematozoarios endoglobulares.

Darling (9) comenta el trabajo de Mesnil y Brimont diciendo que el famoso caso de afinidad entre los hemoflagelados y hemosporidios basado en el trabajo de Schaudinn ha sido desechado, y que la morfología y otros caracteres de Endotrypanum lo relacionan más al género Trypanosoma y Leishmania que a los hemosporidios.

El mismo autor manifiesta que el profesor Michin, es de

la opinión que el Endotrypanum, es probablemente la fase intracorpúscular de un tripanosoma libre en el plasma del mismo huésped. Sin embargo, hace hincapié en que es extraño que este tripanosoma libre no haya sido encontrado en los desdentados, ni animales inoculados. Desde luego el tripanosoma puede presentar una alta especificidad para su huésped vertebrado, motivo por el cual los animales inoculados no mostraron la infección.

Nosotros estamos de acuerdo con Darling, ya que en el transcurso de las investigaciones no hemos encontrado otro tripanosoma de los desdentados, excepto Trypanosoma legeri en Bradypus griseus griseus el que fué reportado originalmente en otro desdentado Tamandua tridactyla. En relación al tripanosoma extracelular visto por Mesnil y Brimont (1908) (15) en Choloepus didactylus, Trejos y Montero-Gei (17) lo relacionan con T. legeri encontrando un parecido grande con las formas cortas de este tripanosómido; excepto en lo referente a membrana ondulante, que no presenta el gránulo terminal del flagelo, ni adopta la forma en C, según se deduce del diseño de los autores ya mencionados.

Wenyon 1926 (19) considera este ejemplar idéntico a T. legeri

Darling comenta, que las formas de critidia sólo aparecen en los cultivos o huéspedes intermediarios de las especies del género Trypanosoma, o bien de las especies del género Critidia parásito de artrópodos, para relacionar el caso de Endotrypanum, que hasta ese momento sólo había presentado formas de critidia intracelulares. Sin embargo, nosotros reportamos la presencia de verdaderas formas de tripanosoma en este flagelado.

Al obtener Marques de Cunha y Julio Muniz (8) las formas de cultivo del tripanosómda se establecen sus características dentro de la familia Trypanosomidae. Nosotros diferimos con dichos autores al no encontrar las formas de tripanosoma en los medios de cultivo.

Podemos decir, que el género Endotrypanum presenta formas de leishmania y de leptomonas en los medios artificiales de cultivo, y formas de critidia y tripanosoma en el interior de los eritrocitos de sus huéspedes vertebrados. Desde luego, mientras no se conozca perfectamente su ciclo evolutivo no podemos dar sus características para establecer su verdadera posición dentro de la familia.

IX RESUMEN Y CONCLUSIONES

- 1- Se hace una revisión cronológica de la literatura existente sobre Endotrypanum schaudinni Mesnil y Brimont 1908, ordenando los conocimientos existentes sobre este interesante tripanosómico y aportando algunos más.
- 2- Se da posición taxonómica y características de sus huéspedes vertebrados, Bradypus y Choloepus, con algunas observaciones sobre su biología y distribución geográfica de los ejemplares capturados en nuestro país.
- 3- Se comunican algunos datos hematológicos indicando la importancia del diámetro y del volumen de los eritrocitos, aspecto que relacionamos con el parasitismo intracelular de este tripanosoma, que puede ser considerado para explicar el resultado negativo de las inoculaciones experimentales a otros animales. Se comenta el hecho de la regeneración de la serie eritrocítica lo mismo que el aumento y alteración del recuento diferencial.
- 4- Se observa la morfología del parásito tanto a fresco como en sangre coloreada, reportando por primera vez formas de tripanosoma en Choloepus hoffmanni.
- 5- Se reportan solamente formas intracelulares en las láminas

preparadas inmediatamente después de que la sangre fué obtenida.

- 6- Se describe la técnica y los diferentes medios de cultivo usados en el aislamiento primario del hemoparásito. Se observa la acción inhibitoria de anticoagulantes en los medios de cultivo.
- 7- Se realiza estudio de las formas de cultivo tanto en preparaciones a fresco como coloreadas, reportando en nuestras copas solamente formas de leishmania y de leptomonas. Se hace un comentario en relación a las formas de tripanosoma que habían sido reportadas por Marquez da Cunha y Julio Muniz (8).
- 8- Se realizan inoculaciones en diferentes animales de laboratorio con sangre de Cholacrus infectado y con formas de cultivo, sin lograr demostrar la infección en ninguno de ellos, posiblemente debido a su gran especificidad hacia los desdentados, lo que fácilmente se deduce debido a su estricto parasitismo intracelular. Además se comenta la importancia del estado nutricional de los animales a inocular.
- 9- Con material de cultivo se inocular un Cholacrus adulto y se realiza una inoculación humana, dando resultados negativos.

Podría pensarse en la pérdida de virulencia de la cepa "in vitro" o a una preiniciación del ejemplar adulto a la protozoosis.

- 10- Formas de cultivo recientemente aisladas, se inoculan en el saco vitelino de embrión de pollo, con resultados negativos.
- 11- Respecto a su ciclo evolutivo el parásito no presenta formas de división en la sangre periférica, no encontrándose en el estudio histológico sus formas tisulares. El hallazgo de nidos parasitarios en un pectoral de Bradytrus griseus griseus no nos aclara su evolución en el huésped vertebrado, debido en primer lugar a que el "perezoso" se encontraba parasitado con otro tripanosómido, y que en estas formas no fue posible demostrar la presencia de cinetoplasto, por lo que no se puede descartar la posibilidad de una Toxoplasmosis.
- 12- En sangre oxalada mantenida a temperatura ambiente los parásitos abandonan los eritrocitos y desarrollan un mejor aparato locomotor. Esto lo relacionamos con su ciclo evolutivo, ya que dicho fenómeno posiblemente se realice en el tracto intestinal de algún artrópodo que actúe como huésped intermediario.

- 13- Se colectan varios ectoparásitos entre ellos una garrapata del género Amblyoma, en Choloepus. En Bradypus se reportan varios artrópodos viviendo en íntima relación con el vertebrado: Cryptoses choleepi, Trichillum bradyporum y un coleóptero de la familia Scarabeidae. Además Amblyoma gertschi que fué estudiado cuidadosamente por ser el único hematófago.
- 14- Se busca infructuosamente un hemíptero, Belminus costaricensis, que había sido reportado en Costa Rica en un "perejoso". Aunque la búsqueda de un transmisor de esta parasitosis no haya tenido éxito, creemos en su existencia, y seguiremos nuestras investigaciones.
- 15- Se hace xenodiagnóstico en Choloepus, con Triatoma infestans y Triatoma dimidiata, sin lograr la evolución del parásito.
- 16- Se hace un comentario en relación a ciertas reacciones de inmunidad con los géneros Leishmania y Schizotrypanum. Las reacciones de aglutinación fueron negativas con Leishmania visceral americana y con Leishmania brasiliensis.
- 17- Las copas de Endotrypanum mantenidas por largo tiempo en medios de cultivo desarrollan antígenos secundarios, lo que fué demostrado con reacciones de absorción.
- 18- Con Schizotrypanum cruzi las reacciones de aglutinación y de fijación del complemento fueron cruzadas, lo que demuestra una mayor afinidad antigénica con este género.

19- Se citan las principales características del género Endotrypanum, sin poder dar definitivamente su posición dentro de la familia Trypanosomidae, por desconocer su ciclo evolutivo.

X BIBLIOGRAFIA

1. Abritton, E.

1952 Standard Values in Blood
Am. Inst. Biol. Sc. 199 pp.
Phil. & London W.B. Saunders Co.

2. Brand, T. von

1952 Chemical Physiology of Endoparasitic
Animals. Academic Press, Inc. Publis-
hers N.Y. 339 pp.

3. Carballo, R.J.

1955 Patología Psicosomática
3ª ed. Editorial Paz Montalvo. Madrid.
1134 pp.

4. Craig, C.F.

1948 Laboratory Diagnosis of Protozoan
Disease. 2ª ed., 348 pp. Lea & Febiger
Ed. Philadelphia.

5. Craig, C.F. & E.C. Faust.

1951 Parasitología Clínica
Trad. 4ª ed. inglés por Beltrán E.
& L. Mazzoti. 682 pp. U.T.E.H.A. México.

6. Conejos, M.

1948 Cultivo de Schizotrypanum cruzi en
embrión de pollo. Separata An. Inst.
Med. Reg. 2 (2).

7. Cox, H.R.
1938 Use of yolk sac of developing chick embryo as medium for growing rickettsiae of Rocky Mountain, spotted fever and typhus groups. Publ. Health, Rep., 53: 2241-2247.
8. Cunha, A.M.da, & J. Muniz
1944 Pesquisas sobre o Endotrypanum schaudinni Mesnil e Brimont, 1908 parasita do Choloepus didactylus (L.) Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 41 (1): 179-194.
9. Darling, S.T.
1914 The Endotrypanum of Hoffman's Sloth. Jour. Med. Res. XXXI: 195-203
10. Goodwin, G.G.
1946 Mammals of Costa Rica. Bull. Am. Mus. of Nat. Hist. N.Y. 87 (5): 351-354
11. Herrero, A. H. Lent, & P. Wygodzinsky
1954 Contribución al conocimiento del género Helminus Stal, 1859. (Triatominae, Reduviidae, Hemiptera) An. Inst. Med. Neg. 4 (1) 85-105
12. Labernadie, V.G.F. & Hubac
1925 Sur l' Endotrypanum schaudinni de l'onau, édenté de la Guyane (Choloepus didactylus) Compt. Rend. Soc. Biol. LXXXVIII 664.
13. Miller, Jr. & H. Kellogg.
1955 List of North American Recent Mammals. U.S.A. Nat. Mus. Bull. 205

14. Morris, G.
1949 A Single solution iron-hematoxilin stain for intestinal protozoa. *Stain Technology* 24 (1): 57-60
15. Mesnil, F. & E. Lrimont.
1908 Sur un hematozoire nouveau (Endotrypanum n. gen.) d'un édenté de Guyane. *Compt. Rend. Soc. Biol.* 65. 581-583.
16. Rugai, E.
1941 Cultura das leishmanias. *Rev. Inst. Adolfo Lutz* 1 (1) 153-159.
17. Trejos, A. & F. Montero-Gel.
1953 Estudios sobre tripanosómidos de Edentata en Costa Rica, I Trypanosoma legeri en Bradypus griseus griseus. *Rev. Biol. Trop.* 1 (1): 21-27
18. Wenyon, C.N. & H.H. Scott.
1925 Endotrypanum schaudinni in the two-toed sloth. *Trans. Roy. Soc. Med. & Hyg.* XXIX: 280-281
19. Wenyon, C. N.
1926 *Protozoology*. 2 Vols. XVI IX-1563 pp. Bailliere, Tindall & Cox London.