

VARIACIONES HEMATOLÓGICAS EN OVEJAS INFECTADAS EXPERIMENTALMENTE CON *TRYPANOSOMA VIVAX*.

Hematologic variations in experimental *Trypanosoma vivax* infection in sheep.

Sandoval, E.*
Espinosa, E**
Valle, A.***

* Estación Experimental Falcón. Coro. Estado Falcón.
** Universidad Simón Rodríguez. Núcleo El Cují, Caracas.
***CENIAP. Departamento de Estadística e Informática.
Estado Aragua.

RESUMEN

Con el objeto de conocer la fisiopatología de la anemia que un aislado venezolano de *T. vivax* provoca en pequeños rumiantes, 9 ovejas mestizas West-African de 2 años de edad y $25,9 \pm 3$ kg promedio de peso, se seleccionaron con el uso de la tabla de números aleatorios. Los seis primeros lugares correspondieron a animales que fueron inoculados por vía intravenosa, con 1 ml de sangre conteniendo aproximadamente 3×10^6 parásitos, provenientes de un caprino positivo; las 3 ovejas restantes fueron consideradas controles. Las variables: parasitemia, hematocrito, hemoglobina, eritrocitos, haptoglobina y hierro sérico, fueron evaluadas durante 120 días. El comportamiento clínico de la enfermedad refleja una fase aguda, una subaguda y una crónica. Durante la fase aguda la disminución del hematocrito, hemoglobina y eritrocitos, concomitantemente a la detección del parásito en sangre, relacionan a éste o sus productos con la disminución de los niveles de haptoglobina y el establecimiento de una anemia de tipo hemolítica intravascular. Evidencias posteriores de eritrofagocitosis y hemosiderosis indican la participación de eventos hemolíticos extravasculares. Esta anemia, desde el punto de vista morfológico, corresponde a la clasificación de normocítica normocrómica, la cual hacia el final del período de observación, tiende a ser microcítica hipocrómica, debido probablemente a la disminución de hierro sérico. La complejidad del cuadro patológico obtenido, sugiere la continuidad de estos estudios y su validación en medio real.

Palabras claves: Fisiopatología, anemia, *Trypanosoma vivax*.

ABSTRACT

Physiopathological variations of the anaemia that an Venezuelan isolated of *T. vivax* produces in small ruminants was estimated in 9 randomly assigned crossbred West-African ewes, that averaged 2 year old and 50.2 ± 6 lb of body weight. The first six ewes were intravenously inoculated with 1 ml of a positive goat blood that contained approximately 3×10^6 parasites; the other 3 ewes were used as a control group. Parasitaemia, hematocrit, haemoglobin, erythrocytes, haptoglobin and serum iron variables were evaluated during 120 days. Clinical performance of sickneees showed all acute, subacute and a cronic phases. Reduction of haematocrit, haemoglobin and erythrocytes on the acute phase, concomitant to blood detection of the parasite, was related to reduction of haptoglobin level and establishment of a intravascular haemolytic anaemia. Later detection of erythrophagocytosis and haemosiderosis showed a participation of extravasculars hemolytic events. Morfologically the anemia can be classified into the group normocytic and normochromic; however, toward the end it tends to be microcytic and hipochromic, which can be due to serun iron reduction. Complexity of pathological signs suggest continuity of this study and real environment evaluation.

Key words: Physiopathology, anaemia, *Trypanosoma vivax*.

INTRODUCCION

Las tripanosomiasis son un grupo de enfermedades parasitarias causadas por protozoarios que habitan en la sangre, ganglios linfáticos y diversos tejidos del hombre y de los animales domésticos y salvajes [19, 33, 37, 73]. Los animales sal-

vajes por lo general sirven como reservorio de las infecciones [39, 40].

La anemia es el carácter fundamental de la enfermedad causada por infecciones con *T. vivax*, *T. congolense* y *T. brucei*, en bovinos, ovinos y caprinos. Se define como una disminución del número de eritrocitos circulantes en la sangre o una reducción del contenido de hemoglobina (Hb) en esta célula o ambos factores a la vez [38]. La mayoría de los autores coinciden que la anemia es un hallazgo clínico común en las tripanosomiasis de los bovinos y otros rumiantes [6, 14, 48, 50, 64, 74].

En los animales domésticos y salvajes (reservorios de la enfermedad), el *T. vivax* desarrolla un cuadro anémico en los animales infectados, como consecuencia de pérdidas sanguíneas, acelerada destrucción de los glóbulos rojos, o una disminución en la producción de eritrocitos en la médula ósea [16, 38].

De Diego y col. [13]; Holmes [34]; Suliman y Feldman [68] y Welde y col. [76], opinan que el cuadro anémico es un proceso complejo multifacético y multifactorial, el cual involucra hemólisis intra y extravascular, hemodilución, disminución o inhibición de la eritropoyesis y hemorragias en diferentes sitios de la estructura orgánica. Esieyo y col. [21] fueron del criterio que en infecciones con *T. vivax* existen suficientes indicios para sospechar de la ocurrencia de hemólisis intravascular.

El presente estudio plantea como objetivos, conocer los cambios hematológicos que un aislado venezolano de *T. vivax* provoca en ovejas empleadas como modelo experimental.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para el ensayo se utilizaron nueve ovejas hembras mestizas de la raza West-African, con una edad de dos años y un peso promedio de $25,9 \pm 3$ kg. Mediante el uso de la tabla de números aleatorios [7] se asignaron los seis primeros lugares a los animales inoculados y los tres restantes a los animales controles. Ambos grupos fueron aislados en locales separados. La alimentación consistió en heno, pasto picado, alimento concentrado, sales minerales y agua *ad libitum*.

Un ml de sangre fresca proveniente de un caprino positivo (++++), detectado por la técnica de Woo [77], conteniendo aproximadamente 3×10^6 *Trypanosoma vivax*, fue inyectado a las ovejas del estudio. El caprino había sido inoculado previamente con un estabilizado de *T. vivax* en dimetil sulfóxido, criopreservado en nitrógeno líquido a -196°C . La dosis total de inoculación fue estimada por medio de un hemocitómetro con el empleo de solución fisiológica en una dilución (1:10), según la metodología de Parra y Vizcaino [63].

El seguimiento de la infección por *T. vivax* se hizo a través de la obtención de muestras de sangre de la vena yugular con (EDTA)* como anticoagulante; cada tres días durante las

primeras ocho semanas de post-infección y luego semanalmente en las 4 semanas restantes. La técnica aplicada para la determinación de la parasitemia comprendió el procedimiento de la microcentrifugación [77].

El recuento total de los eritrocitos se realizó mediante el hemocitómetro, empleando como solución diluyente citrato de sodio al 3% [11]. El hematocrito (Ht) fue determinado por el método de la microcentrifugación, con el empleo de una microcentrífuga clínica (Clay Adams, Autocrit Ultra 3). La hemoglobina (Hb) se cuantificó espectrofotométricamente (Spectronic 700) por el método de la cianometahemoglobina [66]. Los índices eritrocíticos fueron calculados con el empleo de las fórmulas convencionales disponibles para tal fin [5].

En el análisis de la haptoglobina, se empleó un principio espectrofotométrico simple descrito por Calhoun y Englander [10]. El método empleado para la determinación del hierro sérico fue el método de Goodwin modificado por la firma Labtest [33].

Se efectuó la necropsia en los animales muertos en el curso del ensayo. Se tomaron muestras de hígado, ganglios linfáticos, bazo, corazón, riñón, intestinos y pulmón para su estudio histológico. Se fijaron en formalina al 10%, tiñendo cortes de parafina de 5-6 μm de grosor con hematoxilina y eosina.

Los valores obtenidos fueron comparados mediante la prueba "t" de student para muestras independientes, efectuándose además análisis de correlación lineal de Pearson entre los valores de las variables estudiadas, en todos los análisis se utilizó un nivel de significancia máximo de 5% ($P < 0,50$).

RESULTADOS Y DISCUSION

El período de incubación promedio para las ovejas inoculadas fue de 4 días, patencia que coincidió con los rangos reportados por Espinoza [27], Espinoza y Tortolero [26] y González [31], quienes trabajaron con el mismo aislado de *T. vivax*. La parasitemia de estos animales fue de curso ondulante, con altos niveles de tripanosomas durante las cuatro primeras semanas de la infección, para posteriormente mostrar en el resto del ensayo, fluctuaciones individuales que variaron cualitativamente entre una + y ++++ TABLA I.

Con respecto a los parámetros hematológicos se evidencia que en el período de preinfección, tanto en las ovejas inoculadas como en las que sirvieron como controles, el conteo promedio semanal y grupal de los eritrocitos fluctuaron entre los intervalos superior e inferior citados como fisiológicamente normales en la literatura [5, 9, 66]. La masa de eritrocitos disminuyó en las ovejas inoculadas, una vez diagnosticada la patencia del *T. vivax* en sangre periférica. Esta disminución estuvo enmarcada en el orden de un 30% FIGURA 1, en comparación a la media grupal de los animales controles en el período de post-infección. Se pudo observar para la segunda semana de la infección, valores en los glóbulos rojos de 6,5 teras/litro, lo

* Etilendraminotetra acético

TABLA I

PARASITEMIAS POR LA TÉCNICA DE WOO (1969), EN LAS OVEJAS
INFECTADAS EXPERIMENTALMENTE CON *T. VIVAX*.

Días	Ovejas						
	1	2	4	6	8	9	
4			+		+	++++	
7		+++	+++	+++	+++	+++	
12	+++	++++	+	++++	+++	+++	
15		+++	+++	++++	+++	+++	
20		+++	-	+++	+++	++++	
23		+++		++++	+++	+++	
27	+++	+++	+	++++	+++		
31		+			+++	+	
37	-	-	-	-	+++	++++	
45	-	-		-	+++		
54	-	-		++++			
61	-	++++		-	-		
69	-	-	-	-			
76	-	-	+	+			
84	-	-	-	-			
92	-	-	+	+++			

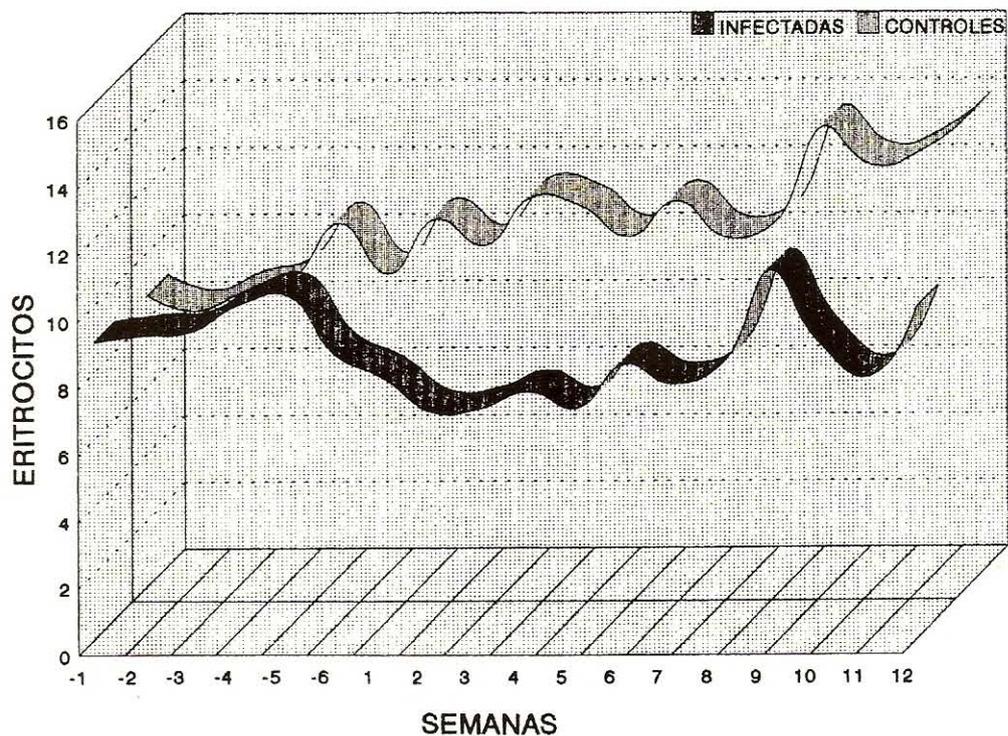


FIGURA 1. PROMEDIOS SEMANALES DE ERITROCITOS EN OVEJAS INFECTADAS EXPERIMENTALMENTE CON *T. VIVAX* Vs CONTROLES, DURANTE LOS PERÍODOS DE PRE Y POSTINFECCIÓN

que señala que en la fase aguda de la parasitosis se produjo la mayor destrucción de glóbulos en los animales infectados, lo cual por lo general coincidió con la instauración del primer pico de parasitemia en las ovejas infectadas. Se demostró diferencia significativa ($P < 0,05$) entre las medias grupales, en la 3, 4, 5, 7 y 8 semanas del período de post-infección y en la comparación de la media del período de pre y post-infección para el grupo infectado, así como en el promedio grupal general de las ovejas infectadas y controles ($P < 0,01$).

Bajas notables en el número de eritrocitos se han señalado en diversas publicaciones, ejemplificándose aminoraciones en más de un 50% en diferentes rumiantes (bovinos, ovinos y caprinos), infectados natural o artificialmente con *T. vivax*, *T. congolense* y *T. brucei* [1, 4, 16, 17, 24, 27, 28, 29, 36, 44, 47, 51, 53, 70].

Hacia el final de la fase de infección en las ovejas enfermas, se notó cierta tendencia de recuperación en el promedio semanal de los eritrocitos, tal como sucedió en la novena semana de infección, cuyo valor estuvo por encima de la media de los animales controles, para posteriormente tratar de estabilizarse, en una cifra cercana a los valores obtenidos para ambos grupos en el período de preinfección FIGURA 1.

El valor del hematocrito (Ht), semejante al de glóbulos rojos, descendió entre un 25 y 30% en comparación al valor promedio del período de preinfección y de la media grupal de los controles, respectivamente, Figura 2. Con relación a la etapa de preinfección, no se evidenció diferencia significativa entre la comparación de las medias del grupo infectado y control.

Los valores más bajos del Ht, se presentaron en las semanas segunda, séptima y octava del período de post-infección, con un valor del 20%. Disminuciones drásticas en el hematocrito se han reportado en trabajos de otros investigadores [4, 15, 36, 44, 51, 60, 68, 70].

Espinoza [27] cuando trabajó con la misma cepa del *T. vivax*, en bovinos *Bos Taurus*, inoculados experimentalmente, observó un comportamiento más dramático en relación al descenso del parámetro hematocrito en la fase inicial de la enfermedad, ya que sus datos indicaron una disminución entre el 51 y 66%, en comparación al valor de preinfección de los animales infectados y el promedio de los bovinos controles; no obstante, González [32] y González y Espinoza [31] trabajando con vacas mestizas Holstein-Cebú con el mismo estabilizado de *T. vivax*, observaron una disminución moderada del Ht, el cual estuvo alrededor de un 10% en promedio y que fue explicada por la utilización de animales con sangre *Bos indicus*, gé-

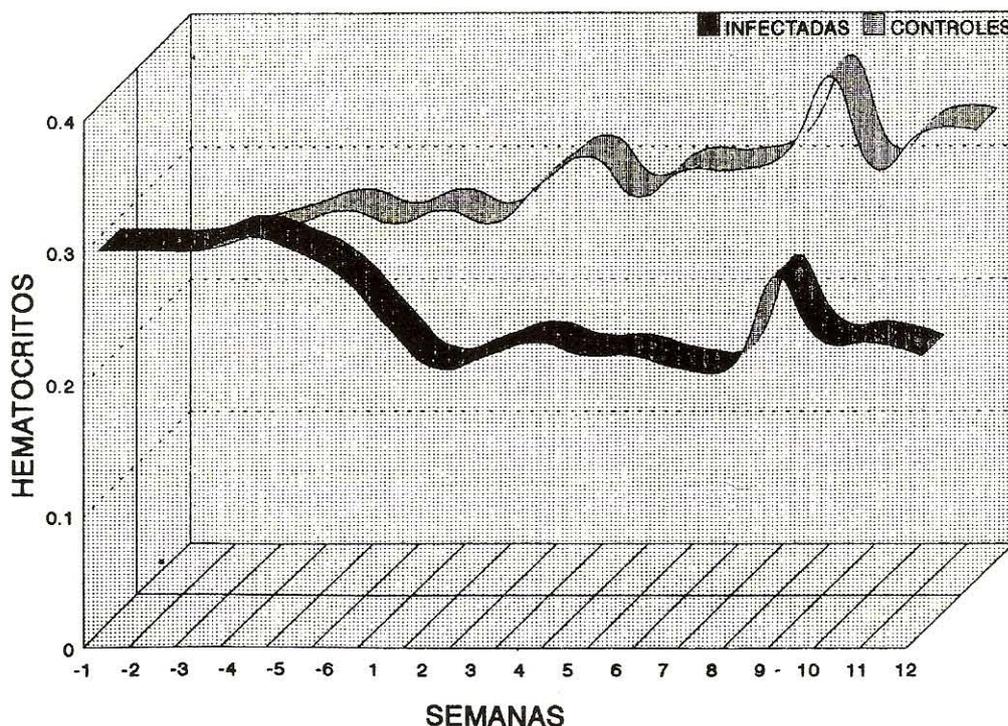


FIGURA 2. PROMEDIOS SEMANALES DE LOS HEMATOCRITOS EN OVEJAS INFECTADAS EXPERIMENTALMENTE CON *T. VIVAX* Vs CONTROLES, DURANTE LOS PERÍODOS DE PRE Y POSTINFECCIÓN

nero citado en la literatura como más resistente a las hemoparasitosis tropicales [56, 62].

El comportamiento o la variación patológica observada en relación al hematocrito, confirma para el manejo de aislados venezolanos de *T. vivax*, lo expuesto sobre la capacidad de los hospedadores de resistir o atenuar los daños del parásito, de acuerdo a la raza, especie o estado nutricional de los animales afectados por la tripanosomiasis; inferencia adicionalmente soportada por la utilización de animales mestizos West African [16, 30, 55].

Similarmente a los eritrocitos y al hematocrito, los descensos patológicos de los valores de la hemoglobina porcentualmente fueron en las ovejas parasitadas de un 31%. La disminución en las medias semanales fue de manera progresiva, con oscilaciones moderadas y alcanzando su nivel más bajo (63 g/l) en la octava semana, Figura 3.

No hubo diferencias significativas en el período de preinfección entre las medias de ambos grupos. Sin embargo, a partir de la primera semana de la etapa de infección, se evidenció diferencias significativas ($P < 0,01$ y $0,05$) entre las medias semanales y media grupal de los animales. Estos resultados coinciden con los de Toro y col. [69], quienes reportaron en su investigación con un aislado venezolano de *T. vivax*, dis-

minución entre 33,9 y 41,3% del valor de hemoglobina en ovejas previamente protegidas con quimioprolácticos y en ovinos no protegidos, descensos de la Hb en un 49%. Los mismos autores y Espinoza [27] reportaron para bovinos, caídas porcentuales en el orden del 56,1 al 64,5%.

De igual manera, autores que han trabajado en infecciones experimentales con *T. vivax*, *T. congolense* y *T. brucei* en ovejas y cabras, indican decrecimiento porcentuales (19-40%) en los niveles de hemoglobina en los animales afectados [36, 45].

La concentración promedio semanal de haptoglobina durante el período de pre y postinfección, en las ovejas infectadas y las controles fluctuaron dentro de un rango de 20,3 mg/dl y 86,4 mg/dl, respectivamente. Una vez que se instauró la patencia de la tripanosomiasis y concomitantemente se iniciaron los descensos de los valores de eritrocitos, hematocrito y hemoglobina, se presentó de manera paulatina una disminución de los valores de haptoglobina (Hp) en los animales infectados, Figura 4, evento que ocurrió particularmente durante las tres primeras semanas del período de post-infección.

Los valores promedios de la Hp resultaron con diferencia significativa ($P < 0,05$), cuando se compararon entre sí, con

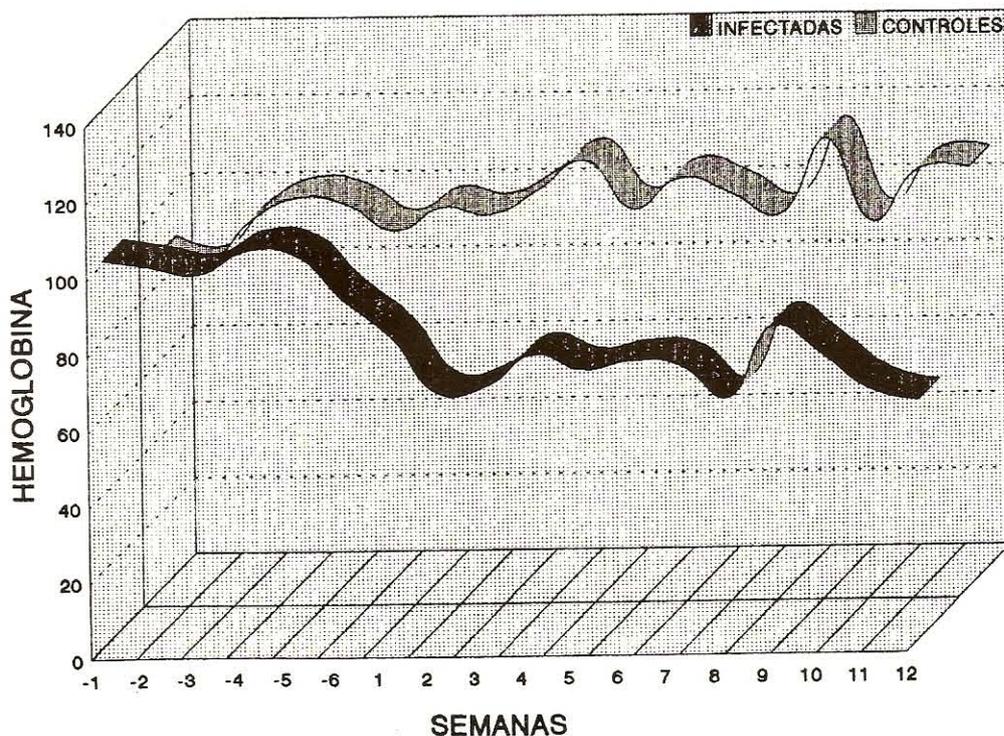


FIGURA 3. PROMEDIOS SEMANALES DE HEMOGLOBINA EN OVEJAS INFECTADAS EXPERIMENTALMENTE CON *T. VIVAX* Vs CONTROLES, DURANTE LOS PERÍODOS DE PRE Y POSTINFECCIÓN

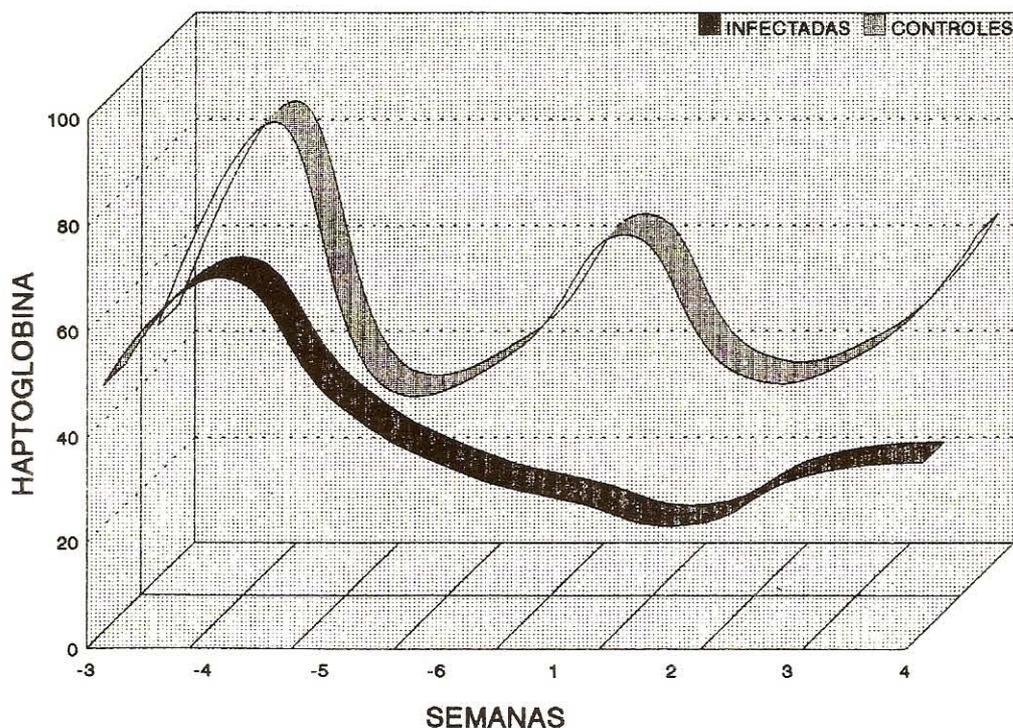


FIGURA 4. PROMEDIOS SEMANALES DE HAPToglobINA SÉRICA EN OVEJAS INFECTADAS EXPERIMENTALMENTE CON *T. VIVAX* Vs CONTROLES, DURANTE LOS PERÍODOS DE PRE Y POSTINFECCIÓN

concentraciones de $36,8 \pm 15$ mg/dl y $52,9 \pm 18$ mg/dl para los animales infectados y controles, respectivamente.

Analizando las medias parciales para el período de pre y post-infección en las ovejas inoculadas y controles, se demostró que las ovejas inoculadas disminuyeron su concentración de Hp en un 40% aproximadamente.

El análisis de correlación entre las variables haptoglobina y hemoglobina, muestra una correlación positiva ($r=0,9236$), lo cual sugiere la unión de hemoglobina liberada en el suero durante las primeras cuatro semanas de la infección con la haptoglobina sérica.

La Figura 5 nos indica las variaciones que se presentaron en las concentraciones de hierro sérico en los animales infectados y controles durante el ensayo experimental. En tal sentido, se pudo observar que a partir de la segunda semana de post-infección, en las ovejas infectadas las determinaciones de hierro sérico descendieron con una tendencia gradual hasta la octava semana de post-infección, donde se produjo un aumento, inclusive, muy por encima del valor promedio de los animales controles, para posteriormente continuar con la tendencia manifestada al inicio de la fase de post-infección. Hubo diferencias significativas después del reto con el hemoparásito ($P < 0,05$) en las semanas 3 y 7 de post-infección, así como en

la comparación de medias grupales. Para la comparación de la media de pre y post-infección del grupo infectado, la significancia fue de ($P < 0,01$).

Es de importancia resaltar que las estimaciones del hierro sérico en las ovejas infectadas durante la fase de post-infección, mostraron altas variaciones individuales; por ejemplo, el caso de la oveja identificada con el No. 6, cuyos valores de hierro en suero no pudieron ser detectados por la técnica empleada para la quinta semana de exposición al *T. vivax*, acotándose además, que el animal en cuestión murió tres semanas después.

De forma similar, se observó en el transcurso del ensayo la disminución de las variables Eritrocitos, Ht y Hb, inmediatamente después de haberse diagnosticado el *T. vivax* en sangre periférica, infiriéndose de estos descensos la presencia de una anemia de tipo hemolítico y parcialmente intravascular al inicio de la parasitosis (fase aguda), por los resultados obtenidos en la determinación de los valores de haptoglobina.

Van Den Ingh y col. [75] reportaron la presencia de anemia hemolítica en cabras infectadas con *T. vivax*, a través de la severa declinación en los valores de los glóbulos rojos, Ht y Hb. En ese sentido, Saror [64] sugirió que los tripanosomas o sus productos metabólicos pueden ser los responsables de la

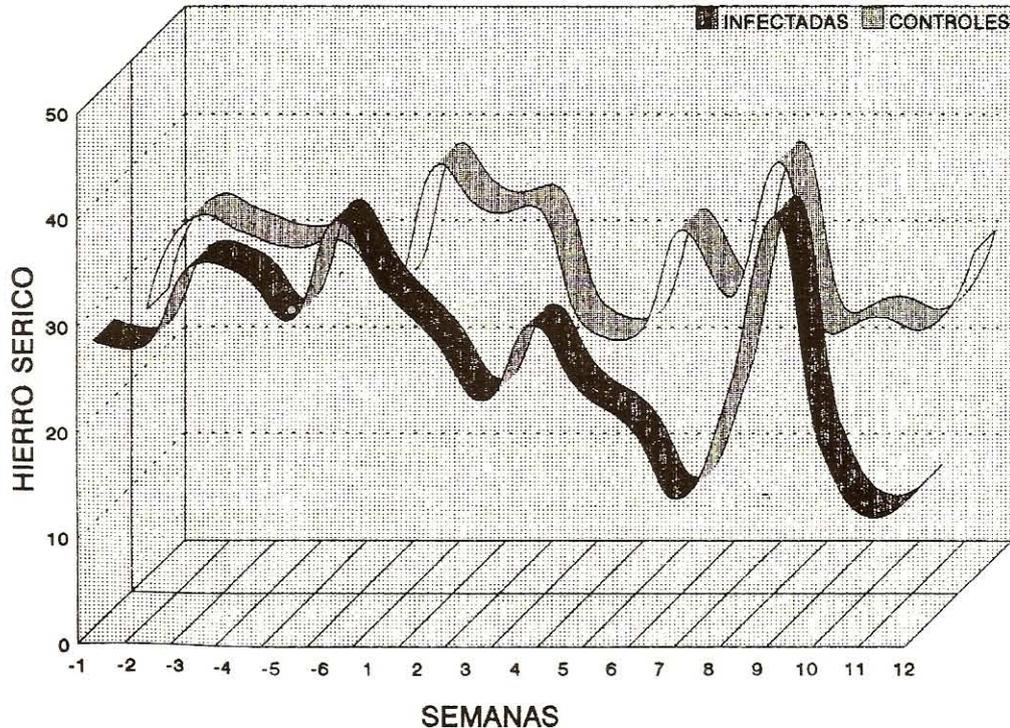


FIGURA 5. PROMEDIOS SEMANALES DE HIERRO SÉRICO EN OVEJAS INFECTADAS EXPERIMENTALMENTE CON *T. VIVAX* Vs CONTROLES, DURANTE LOS PERÍODOS DE PRE Y POSTINFECCIÓN

iniciación del proceso anémico, aspecto corroborado con la evidencia de los daños directos que causan los tripanosomas a los eritrocitos al inicio de la enfermedad [2, 41]; en este mismo orden de ideas, la producción de factores hemolíticos en las etapas iniciales de la infección, contribuyen a la lisis de los eritrocitos [4, 20, 21, 22, 23, 46, 61].

En el período inicial de la etapa de infección, un significativo descenso de los valores de haptoglobina en suero fueron obtenidos, lo que indica que el desarrollo de la anemia provocada por la inoculación de nuestro aislado de *T. vivax* está asociado con cierto grado de hemólisis intravascular durante la fase aguda de la enfermedad, resultado que coincide con los obtenidos por Esievo y col. [21] en infecciones del mismo parásito en bovinos.

El consumo de eritrocitos por macrófagos, producto del estímulo generado por la presencia masiva de tripanosomas sobre el sistema fagocítico mononuclear, el cual por esta vía es activado y expandido, es uno de los rasgos más notables de la patología en tripanosomiasis [57], por lo que estudios histológicos sugieren que la expansión del sistema fagocitomononuclear (SFM) y la eritrofagocitosis que ocurre en algunos órganos tales como bazo, hígado, pulmones, ganglios linfáticos y médula ósea, es una de las causas de destrucción eritrocitaria [12].

Los estudios histopatológicos que se realizaron en las ovejas que murieron en el transcurso del proceso experimental, arrojaron linfadenitis histiocitaria e histiocitosis sinusoidal, lo que señala que la infección con el aislado venezolano de *T. vivax*, también produce expansión del SFM y consecuentemente, destrucción eritrocitaria.

De igual manera, Saror [64] asocia una exacerbada eritrofagocitosis en médula ósea y bazo con una marcada hemosiderosis, resultados que también coinciden con la presente experimentación que reporta hemosiderosis en bazo y ganglios linfáticos, indicando de esta manera que la anemia provocada por el aislado es hemolítica y predominantemente extravascular.

En la Tabla II se muestran los valores promedios semanales del Volumen Corpuscular Medio (VCM), Hemoglobina Corpuscular Media (HCM), y la Concentración de la Hemoglobina Corpuscular Media (CHCM) de las ovejas infectadas y los valores medios de los mismos índices, correspondientes a las ovejas controles.

Los valores promedios de preinfección para los animales del grupo de los infectados fueron, VCM = 30,9 fl, HCM = 10,6 pg y CHCM = 34,8 g/dl y para los controles, VCM = 28,8 fl, HCM = 10,3 pg y CHCM = 35,7 g/dl, valores que fluctuaron

TABLA II

VALORES MEDIOS DE LOS ÍNDICES ERITROCÍTICOS, VOLUMEN CORPUSCULAR MEDIO (VCM), HEMOGLOBINA CORPUSCULAR MEDIA (HCM) Y CONCENTRACIÓN DE LA HEMOGLOBINA CORPUSCULAR MEDIA (CHCM) DE LAS OVEJAS INFECTADAS EXPERIMENTALMENTE CON *T. VIVAX* Y LAS CONTROLES, DURANTE EL PERÍODO DE PRE Y POSTINFECCIÓN.

Semanas	Infectadas			Controles		
	VCM (fl)	HCM (pg)	CHCM (g/dl)	VCM (fl)	HCM (pg)	CHCM (g/dl)
(-1)	32,3	11,3	34,8	28,7	10,1	35,4
(-2)	31,6	10,8	38,1	30,4	10,3	34,2
(-3)	31,4	10,5	33,4	29,5	11,0	36,9
(-4)	30,0	10,3	34,3	29,3	11,1	37,5
(-5)	29,0	10,2	35,1	25,9	9,3	36,2
(-6)	31,7	10,5	33,3	29,0	10,1	34,3
Media	31,0	10,6	34,8	28,8	10,3	35,8
1	29,4	10,2	34,7	26,0	10,0	36,8
2	30,7	10,0	32,5	27,0	10,1	35,3
3	30,4	9,7	31,9	25,8	9,4	34,9
4	29,7	10,1	33,8	28,3	10,1	35,5
5	30,4	10,2	34,0	27,8	10,0	37,7
6	25,6	8,9	34,6	27,1	9,7	34,3
7	26,3	9,4	35,4	29,8	10,3	32,4
8	24,3	7,6	30,4 ^c	29,6	10,0	30,2 ^d
9	24,5	7,4	30,2	27,9	9,6	30,5
10	25,0	8,4	32,3	24,8	10,0	30,1
11	28,2	8,3	29,6	26,3	10,1	31,9
12	21,2 ^b	6,2 ^b	29,4	24,2 ^a	10,3 ^a	31,4
Media	27,1	8,8	32,4	27	9,9	33,4
Media	28,4	9,4 ^d	33,2	27,6	10,0 ^c	34,1

a,b Valores de la misma fila con distintas letras difieren significativamente para ($P < 0,01$)

c,d Valores de la misma fila con distintas letras difieren significativamente para ($P < 0,05$)

(-): Semanas de preinfección.

dentro de los límites superior e inferior reportados como normales en la literatura.

Para el período de postinfección la media del VCM, HCM y CHCM de las ovejas infectadas correspondió a 27,4 fl, 8,8 pg y 32,4 g/dl; comportándose, de igual manera, los valores correspondientes a los animales controles. No obstante, se pudo visualizar para la semana 12 de la etapa de infección, valores para el VCM y HCM de las ovejas infectadas por fuera del límite inferior reportado en la literatura y con diferencias significativas ($P < 0,01$) en relación al valor de los controles.

Los datos experimentales obtenidos sólo fueron confiables para sostener que en promedio durante todo el lapso de observación, no hubo desigualdad entre los índices eritrocíticos determinados en las ovejas controles, infectadas con el *T.*

vivax y los valores promedios citados en la literatura. En consecuencia, se puede sugerir que es viable que la anemia fue morfológicamente normocítica y normocrómica, con la excepción de la semana 12 del período de post-infección, aspecto referido anteriormente en los resultados, donde la tendencia es hacia una anemia microcítica hipocrómica, en momentos donde el Fe sérico estaba en los valores mínimos del estudio.

Katunguka y col. [44] al estudiar la patofisiología de la tripanosomiasis en ovinos infectados con *T. vivax* y *T. congolense*, observaron una forma de anemia de tipo macrocítica hipocrómica. No obstante, Clarkson [8] y Losos e Ikede [48] reportaron una anemia de tipo normocítica normocrómica en ovejas infectadas con *T. vivax*. Por lo tanto, se puede concluir que los índices eritrocíticos de este experimento fueron concordantes

con los resultados obtenidos por los anteriores investigadores. Sin embargo, Igbokwe [35] distingue en ovejas infectadas experimentalmente con *T. vivax*, una anemia macrocítica normocrómica en la fase aguda de la infección.

Para el caso de los bovinos, Saror y Bello [65] identifican de acuerdo a los estudios efectuados por diferentes autores, anemias morfológicamente macrocíticas en las tripanosomiasis agudas, así como anemias macrocíticas normocrómicas, pero también anemias normocíticas normocrómicas.

Espinoza y col. [24, 25] manifiestan en una infección de bovinos con el mismo aislado de *T. vivax*, una anemia morfológicamente normocítica normocrómica; lo cual fue no concordante con los hallazgos de Anosa e Isoun [4]; Igbokwe y Anosa [36] Maxie y col. [52] y Naylor [58, 59], quienes demostraron la presencia de una anemia macrocítica normocrómica en las primeras dos semanas de la enfermedad producida en diferentes rumiantes por *T. vivax* y *T. congolense*.

Al respecto Gardiner [30] expresó que la anemia producida por el *T. vivax* al inicio de la enfermedad es de tipo normocítica normocrómica, con una tendencia a ser macrocítica normocrómica posteriormente.

Los datos de la presente investigación muestran el desarrollo de una anemia normocítica normocrómica en las ovejas infectadas, situación concordante con el comportamiento que tuvieron bovinos (Holstein) retados experimentalmente con la misma cepa de *T. vivax* [27]; de igual manera coinciden con los de Gardiner [30] y Saror y Bello [65] en referencia a la morfología de la anemia en evaluaciones de variantes africanas.

Dargie y col. [12] al estudiar la cinética de las células rojas en bovinos tripanotolerantes y tripanosusceptibles de África, encontraron variaciones en los niveles del hierro sérico entre los animales, por ejemplo, diferencia entre las razas utilizadas y algunas veces entre el grupo control y el infectado. Sin embargo, concordaron con otros autores en que las anemias hemolíticas, principalmente, se acompañan de hipoferrémia. En el mismo orden de ideas, Anosa y Kaneko [3] no encontraron diferencias en los valores del hierro sérico entre los animales infectados y controles, atribuyéndole que la disminución del metal compagina con las enfermedades crónicas en la cual la anemia, morfológicamente, puede ser normocítica normocrómica hipoferrémica y microcítica hipocrómica hipoferrémica.

Sodeman y Sodeman [67] cuando explican fisiopatológicamente la carencia de hierro, plantean que el primer cambio en el desarrollo de la deficiencia ferruginosa es la pérdida del hierro almacenado desde los macrófagos de hígado, riñón y médula ósea. Después de utilizada las reservas del mismo, la concentración sérica disminuye, estimulando un aumento en la síntesis de transferrina y uno de los últimos cambios que se observan en esta patología es la anemia, en la cual, al principio los eritrocitos son normocíticos normocrómicos; pero cuando aumenta aparecen eritrocitos microcíticos hipocrómicos [42, 49].

Igbokwe [35]; Murray y Dexter [56]; Valli y col. [71]; Valli y Mills, [72]; Wellde y col. [76] fueron del criterio, en el caso de las tripanosomiasis crónica, de que la eritropoyesis es nula o reducida en muchos individuos afectados por la parasitosis y aunque el hierro no es un factor limitante en la producción de eritrocitos, la utilización del mismo puede estar interferida por su secuestro en el SFM. Conclusiones similares, fueron soportadas por Anosa y col. [1], Emeribe y Anosa [18] y Katunguka y col. [45], quienes agregaron además que la anemia microcítica hipocrómica vista en los animales domésticos podría explicarse por dos vías: 1.- deficiencia de hierro necesaria para la síntesis de hemoglobina y 2.- falla en el transporte o reutilización del metal dentro de los precursores de células rojas en la presencia de un adecuado o excesivo almacenaje del hierro en la médula ósea. Merck [54], en humanos con alteraciones hematológicas, expresa que en las anemias ferropénicas y por déficit en la reutilización del mismo, los eritrocitos son microcíticos hipocrómicos y en el caso particular de la reutilización al inicio de la patología, los eritrocitos son normocíticos para después llegar a ser microcíticos.

Cuando se abordó la discusión de los cambios de los índices eritrocíticos, se notó hacia el final del experimento una cierta tendencia de los eritrocitos de las ovejas inoculadas con el *T. vivax* a ser microcíticos hipocrómicos y, especulativamente, podemos inferir que de continuar muestreando los animales, se pudo haber obtenido una clara respuesta microcítica hipocrómica.

También es significativo que en las dos ovejas que murieron y a las cuales se tuvo la oportunidad de realizar la necropsia y los estudios histopatológicos de los órganos internos, se diagnosticó hemosiderosis, aspecto anteriormente corroborado por Espinoza [27] en una infección experimental de bovinos infectados, situación que la literatura presenta como una causa de anemia ferropénica, así como causal de anemia hemolítica [43, 67]. Clínicamente, Espinoza observó parorexia en ovejas y bovinos infectados con *T. vivax* y al respecto Merck [54] asocia esta sintomatología clínica con las deficiencias de hierro humano.

CONCLUSIONES

- La disminución de los indicadores hematológicos, eritrocitos, hematocrito, hemoglobina y haptoglobina; concomitantemente a la detección del *T. vivax* en sangre, conducen al establecimiento de una anemia de tipo hemolítica con episodios de lisis intravascular en la fase aguda de la enfermedad, relacionando la responsabilidad de los tripanosomas o sus productos en la injuria fisicoquímica de la membrana eritrocitaria.

- La posible ocurrencia de eritrofagocitosis, asociada a hemosiderosis y expansión del sistema fagocítico mononuclear en bazo y ganglios linfáticos, indican la presencia de anemia hemolítica con eventos extravasculares.

- Desde el punto de vista morfológico esta anemia es clasificada como normocítica normocrómica. La disminución de los niveles séricos de hierro, así como la presencia de hemosiderosis, apuntalan la conclusión de que la anemia provocada por el aislado empleado, es de tipo hemolítica y que esta disminución en la etapa crónica puede conducir a una anemia morfológicamente de tipo microcítica hipocrómica.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ANOSA, V.; Logan, L. and Shaw, M. A Light and Electro Microscopic Study of Changes in Blood and Bone Marrow in Acute Hemorrhagic *Trypanosoma vivax* Infection in Calves. *Veterinary Pathology*. 29: 33-45. 1992.
- [2] ANOSA, V. O. Haematological and biochemical changes in human and animal Trypanosomiasis. Part I *Revue D'Elevage et De Medicine Veterinaire des Pays Tropicaux*. (1): 65-78. 1988.
- [3] ANOSA, V. O. and Kaneko, J. J. Pathogenesis of *Trypanosoma brucei* Infections in Deer Mice (*Peromyscus maniculatus*): Hematologic, Erythrocyte, Biochemical and Iron Metabolic Aspects. *American Journal Veterinary Research*. 44(4): 639-644. 1983.
- [4] ANOSA, V. O and Isoun, T. T. Haematological studies on *Trypanosoma vivax* Infection of goats and intact and splenectomized sheep. *Journal Comparative Pathology* 90: 155-168. 1980.
- [5] BENJAMIN, M. *Manual de Patología Clínica en Veterinaria*. 2ª Ed. México. Limusa. pp: 421. 1984.
- [6] BOUTEILLE, B.; Darde, M.; Dumas, M.; Catanzano, M.; Breton, J. and Nicolas, A. The Sheep (*Ovis aries*) as an Experimental Model for African Trypanosomiasis I Clinical Study. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*. 82(2): 141-148. 1988.
- [7] CENTRO PANAMERICANO DE ZONOSIS. Procedimientos para Estudios de Prevalencia de Enfermedades Crónicas en el Ganado. Ramos Mejías (Buenos Aires), Argentina, Organización Panamericana de la Salud. (Nota técnica No. 18). pp. 32-35. 1973.
- [8] CLARKSON, M. Blood and Plasma Volumes In Sheep Infected With. *Trypanosoma vivax*. *Journal of Comparative Pathology*. 78: 189-193. 1968.
- [9] COLES, L. *Veterinary Clinical Pathology*. (4ª ed.) Saunders. Philadelphia. pp. 10-72, 103-105. 1986.
- [10] COLHOUN, D. and Englander, W. Measurement of the Haptoglobin Concentration in Plasma and Other fluids by a Simple Spectrometric Procedure. *Analytical Biochemistry*. 99: 421-426. 1979.
- [11] DACIE, J. and Lewis, S. *Hematología Práctica*. (3ª Ed.) Barcelona (Esp) Toray. pp 495. 1987.
- [12] DARGIE, V.D.; Murray, P.K.; M.; Grimshaw, W.R.T. and McIntyre, W.I.M. Bovine Trypanosomiasis the Red Cell Kinetics of Ndama and Zebu Cattle Infected with *Trypanosoma congolense*. *Parasitology*. 78: 271-286. 1979.
- [13] De DIEGO, Z.A.; Escribano, C.; Rey, C.J.; Mayer, R. y De Diego, M.S. El Cuadro Hemático en la Infección Experimental con *Trypanosoma brucei*. *Revista Ibérica de Parasitología*. 46 (1): 13-20. 1986.
- [14] DIALL, O., Touré, O., Diarra, B. and Sanogo, Y. Trypanosomose et Traitements Trypanocides Chez le Veau Ndama en Milieu Fortement Infeste de Glossines (Ranch de Madina-Diassa au Mali). *Revue D'elevage et de Medicine Veterinaire Des Pays Tropicaux*. 45 (2): 155-161. 1992.
- [15] DIRIE, M.; Otte, M.; Gardiner, P. Phenotypic and Serological Diversity Amongst *Trypanosoma vivax* Isolates from South America and Africa. First International Seminar on Non- Tse Tse Transmitted Animal Trypanosomoses. pp. 36 (Resumen). 1992.
- [16] DIRIE, M.P.; Wallbans, K.R.; Molyneux, D. H.; Bornstein, S.; Omer, H. A. Haemorrhagic Syndrome Associated with *Trypanosoma vivax* infections of cattle in Somalia. *Acta Trópica*. 54(2): 291-292. 1988.
- [17] EDWARDS, E.; Judd, J. and Squire, F. Observations on Trypanosomiasis in Domestic Animals in West Africa. I The Daily Index of Infection and the Weekly Hematological Values in Goats and Sheep Infected with *Trypanosoma vivax*, *T. congolense* and *t. brucei*. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*. 50: 223-241. 1956.
- [18] EMERIBE, A. and Anosa, V. Haematology of Experimental *Trypanosoma brucei gambiense* Infections. II Erythrocyte and Leucocyte Changes. *Revue D'Elevage et des Medicine Veterinaire de Pays Tropicaux*. 44(1): 53-57. 1991.
- [19] EMERY, D. L.; Barry, J. D. and Moloo, S. J. The Appearance of *Trypanosoma (Duttonella) vivax* in lymph following challenge of goats with infected *glossina morsitans morsitans*. *Acta Trópica*. 37: 375-379. 1980.
- [20] ESIEVO, K.A.N.; Saror, D.I.; Kolo, M. N. and Eduvie, L. O. Erythrocyte Surface sialic acid in ndama and Zebu cattle. *Journal Comparative Pathology*. 96:95-99. 1986.

- [21] ESIEVO, K.A.N.; Saror, D. I. and Adegoke, O. O. Depleted serum Haptoglobin in acute bovine trypanosomiasis. *Veterinary Parasitology*. 15:181-185. 1984.
- [22] ESIEVO, K.A.N. *Trypanosoma vivax*, Stock U953: Inhibitory effect of Typa Influenza Virus Anti-HAV8 Serum on *in vitro* Neuraminidase (Sialidase) Activity. *Journal Parasitology*. 69(3): 491-495. 1983.
- [23] ESIEVO, K.A.N.; Saror, D.; Ilemobade, A. and Hallaway, H. Variation Erythrocyte Surface and Free Serum Sialic Acid Concentrations During Experiment *Trypanosoma vivax* Infection in Cattle. *Research Veterinary Science*. 32: 1-5. 1982.
- [24] ESPINOZA, E.; Aso, P. and Camacaro, I. Haematologic Values of Infected Bovine with a Venezuelan Isolate of *Trypanosoma vivax*. First International Seminar on Non-TseTse Transmitted Animal Trypanosomoses. pp. 130 (Resumen). 1992.
- [25] ESPINOZA, E.; Aso, P. y Camacaro, I. Valores Hematológicos de Bovinos Infectados Experimentalmente con un Aislado Venezolano de *Trypanosoma vivax*. Parte I Eritrocitos. *Revista de Salud Animal*. (En Prensa). 1991.
- [26] ESPINOZA, E. y Tortolero, E. Un Método Simple de Conservación de *Trypanosoma vivax* para su Uso en Infecciones Experimentales. pp. 4. (Mimeo). 1990.
- [27] ESPINOZA, E. Evaluación Clínica Parasitológica y Serológica de Bovinos infectados experimentalmente con *Trypanosoma vivax*. Trabajo presentado para optar al título Magister Scientiarum. Postgrado Medicina Veterinaria, U.C.V. Maracay Venezuela. 1988.
- [28] FACER, C.A.; Crosskey, J. M.; Clarkson, M. J. and Jenkis, G. C. Immune Haemolytic Anaemia in Bovine Trypanosomiasis. *Journal Comparative Pathology*. 92:393-401. 1982.
- [29] FIENNES, R. Haematological Studies in Trypanosomiasis of Cattle. *Veterinary Record*. 66 (30): 423-443. 1954.
- [30] GARDINER, P.R. Recent Studies of the Biology of *Trypanosoma vivax*. *Advances in Parasitology*. 28:229-317. 1989.
- [31] GONZALEZ, N. and Espinoza, E. Experimental infection with *T. vivax* in holstein-cebu cows, during the last trimester of gestation and the post partum period. First international seminar on Non-tsetse transmitted animal trypanosomoses. pp. 140 (summary). 1992.
- [32] GONZALEZ, N. Infección Experimental con *Trypanosoma vivax* en Vacas Mestizas Holstein Cebú, Durante el último Tercio de la Gestación y el Post-parto. Trabajo de ascenso. Universidad Nacional Simón Rodríguez. pp.99. 1991.
- [33] GOODWIN, L. D. The Parasitology of African Trypanosomiasis. *Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 64(5): 797-812. 1970.
- [34] HOLMES, P. H. Pathophysiology of Parasitic Infections. *Parasitology*. 94: 529-551. 1987.
- [35] IGBOKWE, I. Dyserythropoiesis in Animal Trypanosomosis. *Revue D'élevage et de Médecine Veterinaire Des Pays Tropicaux*. 42(3): 423-429. 1989.
- [36] IGBOKWE, I. O. and Anosa, V. O. Response to Anaemia in Experimental *Trypanosoma vivax* Infection of Sheep. *Journal Comparative Pathology*. 100:111-118. 1989.
- [37] ILEMOBADE, A. and Schilhorn, W. The Presence of *Trypanosoma vivax* in the Ocular Discharge of an Experimentally Infected Calf. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 68(5): 410. 1974.
- [38] ILRAD. Why do Livestock Infected with Trypanosomes Develop anaemia. *International Laboratory for Research on Animal Diseases*. 8(3-4): 1-6. 1990.
- [39] ILRAD. International Laboratory Research on Animal Diseases. Annual Report: 31-56. 1989.
- [40] ILRAD. Trypanosomiasis. Annual Report of the International Laboratory for Research on Animal Diseases.: 49. 1987.
- [41] ILRAD. Anaemia in Trypanosomiasis Haemorrhagic *Trypanosoma vivax* may Provide a Clue. *International Laboratory for Research on Animal Diseases*. 2(4): 1-3. 1984.
- [42] IOVINE, E. y Selva, A. El Laboratorio en la Clínica (2ª ed.). Panamericana. Buenos Aires. pp. 11- 112. 1979.
- [43] JAIN, N. *Veterinary Hematology Schalm's*. (4ª ed.). Lea y Febiger: Philadelphia. pp 208-224; 940-989. 1986.
- [44] KATUNGUKA, E.; Murray, M. and Holmes, P. Pathophysiology of Ovine Trypanosomiasis: Ferrokinetics and Erythrocyte Survival Studies. *Research in Veterinary Science*. 53: 80-86. 1992a.
- [45] KATUNGUKA, E.; Murray, M. and Holmes, P. The Pathophysiology of Ovine Trypanosomiasis:

- Haematological and Blood Biochemical Changes. *Veterinary Parasitology*. 45: 17-32. 1992b.
- [46] KNOWLES, G.; Black, S. J. and Whitelaw, D. D. Peptidase in the Plasma of Mice Infected with *Trypanosoma brucei*. *Parasitology*. 95: 291-300. 1987.
- [47] KUBES, V. El *Trypanosoma vivax* Americano. Caracas, Venezuela. Grafolit. 127 P. 1944.
- [48] LOSOS, G. and Ikede, B. Review of Pathology of Diseases in Domestic and Laboratory Animals Caused by *T. congolense*; *T. vivax*; *T. brucei*; *T. rhodesiense* and *T. gambiense*. *Veterinary Pathology*. 9: 6-21. 1972.
- [49] LYNCH, M.; Raphael, S.; Mellor, L.; Spare, P. y Inwood, M. Métodos de Laboratorio (2ª ed.) Interamericana. México. pp 703-766. 1985.
- [50] MASAKE, R. The Pathogenesis of Infection With *Trypanosoma vivax* in Goats and Cattle. *Veterinary Record*. 107 (24): 551-557. 1980.
- [51] MAWUENA, K. Trypanosomose Des Moutons et Des Chèvres de Race Naime Djallonké Des Régions Sud Guinéennes Autogo. *Revue D'élevage et De Médecine Veterinaire Des Pays Tropicaux*. 39 (3-4): 307-315. 1986.
- [52] MAXIE, M. G.; Losos, G. J. and Tabel, H. Experimental Bovine Trypanosomiasis (*Trypanosoma vivax* and *Trypanosoma congolense*) Symptomatology and Clinical Pathology. *Tropenmedizi und Parasitologie*. 30: 274-282. 1979.
- [53] MAYAUDON, H. Enfermedades Parasitarias de los Animales Domésticos. Universidad Central de Venezuela. Facultad de Ciencias Veterinarias. 33-37 p. 1974.
- [54] MERK. El Manual Merk. (8ª ed.) Doyma. Barcelona (España). pp 1228-1232. 1991.
- [55] MURRAY, M. Factors Affecting Duration and Intensity of Trypanosome Infection of Domestic Animals. *Annals Society Belge of Medicine Tropical*. 69 (Suppl.1): 189-196. 1989.
- [56] MURRAY, M. and Dexter, T. M. Anemia in Bovine African Trypanosomiasis. *Acta Tropica*. 45: 389-432. 1988.
- [57] MURRAY, P.; Jenmings, F.; Murray, M. and Urquhart, B. The Nature of Immunosuppression in *Trypanosoma brucei* Infections in Mice. I The Role of the Macrophage. *Immunology*. 27: 815-840. 1974.
- [58] NAYLOR, D. C. The Haematology and Histopathology of *Trypanosoma congolense* Infection in Cattle. *Tropical Animal hith Production*. 3:159-168. 1971a.
- [59] NAYLOR, D.C. The Haematology and Histopathology of *Trypanosoma congolense* Infection in Cattle. *Tropical Animal hith Production*. 3: 203-207. 1971b.
- [60] OGWU, D., Njoku, C. and Ogbogu, V. Adrenal and Thyroid Dysfunctions in Experimental *Trypanosoma congolense* Infection in Cattle. *Veterinary Parasitology*. 42: 15-26. 1992.
- [61] ONYEMELUKWE, G.; Esievo, K. and Kwanashie, C. Erythrocyte Sialic Acid in Human Sickle-Cell Disease. *Journal Comparative Pathology*. 97: 143-147. 1987.
- [62] OTTE, M. La Importancia de la Tripanosomiasis en la Industria Ganadera de Córdoba, Colombia. ICA. Informe técnico No. 8, pp. 151. 1991.
- [63] PARRA, G.; y Vizcaíno, O. Manual de Técnicas de Laboratorio del Programa de Parasitología y Entomología Veterinaria. (Bogotá). Instituto Colombiano Agropecuario. División de Ciencias Veterinarias. 150-152 p. 1979.
- [64] SAROR, D. I. Observations on the Course and Pathology of *Trypanosoma vivax* in Red Sokoto Goats. *Research in Veterinary Science*. 28(1): 36-38. 1980.
- [65] SAROR, D. I., and Bello, A. Classification on the Anemia of Bovine Trypanosomiasis. *Veterinary Record*. 105: 96-98. 1979.
- [66] SCHALM, O.; Jain, N. y Carroll, E. Hematología Veterinaria. (1ª Ed.) Hemisferio Sur. Buenos Aires (Arg.) 857 p. 1981.
- [67] SODEMAN, W., y Sodeman, T. Fisiopatología Clínica. (6ª ed.). Interamericana. México. 637-836 p. 1986.
- [68] SULIMAN, H. B., and Fedman, B.F. Pathogenesis and Aetiology of Anemia in Trypanosomiasis with Special Reference to *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma evansi*. *Veterinary Bulletin*. 59(2): 300-309. 1989.
- [69] TORO, B.; León, A., López, E. y Ruiz, A. Efecto del Isometamidium (Fenantridina) en la Infección Experimental por *Trypanosoma vivax* en Ovinos y Bovinos. *Ciencias Veterinarias*. 8(1): 1164-1173. 1979.
- [70] TOURE, S.; Gueye, A.; Mamadou, S. and Mane, A. Experience de Phatologie Comparee entre Bovins et N'dama Soumes a L'infection Naturelle par Des Trypanosomes Pathogenes. *Revue D'élevage de Medicinè Veterinaire Des Pays Tropicaux*. 31(3): 293-313. 1978.
- [71] VALLI, O.; Forsberg, M. and McSherry, J. The Patogenesis of *T. congolense* Infection in Calves. II Anaemia and Erythroid Response. *Veterinary Pathology*. 15: 732-745. 1978.

- [72] VALLI, O. and Mills, N. The Quantitation of *T. congolense* in Calves I Haematological Changes. *Tropenmedizin und Parasitologie*. 31: 215-231. 1980.
- [73] VAN DEN INGH, T. and Neijls. Bakker, M. Pancarditis in *Trypanosoma vivax* Infection in Cattle. *Tropenmedizi und Parasitologie*. 31: 239-243. 1979.
- [74] VAN DEN INGH, T.S.G.A.M.; Zwart, D.; Van Miert, A.S.J.P.A.M. y Schotman, A.J.H. Clinico. Pathological and Pathomorphological Observations in *Trypanosoma vivax* Infection in Cattle. *Veterinary Parasitology*. 2: 237-250. 1976a.
- [75] VAN DEN INGHT, T.; Zwart, D.; Schotman, A.; Veenedaal, G. and Van Miert, A. The Pathology and Pathogenesis of *Trypanosoma vivax* Infection in the Goat. *Research Veterinary Science*. 21: 264-270. 1976b.
- [76] WELLDE, B. T.; Chumo, D. A.; Onyango, F. K.; Reardon, M. J. and Robert, L. M. *Trypanosoma vivax* Disseminated intravascular Coagulation in Cattle. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*. 83(1): 177-183. 1989.
- [77] WOO, P. The Haematocrit Centrifuge for the Detection of Trypanosomas in Blood. *Canadian Journal of Zoology*. 47(5): 921-923. 1969.

SCIENTIFIC INTERNATIONAL EVENTS 1995

DATE	EVENT	PLACE
September 3-9	World Veterinary Congress	Yokohama, Japan
September 14-16	Annual Conference Society for Theriogenology	San Antonio, Texas.
October 4-6	4th Veterinary Sciences Congress	La Habana, Cuba
October 10-13	Latinoamerican Aviculture Congress	Santiago, Chile
October 28/Nov. 3	38th Annual Meeting the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians	Reno, USA.
November 6-11	Small Animal and Avian Medicine Conference	Chilkat River Valley Alaska, USA
November 12-17	Biotechnology: New oportunities in agricultural and in industry	Habana, Cuba.