

## NUEVAS OBSERVACIONES ACERCA DE LA ACCIÓN PATÓGENA DEL *TRYPANOSOMA RANGELI* TEJERA, 1920 SOBRE *RHODNIUS PROLIXUS* STAL, 1859

Ivonne GÓMEZ

### RESUMEN

El *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920, es patógeno para su huésped natural, el *Rhodnius prolixus* Stal, 1859; la infección del insecto puede realizarse mediante la alimentación artificial y la acción patógena se realiza a nivel del tubo digestivo aun cuando el flagelado no pase al sistema hemolinfático del insecto. Además de la mortalidad, que sirve de índice para medir la patogenicidad, se observa un aumento considerable del número total de células hemolinfáticas en los insectos infestados.

### INTRODUCCIÓN

Un aspecto muy reciente y poco estudiado sobre las relaciones huésped-parásito entre el *Rhodnius prolixus* Stal, 1859 y el *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920, ha sido abordado por GREWAL<sup>3</sup> al precisar que el *T. rangeli* es un agente patógeno para el *R. prolixus*. Alimentando larvas de *R. prolixus* sobre ratones muy jóvenes inoculados con *T. rangeli*, con muy baja parasitemia, este Autor infecta los reduvidios y tras alimentarlos posteriormente sobre animales sanos, estudia su mortalidad, relacionándola con la presencia de los parásitos en el tubo digestivo, en la hemolinfa y en las glándulas salivales.

TOBIE<sup>9</sup> ha estudiado este problema más recientemente precisando las condiciones experimentales de trabajo y comparando los datos de mortalidad experimental con la observada en los insectos controles, aspectos estos no precisados en el trabajo de GREWAL<sup>3</sup>.

Nos hemos propuesto estudiar el problema de la patogenicidad del *T. rangeli* para el *R. prolixus*, usando un método más

práctico y efectivo para infectar diferentes estadios de *R. prolixus* con gran número de parásitos y conocer las modificaciones hemolinfáticas que acompañan a la infección de los reduvidios.

### MATERIALES Y METODOS

*T. rangeli* — Usamos la cepa "Tocuyo" aislada por el Doctor F. PIFANO y la cual se obtuvo originalmente por hemocultivo de un caso humano del Estado Yaracuy (Venezuela). Esta cepa, que ha sido la misma usada por TOBIE<sup>9</sup>, la hemos mantenido *in vitro* en nuestros laboratorios por más de diez años, en medio bifásico de caldo glucopectonado adicionado con extracto de carne y sangre desfibrinada de conejo a pH 7,2, haciendo pases cada 14 días y manteniendo los cultivos a temperatura ambiente.

*R. prolixus* — De la cría del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Ciencias de Caracas, mantenida desde hace doce años, alimentados sobre

Trabajo realizado para cumplir parcialmente con los requisitos de la Licenciatura en Biología de la Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela. Dirigido por: Prof. JOSÉ V. SCORZA.

gallinas. Es una cepa original del caserío "Cantagallo" en el Estado Guárico (Venezuela).

*Mantenimiento de los insectos* — Durante la realización de este trabajo, mantuvimos reduvidios controles y experimentales bajo las condiciones de laboratorio o bajo condiciones estabilizadas.

En condiciones de laboratorio se conservaron los insectos en envases de 4 litros, o en frasco de 200 cc. boca ancha, dispersos en una trama de papel que se renovada cada semana; los recipientes se taparon con tela de 10 hilos por centímetro. Las condiciones de laboratorio fueron de  $21 \pm 4^\circ\text{C}$  y  $60 \pm 15\%$  de humedad. TOBIE<sup>9</sup> trabajó a  $27^\circ\text{C}$  y  $67\%$  de humedad.

En condiciones estabilizadas, se confinaron los insectos en grupos iniciales de 50 individuos dentro de frascos boca ancha de 150 cc. cerrados herméticamente con tapones de caucho bihoradados. Los frascos se sumergieron dentro de un recipiente con agua a  $30 \pm 0,50^\circ\text{C}$  y se le hizo circular, a través de los huecos del tapón, aire con  $85\%$  de humedad. Dentro de cada frasco, se impidió el hacinamiento mediante septos de papel de filtro que se renovó cada tres días.

*Alimentación artificial e infección experimental* — Hemos empleado la técnica original de FRIEND & CARTWRIGHT<sup>2</sup>, modificando el diámetro de los embudos de alimentación; usamos de 20 mm en lugar de 12,7 mm, como originalmente se describen. Como membrana alimentadora utilizamos fragmentos rectangulares de anticonceptivos corrientes lavados con alcohol etílico de  $70\%$ .

Para alimentar cualquiera de los estadios de desarrollo de *R. prolixus* e infectarlos con *T. rangeli*, utilizamos sangre heparinizada de conejo inactivada a  $45^\circ\text{C}$  durante 35 minutos y homogeneizada de inmediato con una suspensión recién hecha de formas de cultivo de *T. rangeli*, cosechados a los 7 días de su desarrollo en agar-sangre; los flagelados fueron lavados asépticamente con solución isotónica estéril mediante centrifugación a 5000 r.p.m. durante 8 minutos. La sangre ingerida por los *R. prolixus* experimentales, contuvo 10-12 formas de críditida por campo de mediano aumento en preparaciones frescas.

*Comprobación de la infección y estudio de la hemolinfa* — En ensayos preliminares se comprobó, que mediante la técnica de infección experimental por medio de alimentación artificial, los reduvidios de cualquier estadio muestran parásitos móviles en el tubo digestivo desde el momento mismo de la ingestión de sangre contaminada y durante todo el resto de su vida; esto es, que la infección así lograda, es efectiva y permanente en un  $100\%$  de los insectos alimentados artificialmente. Condición indispensable para que esto suceda lo es la ingestión simultánea de sangre y parásitos. Los insectos alimentados únicamente con caldo de cultivo y parásitos, ni se infestan, ni mudan.

Para el estudio de la hemolinfa se seccionó la tibia del segundo o tercer par de patas del insecto, comprimiendo suavemente el abdomen con una pinza hasta expulsar una gota de hemolinfa que recogida sobre un porta-objeto, se examinó al microscopio con 450 aumentos; en caso de observarse parásitos, se extrajo una nueva gota de la misma pata seccionada, extendiéndola suavemente con ayuda del muñón sangrante. De seguidas se fijó la gota exponiéndola 30 segundos a vapores de ácido osmico al  $0,5\%$  y se sobrefijó inmediatamente con alcohol metílico. Los parásitos se tiñeron con Giemsa (una gota/cc) en solución tamponada con Srensen M/100 a pH 7,0 durante una hora. Una vez lavado y seco se cubrió el frote con clarite y laminilla.

*Estudio hemocitológico de los R. prolixus controles e infestados* — Para el reconocimiento de las diferentes células sanguíneas del insecto, utilizamos al principio extendidos de hemolinfa fijados y teñidos con Giemsa. Identificamos las células libres de la hemolinfa de acuerdo con la siguiente nomenclatura: adipohemocitos de HOLLANDE<sup>5</sup>, reconocidos en *R. prolixus* por WIGGLESWORTH (1965) prohemocitos de YAGER<sup>10</sup>, plasmaticitos de ARNOLD<sup>1</sup>, oenocitoides de CUENOT (1891), y descritos en *R. prolixus* por WIGGLESWORTH (1933) y hemocitos granulares de HOLLANDE<sup>4</sup>. Una vez que pudimos reconocer estas formas teñidas, preferimos trabajar con hemolinfa fresca bajo cubre-objeto, en vista de que la hemolinfa de *R. prolixus* es incoagulable, fenómeno ya observado por WIGGLESWORTH (1959).

Para el conteo diferencial y total de las células libres, tomamos la primera gota de hemolinfa y la depositamos sobre la retícula, para el conteo de leucocitos, de una cámara de Neubauer cubriéndola inmediatamente. Las células libres de la hemolinfa de *R. prolixus* no se aglutinan JONES & LIU<sup>6</sup>. Utilizamos la primera gota de hemolinfa tomando en cuenta las observaciones de WIGGLESWORTH<sup>12</sup>, quien ha comprobado que ella contiene más *hemocitos* que las gotas subsiguientes:

WIGGLESWORTH<sup>11</sup> ha comprobado, además, la existencia de una gran variedad fisiológica en el número de las células hemolinfáticas que depende de distintas condiciones: Ayuno, proceso de digestión, muda, muda y postmuda. Teniendo en cuenta estos resultados y los de JONES & LIU<sup>6</sup> quienes comprueban que el menor número de células circulantes se registran dos días después de la digestión de sangre, hemos determinado el número total de células por milímetro cúbico, haciendo conteos a las 24, 48 y 72 horas después de la ingestión.

De acuerdo con el tamaño de la gota de hemolinfa extraída, determinamos el número de células en 0,1, 0,2, 0,3 mm<sup>3</sup>, es decir, en 1, 2 ó 3 áreas de 16 cuadrillos utilizados comúnmente para el conteo de leucocitos; simultáneamente, hicimos el recuento diferencial examinando 100 células o un número cercano a 100.

## RESULTADOS

1) Se separaron dos lotes de 100 larvas de 8 días de nacidas; a un lote se le hizo ingerir artificialmente sangre heparinizada e inactivada de conejo, adicionada con formas de cultivo de *T. rangeli* para contener 10 critidias por campo de mediano aumento; el otro lote ingirió solamente sangre heparinizada e inactivada. De esta manera, infestamos 100 larvas con *T. rangeli* y dejamos otras 100 como control; ambas se mantuvieron durante todo el tiempo bajo condiciones estabilizadas. A partir de esta primera comida artificial y después de cada muda, se alimentaron las ninfas experimentales y controles sobre sendos conejos. Durante todo el desarrollo metamorfofóico se anotó el número de insectos muertos en cada estadio. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla I en donde el mismo tiempo, se comparan con los obtenidos por GREWAL<sup>3</sup> y por TOBIE<sup>9</sup>.

2) Con el objeto de establecer si ocurría alguna modificación hemocitaria en los *R. prolixus* infestados con *T. rangeli*, tomamos dos grupos de 30 ninfas de 3.º estadio que se alimentaron artificialmente, un grupo con sangre heparinizada de conejo conteniendo 750 critidias de *T. rangeli* por mm<sup>3</sup> y el otro grupo, usado como control, con sangre heparinizada únicamente. Después de la

TABLA I

Porcentaje de mortalidad de *R. prolixus* sanos e infestados con *T. rangeli*

Estadios	Infestados			Controles	
	GÓMEZ (1966)	GREWAL (1956)	TOBIE (1965)	GÓMEZ (1966)	TOBIE (1965)
1 .....	64.00	27.17	13.00	19.00	3.25
2 .....	19.44	9.41	12.64	11.11	4.70
3 .....	10.34	24.68	1.32	9.72	3.52
4 .....	46.15	12.07	2.67	3.08	0.00
5 .....	57.14	19.61	9.59	1.59	5.84
Adultos Sobrevivientes	6	34	66	62	84

Nota: Los porcentajes anotados se calculan tomando como 100 el número de insectos que van sobreviviendo.

muda subsiguientes, ocurrida 20 días más tarde, tanto los insectos experimentales como los controles se alimentaron sobre conejos sanos. Seguidamente cada grupo de 30 insectos fué dividido en tres subgrupos de 10 insectos. A un subgrupo control y a otro experimental se le estudió la hemolinfa a las 24 horas después de ingerir sangre del conejo, a otro subgrupo se le estudió la hemolinfa a las 48 horas y al tercero a las 72 horas. Se estimó el número de células por milímetro cúbico y se hizo un recuento diferencial de las mismas. La Table II nos muestra los resultados obtenidos; cada dato representa un promedio de 10 recuentos hechos en 10 insectos.

obtenidos por aquella Autora. En efecto, la mayor mortalidad ocurre en el primer estadio ninfal y decrece gradualmente hacia el tercer estadio para aumentar sucesivamente en el cuarto y quinto estadio. El estadio más altamente susceptible es el primero.

Registramos una muy alta mortalidad en los insectos infestados que discrepa considerablemente con los valores de mortalidad obtenidos por los Autores mencionados. Atribuimos esta discrepancia al tamaño del inóculo inicial; mientras nosotros utilizamos sangre con 10-12 parásitos por campo de preparación fresca, GREWAL usó inóculos con 1-2 parásitos por campo y TOBIE no precisa el tamaño del inóculo empleado. Ello ex-

TABLA II

Estudio hemocitario de *R. prolixus* controles y experimentales

Tipo de células de la hemolinfa	% de células					
	24 horas		48 horas		72 horas	
	Control	Exptl.	Control	Exptl.	Control	Exptl.
Adipohemocitos .	6,62	0,32	0,00	1,30	16,89	15,53
Plasmaticos ...	27,57	38,11	40,13	38,02	26,06	30,45
Hem. granular .	10,11	6,37	8,74	11,59	4,98	8,97
Prohemocitos ...	11,40	7,86	11,66	6,90	8,86	4,97
Explocitos .....	43,57	46,07	39,01	59,84	42,74	38,54
Oenocitoides ....	0,74	1,27	0,45	2,34	0,51	1,59
Total de células por mm <sup>3</sup> .....	604	942	495	768	1.078	1.951

#### DISCUSION

A pesar de que GREWAL<sup>3</sup> no incluyó en su trabajo datos sobre la mortalidad natural de *R. prolixus*, nuestros resultados confirman los de aquél al encontrar diferencias significativas entre la mortalidad de grupos de chupones sanos y grupos infestados por el *T. rangeli*.

Al comparar nuestros resultados sobre mortalidad relativa de los diferentes estadios de *R. prolixus* infestados con *T. rangeli* con los obtenidos por GREWAL<sup>3</sup> y por TOBIE<sup>9</sup> observamos que concuerdan mejor con los

plicaria por una parte, el por que nuestra máxima mortalidad se registró en el primer estadio y por la otra nuestra bajísima supervivencia. Sin embargo a pesar de un cuidadoso examen de la hemolinfa solo pudimos observar parasitismo hemolinfático en un 2% de los supervivientes de 5 estadio que no alcanzaron el estadio adulto. En cambio, GREWAL registra infección celómica en el 53% de los insectos experimentales. El 23,3% de esos mismos insectos presentó invasión de las glándulas salivales por los parásitos. TOBIE<sup>9</sup> observa que de un lote de 273 ninfas de primer estadio infestadas, so-

brevivieron hasta adulto 147 y de estos, el 19% presentó la infección en las glándulas salivales.

Todo lo expuesto conduce a pensar que la acción patógena del *T. rangeli* sobre el *R. prolixus* se ejerce dentro del tubo digestivo y no como supone GREWAL, pro acción mecánica sobre el sistema hemolinfático. En efecto, a una baja densidad de parásitos ingeridos y una alta incidencia de linfoparasitismo corresponde, por una parte una baja mortalidad en los estadios juvenes y por la otra una alta supervivencia en el estadio adulto; por el contrario a una densa ingestión del parásito, corresponde una alta mortalidad durante la metamorfosis y una bajísima supervivencia de imagos.

Quedaría por discutir por qué nuestros insectos presentaron un bajísimo índice de linfoparasitismo.

GREWAL utilizó la cepa "Tocuyo" de *T. rangeli* y realizó sus investigaciones en 1956; nosotros hemos utilizado la misma cepa nueve años más tarde, es decir, después de un prolongado mantenimiento *in vitro*.

TOBIE<sup>8</sup> trabajando con la misma cepa, encuentra que para 1962, dos años después de iniciado el mantenimiento cíclico de *T. rangeli* por pasajes alternados de insectos-ratas juvenes, se registra la invasión de las glándulas salivales en un 12% de los insectos experimentales y a partir de entonces, entre el 8 y 18 pasaje, ese porcentaje aumenta hasta el un 50%. La misma Autora (1961) encuentra en la inoculación directa de *T. rangeli* cultivados, en el hemocele de *R. prolixus*, no solo hace infestante al protozoo sino que facilita su mantenimiento cíclico.

Estos hallazgos explicaran nuestros resultados; después de un prolongado período de cultivo *in vitro* la cepa "Tocuyo" de *T. rangeli* ha perdido su capacidad para invadir la hemolinfa del *R. prolixus* lo cual no indica que haya dejado de ser patógena par el insecto; esa cepa utilizada nueve años antes, podía invadir con relativa facilidad el hemocele de un 53% de los insectos con ella infestados; y después de un prolongado pasaje serial através del insecto y del vertebrado, recupera su capacidad para invadir al menos la hemolinfa de un 50% de los insectos.

GREWAL<sup>3</sup>, sin especificar cual era el estado fisiológico de sus insectos, observa que

la infección hemolinfática por el protozoo se acompaña de una considerable reducción del número de células sanguíneas. Es probable que ello ocurra; nosotros hemos estudiado ese problema examinando insectos normales e infestados que tenían la misma edad y se encontraban en el mismo estado fisiológico, observando que el número total de células es significativamente mayor en los insectos infestados. La hiperhemolinfocitosis de los animales infestados no se debe al aumento particular de un determinado tipo de células sanguíneas.

#### CONCLUSIONES

1) Se estudia el papel patógeno del *T. rangeli* sobre el *R. prolixus*, comparando la mortalidad natural de insectos normales y de insectos infestados mediante la ingestión artificial de sangre contaminada con *T. rangeli*.

2) Se ensaya la técnica de alimentación artificial de *R. prolixus*, aplicandola para infestarlos con *T. rangeli*.

3) Se formula una nueva hipótesis para explicar la patogenicidad del *T. rangeli*, suponiéndose que esta se ejerce dentro del tubo digestivo, en lugar del sistema hemolinfático, como anteriormente se habia explicado.

4) Se establece que la invasión hemolinfática del insecto por el protozoo es un fenómeno que — hasta donde indica la evidencia — es diferente a la acción patógena del *T. rangeli* sobre el *R. prolixus*.

5) Aún cuando el *T. rangeli* sometido a un largo período de cultivo *in vitro*, no invade el hemocele del *R. prolixus* su presencia en el tubo digestivo produce una hiperhemolinfocitosis.

#### SUMMARY

*New observations about Trypanosoma rangeli Tejera, 1920, and its pathogenic action on Rhodnius prolixus Stal, 1859*

*Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920, is pathogenic for its natural host, *Rhodnius prolixus* Stal, 1859; the insect may be infested

by means of artificial feeding and the pathogenic action may take place in the digestive tube even though the flagellate does not enter the hemolymphatic system of the insect. In addition to the mortality which is an index of the pathogenicity, a considerable increase of the total number of hemolymphatic cells is observed in the infested insects.

#### REFERENCIAS

1. ARNOLD, J. W. — Observations on living haemocytes in wing veins of cockroach *Blaberus giganteus* (L.) (Orthoptera; Blattellidae). *Ann. Entom. Soc. Amer.* 52:229-236, 1959.
2. FRIEND, W. G. & CARTWRIGTH, E. — A practical apparatus for feeding artificial diets to all stages of *Rhodnius prolixus* Stal. *Canad. Entomol.* 95:362-364, 1963.
3. GREWAL, M. S. — Pathogenicity of *Trypanosoma rangeli* Tejera 1920 in the vertebrate host. *Exp. Parasit.* 6:123-130, 1956.
4. HOLLANDE, A. C. — Contribution à l'étude du sang des Coléoptères. *Arch. Zool.* 2:271-294, 1909.
5. HOLLANDE, A. C. — Etudes histologiques comparées du sang insectes à hémorrhée. *Arch. Zool.* 6:283-323, 1911.
6. JONES, J. C. & LIU, D. P. — Total and differential haemocytes counts of *Rhodnius prolixus* Stal. *Bull. Entom. Soc. Amer.* 7:166, 1961.
7. TOBIE, E. J. — Experimental transmission and biological comparison of strain of *Trypanosoma rangeli*. *Exp. Parasit.* 11:1-9, 1961.
8. TOBIE, E. J. — Increased infectivity of a cyclically maintained strain of *Trypanosoma rangeli* to *Rhodnius prolixus* and mode of transmission by invertebrate host. *J. Parasit.* 5:593-598, 1964.
9. TOBIE, E. J. — Biological factors in fluencing transmission of *Trypanosoma rangeli* by *Rhodnius prolixus*. *J. Parasit.* 51:837-841, 1965.
10. YEAGER, J. F. — The blood picture of the southern army worm (*Prodenia eridania*). *J. Agric. Res.* 71:1-40, 1945.
11. WIGGLESWORTH, V. B. — The role of the haemocytes in the growth and moulting of an insect, *Rhodnius prolixus* (Hemiptera). *J. Exp. Biol.* 32:649-663, 1955.
12. WIGGLESWORTH, V. B. — The haemocytes and connective tissues formation in an insect, *Rhodnius prolixus* (Hemiptera). *Quart. J. Microbiol. Sci.* 97:89-98, 1956.

Recebido para publicação em 1/9/1966.