

Observaciones sobre la periodicidad de las microfilarias de *Ochoterenella* en *Bufo marinus* de Colombia*

por

C. J. Marinkelle**

(Recibido para su publicación el 28 de abril de 1967)

El *Bufo marinus* es un sapo grande muy común en Centro y Sur América y frecuentemente utilizado como animal de laboratorio; es fácil el mantenerle en cautiverio y a menudo hospeda microfilarias (Mf.). En condiciones naturales este sapo es activo durante la madrugada y al atardecer.

Existen muchas teorías e hipótesis sobre el fenómeno de la periodicidad de las Mf. (4, 5), pero hasta el presente falta mucho por conocer a fin de poder dar una explicación universal de dicho fenómeno, ya que hasta la fecha no se ha informado periodicidad en Mf. de anfibios.

El presente trabajo tiene por finalidad estudiar el fenómeno de periodicidad de las Mf. de *Ochoterenella* sp. en *B. marinus*.

MATERIAL Y METODOS

Se examinó la sangre de 1032 sapos de la especie *Bufo marinus*, provenientes del Centro, Occidente y Norte de Colombia, con el objeto de averiguar la presencia de Mf. Los sapos se mantuvieron en el laboratorio a temperaturas entre 21°C y 28°C (promedio 23°C) y humedad relativa de 65 - 75%. Dos veces a la semana fueron obligados a ingerir 6 gramos de hígado fresco.

Las Mf. fueron colectadas de sangre obtenida por punción cardíaca y concentradas según la técnica de KNOTT (6). En aquellos casos en que se observaron Mf. en preparaciones a fresco se practicaron extensiones que se tiñe-

* Parte de este estudio fue financiado por la organización "FORGE", Nueva York, E.E.U.U.

** Universidad de los Andes, Bogotá, Colombia. (Depto. de Biología)

ron con Giemsa. El recuento de las Mf. se hizo en cámara cuenta glóbulos tipo Thomas o con microcapilares estandarizados cubiertos con gel de silicona.

Los cadáveres de 350 sapos seccionados se colocaron en solución salina al 0.8% con el objeto de facilitar la recolección de las filarias adultas. Los embriones se obtuvieron por presión de los úteros de hembras grávidas. Todas las filarias adultas fueron muertas con ácido acético y preservadas en una mezcla de alcohol-formol-glicerina.

Se hicieron conteos de las Mf. de 177 sapos entre las 10 AM y las 4 PM y de 57 sapos entre las 10 PM y 1 AM. Los animales de ambos grupos fueron sangrados por punción cardíaca hasta su muerte. Se comparó el número de Mf. por ml de sangre con el número de filarias adultas colectadas.

Otros 211 sapos en los que previamente se habían encontrado Mf. se sometieron a seis sangrías diurnas y seis nocturnas del corazón en el lapso de 38 días y se hicieron conteos de las Mf. entre las 10 AM y 4 PM y las 6 PM y 1 AM.

Con el fin de estudiar la posibilidad de que existieran diferencias en las localizaciones tisulares de las Mf., en horas distintas del día, se hicieron autopsias de 60 sapos. Estos, en los que ya se había demostrado la presencia de Mf. anteriormente, fueron divididos en tres grupos iguales y se examinaron a las 8 AM, 3 PM y 11 PM. Para disminuir la posibilidad de una emigración post-mortem de las Mf., los sapos fueron sacrificados en un dispositivo similar a un "egg slicer" que consta de una serie de cuchillas dispuestas verticalmente; así fue posible matar instantáneamente a los sapos, seccionándoles la cabeza y extremidades y así se obtuvieron secciones de todos los tejidos blandos de un espesor de 5 mm aproximadamente. De cada sección se practicaron preparaciones microscópicas por impresión y por corte histológico. Las diferentes partes de las vísceras fueron digeridas por separado con pancreatina o tripsina; las Mf. fueron aisladas por tamizado y centrifugación, calculando el número de Mf. por gramo de tejido digerido y comparándolo luego con el número de filarias hembras adultas.

Se prestó especial interés a los siguientes órganos y tejidos: cerebro, músculos estriados, tejidos subcutáneos y adiposos, pulmones, hígado, corazón, bazo, riñones, ovarios o testículos y pared intestinal.

La influencia de la actividad muscular sobre la densidad de Mf. en la sangre se observó en un grupo de 14 sapos que fueron obligados a saltar por períodos de 1 a 2 horas durante el día o la noche, y se examinó a cada animal, antes e inmediatamente después del ejercicio.

Se hicieron experimentos para averiguar la posible influencia de la temperatura ambiental sobre la periodicidad de las Mf. Para ello, los anfibios fueron expuestos a cambios bruscos de la temperatura ambiental de la siguiente manera: de 18°C a 25°C; de 23°C a 30°C; de 35°C a 23°C y de 30°C a 23°C. También se hicieron pruebas en el campo y en el laboratorio con el objeto de localizar el vector de las filarias de estos sapos. Usando varios tipos de trampas para insectos, se hicieron esfuerzos para coleccionar artrópodos hematófagos atraídos por los sapos. Además se ensayaron los siguientes artrópodos hematófagos con el fin de

determinar si éstos se alimentaban de los sapos: *Culex* spp., *Aedes aegyptii*, *Rhodnius prolixus*, *Triatoma dimidiata capitata*, *T. infestans*, *Cimex hemipterus*, *C. lectularius*, *Ornithodoros moubata*, *O. rudis* y *Amblyomma rotundum*. Las garrapatas de cuerpo duro, *Amblyomma rotundum* y *A. humerale*, adheridas a los sapos recién capturados, fueron examinadas para investigar la presencia de estados evolutivos de filarias (10).

RESULTADOS

Un 44% de los sapos originarios del centro y 86% de los sapos del occidente de Colombia presentaron Mf. en la sangre; sin embargo, los originarios del norte no las portaban. Todas las filarias adultas fueron identificadas como *Ochoterenella* sp. (probablemente *Ochoterenella digicauda* Caballero, 1944) y sólo se hallaron dos ejemplares machos en 350 sapos examinados. Se colectaron hasta 12 filarias hembras por sapo, hallándose que los gusanos adultos estaban localizados siempre en el pequeño espacio situado entre los pulmones y los músculos de la cintura pectoral. Los embriones obtenidos al exprimir los úteros grávidos de las filarias fueron en promedio un poco más cortos y gruesos que las Mf. halladas en la sangre del sapo.

Los resultados obtenidos del examen de 177 sapos portadores de Mf. que fueron examinados entre las 10 AM y las 4 PM y los obtenidos del examen de 57 sapos examinados entre las 10 PM y la 1 AM están expuestos en las tablas 1 a 3. En estas tablas se ve que la mayoría de los sapos hospedaban de 3 a 6 filarias hembras adultas y cuando habían más de ellas presentes, se encontraron menos Mf. por ml de sangre y por gusano. También se demuestra en la tabla 3 que el número de Mf. por ml de sangre presentes entre las 10 PM y la 1 AM, calculado por hembra adulta colectada, es menor que la cantidad de Mf. presentes entre las 10 AM y 4 PM, puesto que en análisis de "t", efectuado a partir de las muestras estadísticas, demuestra que los valores promedios encontrados (Tabla 3), son altamente diferentes entre sí. Para 15 grados de libertad el valor de "t" está por debajo de 0.001.

De 211 sapos sangrados seis veces durante el día y la noche en el lapso de 38 días, solamente 12 sobrevivieron hasta el fin del experimento; la tabla 4 muestra que el número de Mf. presentes en la sangre de cada sapo, calculado por la filaria hembra adulta, también es menor en las horas de la noche que en las horas del día. No hubo diferencia significativa en el número de Mf. hallado en la sangre de los sapos obligados a saltar durante 1 a 2 horas en el día o la noche, antes y después del ejercicio.

Los sapos que sufrieron cambios de temperatura ambiental, de 18°C a 35°C; de 23°C a 30°C; de 35°C a 23°C y de 30°C a 23°C no demostraron diferencias significativas en el número de Mf. por ml de sangre, cuando los animales se examinaron a la misma hora del día.

La localización de las Mf. en 3 grupos de sapos, de 20 individuos cada uno y que fueron examinados a las 8 AM, 3 PM y 11 PM se muestra en la tabla 5. Ninguna o muy pocas microfilarias fueron halladas en el cerebro,

TABLA 1.

Número de microfilarias (Mf.) en sangre entre las 10 AM y las 4 PM

Número de sapos examinados	Número de gusanos adultos por sapo	Número total de gusanos adultos encontrados	Número de Mf. por ml de sangre	Número promedio de Mf. por gusano adulto
5	1	5	188 — 444	346
8	2	16	221 — 684	483
38	3	114	388 — 842	460
42	4	168	546 — 824	382
36	5	180	634 — 1048	346
18	6	108	684 — 1168	308
12	7	84	748 — 1242	286
6	8	48	862 — 1268	268
5	9	45	884 — 1324	248
4	10	40	846 — 1362	226
2	11	22	820 — 1342	186
1	12	12	1020	85

TABLA 2.

Número de microfilarias (Mf.) en sangre entre las 10 PM y la 1 AM

Número de sapos examinados	Número de gusanos adultos por sapo	Número total de gusanos adultos encontrados	Número de Mf. por ml de sangre	Número promedio de Mf. por gusano adulto
2	1	2	60 — 152	106
4	2	8	72 — 231	112
12	3	36	130 — 311	137
14	4	56	202 — 300	121
10	5	50	211 — 314	106
9	6	54	231 — 340	102
4	8	32	286 — 420	90
2	9	18	301 — 466	85

músculos estriados, tejidos adiposos, riñones, ovarios o testículos o pared intestinal. La frecuencia de las Mf. en el hígado y el bazo fue significativamente mayor en la noche que durante el día. Esta diferencia no pudo ser demostrada en los pulmones.

Ninguno de los artrópodos que se alimentaron de la sangre de los sapos demostró evidencia de desarrollo de filarias. Algunas de las garrapatas y *Aedes aegypti* mostraron Mf. degeneradas en su tracto intestinal.

TABLA 3.

Número promedio de microfilarias (Mf.) por ml de sangre ()*

Número de gusanos adultos por sapo	10 AM a 4 PM		10 PM a 1 AM	
	Número de sapos examinados	Número promedio de Mf. por gusano= \bar{X}_1	Número de sapos examinados	Número promedio de Mf. por gusano= \bar{X}_2
1	5	346	2	106
2	8	483	4	112
3	38	460	12	137
4	42	382	14	121
5	36	346	10	106
6	18	308	9	102
7	12	286	—	—
8	6	268	4	90
9	5	248	2	85
		$\bar{X}_1 = 347.44$		$\bar{X}_2 = 107.37$
10	4	226	—	—
11	2	186	—	—
12	1	85	—	—

(*) Calculado por gusano hembra adulto.

TABLA 4.

Frecuencia de microfilarias (Mf.) en 12 sapos sangrados 12 veces durante 38 días

Número de sapos examinados	Número de gusanos adultos por sapo	Número promedio de Mf. por ml de sangre cardíaca	
		Día (10 AM - 4 PM) (6 exámenes)	Noche (6 PM - 1 AM) (6 exámenes)
3	3	558 — 612	233 — 268
5	5	842 — 968	246 — 432
2	6	912 — 942	308 — 368
2	8	1104 — 1112	398 — 416

TABLA 5.

Número promedio de microfilarias (Mf.) recuperadas de órganos de los sapos ()*.

Número de sapos examinados	Hora de sacrificio	Tejidos subcutáneos	Órganos				Total por sapo
			Hígado	Bazo	Pulmón	Otros órganos	
20	8 AM	68	122	164	44	0	398
20	3 PM	400	8	14	46	4	472
20	11 PM	28	210	188	42	2	470

(*) Todos los sapos examinados tenían de 3 a 6 filarias hembras adultas.

DISCUSION Y CONCLUSIONES

La *Ochoterenella* sp., motivo de este trabajo, pertenece a la subfamilia Onchocercinae, a la cual también pertenecen los géneros *Wuchereria*, *Onchocerca*, y *Dipetalonema* (2). La periodicidad de las Mf. de Onchocercinae se conoce únicamente en los géneros *Wuchereria* y *Dipetalonema* y hasta el presente no se ha informado periodicidad de las Mf. de anfibios.

Ni las actividades respiratorias o musculares, ni los cambios de temperatura demostraron tener influencia en la periodicidad de las Mf. Esto contrasta con los numerosos informes sobre la periodicidad de las Mf. de mamíferos (4, 5).

Aunque WALTON (9), CAUSEY (1) y Desportes y Harrant (citado por PECHUMAN y WIRTH, 8) han informado que las filarias de sapos y ranas *Foleyella ranae* e *Icosiella neglecta* pueden ser transmitidas respectivamente por *Culex* sp., *Aedes* sp. y por *Forcipomya (Lasiohelea) velox*, muy poco se sabe hasta ahora acerca de los vectores de filarias de anfibios. No se halló ningún artrópodo que pudiera ser considerado como huésped intermediario de las filarias de *B. marinus*. Se podría considerar que un insecto de hábitos alimenticios diurnos fuera el vector, si se tiene en cuenta la periodicidad diurna en la sangre periférica de la Mf. *Ochoterenella* sp.

El hecho de no haber observado una mayor frecuencia de Mf. durante la noche con respecto al día en los pulmones de los sapos, podría explicarse en la no existencia de barreras pleurales y por la mayor proximidad de la localización de las filarias hembras adultas. Estas dos condiciones podrían favorecer una invasión permanente y más o menos uniforme de las Mf. hacia el pulmón, lo que no ocurriría en el hígado y otros órganos o tejidos más distantes y con envolturas o membranas protectoras.

El haber hallado menos Mf. por ml de sangre en los sapos con 10 hasta 12 filarias adultas, que la cantidad de Mf. calculada por filarias adultas en sapos con 1 hasta 9 filarias (tabla 3) puede explicarse por la hipótesis de que cuando muchas hembras están presentes, ellas producen menos Mf. Este fenómeno de efecto aglomerativo o "crowding effect" (7) es bien conocido en el caso de varios helmintos intestinales de mamíferos (3, 6). La producción diaria de Mf. por parte de las hembras no puede ser calculada por no existir datos acerca del tiempo de sobrevivencia de Mf. de los sapos. Sin lugar a dudas, exámenes a intervalos más cortos habrían dado mayor información acerca del ciclo de periodicidad de las Mf. Por razones técnicas fue imposible sangrar los sapos más frecuentemente. De 312 sapos escogidos al azar solamente 211 hospedaban Mf., y sólo 12 de estos últimos sobrevivieron a las 12 punciones cardíacas verificadas en el período de 38 días.

Muchas veces se considera que tanto la producción de Mf. por las filarias, como la supervivencia de las Mf. es irregular; así el número de las Mf. circulantes a veces fluctúa de un momento a otro. Sin embargo, tal fluctuación no fue observada en los sapos sangrados 12 veces en un período de 38 días (Tabla 4). Entre el grupo de sapos sangrado de 10 AM a 4 PM y el grupo san-

grado de 10 PM a 1 AM se observó diferencia significativa (Tabla 3) que parece deberse a la periodicidad "real" de las Mf. Se consideraron solamente sapos que albergaban de 1 a 9 filarias adultas y se excluyeron 7 casos en los cuales fueron encontrados más de 9 gusanos adultos por sapo, para descontar posibles efectos del "crowding effect". Factores tales como irregularidad en la producción de Mf., muerte o eliminación de Mf. por el huésped (Tabla 4), influencia de la actividad respiratoria del huésped, influencia de la temperatura ambiental y migración post-mortem de las Mf. podrían interferir en la producción de Mf. pero están prácticamente excluidas.

RESUMEN

Un total de 1032 sapos (*Bufo marinus*) fueron examinados para observar la presencia de Mf. Los sapos reconocidos como portadores de Mf. se examinaron entre las 10 AM y las 4 PM (177 ejemplares) y entre las 10 PM y la 1 AM (57 ejemplares). El número de Mf. encontradas por ml de sangre, comparado con el número de hembras adultas obtenidas de los sapos examinados, mostró que había más Mf. presentes en la sangre del corazón durante el día que durante la noche. Los sapos sangrados 6 veces al día y 6 veces en la noche en un período de 38 días mostraron también que había menos Mf. en la sangre durante la noche.

Los experimentos demostraron que la actividad muscular y respiratoria, al igual que la temperatura, no influyeron sobre la frecuencia de las Mf. en la sangre durante el día o la noche.

Este es el primer informe de la periodicidad de las Mf. en los anfibios y la segunda en la periodicidad de las Mf. en especies pertenecientes a la subfamilia Onchocercinae, al cual, los géneros de *Wuchereria*, *Onchocerca* y *Dipetalonema* también pertenecen.

SUMMARY

A total of 1032 toads (*Bufo marinus*) were examined for the presence of microfilariae (Mf.). Toads known to harbour Mf. were examined between 10 AM and 4 PM (177 individuals), and between 10 PM and 1 AM (57 individuals). The number of Mf. found per ml of blood, compared with the number of adult females recovered from the dissected toads, showed that less Mf. were present in the heart blood at night than at day time. It was also found that when more than the average number of females were present, less Mf. were found in the peripheral blood (calculated per recovered female). Toads bled 6 times during the day and 6 times at night for a period of 38 days also showed that significantly less Mf. were present in the night blood. Experiments showed that neither muscular and respiratory activity, nor temperature influenced the Mf. density in the blood during the day or at night.

This is the first report of Mf. periodicity in amphibians and the second on Mf. periodicity of species belonging to the subfamily Onchocercinae, to which the genera *Wuchereria*, *Onchocerca* and *Dipetalonema* also belong.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Dr. W. A. Thornton y al Dr. Norman Williams su interés y ayuda en este trabajo. Igualmente se agradecen las facilidades otorgadas por las Directivas de la Universidad del Valle y por los funcionarios de la Fundación Rockefeller en la estación de Río Raposo (Valle, Colombia). Al profesor G. Montaña (U. Nacional de Colombia) y al profesor E. Rodríguez (U. de Cartagena, Colombia), les manifiesto sinceros agradecimientos por la lectura del manuscrito y al Sr. Luis Granobles por la evaluación estadística de los datos presentados.

REFERENCIAS

1. CAUSEY, O. R.
1939. Description of three species of frog microfilariae, with notes on staining methods. *Amer. J. Hyg.* 30 (3): 117-121.
2. CHABAUD, A. G., & R. C. ANDERSON
1959. Nouvel essai de classification des filaires (superfamille des Filarioidea) II. *Ann. Parasit. Hum. Comp.* 34 (1-2): 64-87.
3. GRATAMA, S.
1966. Onchocerciasis in the southeastern territories of Liberia. With studies on the role of *Onchocerca volvulus* and *Wuchereria bancrofti* in the pathogenesis of hydrocele and elephantiasis. *Acta Leidensia* 35: 1-135
4. HAWKING, F., K. GAMMAGE & M. J. WORMS
1965. The periodicity of microfilariae. X. The relation between the circadian temperature cycle of monkeys and the microfilarial cycle. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 59 (6): 675-680.
5. HAWKING, F., S. PATTANAYAK, & H. L. SHARMA
1966. The periodicity of microfilariae. XI. The effect of body temperature and other stimuli upon the cycles of *Wuchereria bancrofti*, *Brugia malayi*, *B. ceylonensis* and *Dirofilaria repens*. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 60 (4): 497-513.
6. KNOTT, J.
1930. A method for microfilarial surveys on day blood. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 33: 191-197.
7. NOBLE, E. R., & G. A. NOBLE
1964. *Parasitology - The Biology of Animal Parasites*. 3d ed. Lea & Febiger, Philadelphia, 724 pp.
8. PECHUMAN, L. L., & W. W. WIRTH
1961. A new record of Ceratopogonidae (Diptera) feeding on frogs. *J. Parasitol.* 47 (4): 600.
9. WALTON, A.
1929. The nematodes of North American frogs. I. *J. Parasitol.* 15 (4): 227-240.
10. WHO REPORT
1962. *Expert Committee on filariasis (Wuchereria and Brugia infections)*. Wld. Hlth. Org., tech. Rep. Ser. N° 233: 45 pp.