

Mantenimiento en el laboratorio de *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli* Tejera, 1920

G. A. Vallejo

Laboratorio de Biología, Universidad de Tolima, Apartado Aéreo 546, Ibagué, Colombia.

C. J. Marinkelle, F. Guhl y N. de Sánchez

Laboratorio de Microbiología y Parasitología, Universidad de los Andes, Apartado Aéreo 4976, Bogotá, D. E., Colombia.

(Recibido: 4 de junio de 1985)

Abstract: Two laboratory maintenance systems of *Trypanosoma rangeli* were compared. The maintenance by weekly subinoculations in Tobie's culture medium and the intrafemoral inoculation of *Rhodnius prolixus* with cultured flagellates, resulted in loss of infectivity of the metacyclic salivarian trypomastigotes for mice, ten months after maintenance in culture. With the system of cyclical passes through culture-Rhodnius-mouse-culture-Rhodnius, the infectivity of the metacyclic trypomastigotes for mice, was maintained during the three years of the experiment.

The number and percentage of metacyclic trypomastigotes formed in the salivary glands of *R. prolixus*, previously inoculated intrafemorally or intracoelomically with culture forms of *T. rangeli*, did not show correlation with the inoculated dose, however the inoculated quantity demonstrated a direct relation with the mortality rate of the insects.

The results indicate that *T. rangeli* requires an adequate maintenance system, so that under experimental condition the biological characteristics, normally expressed under natural conditions, are conserved.

Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli Tejera, 1920, es uno de los dos tripanosomas humanos informados de América. Aunque es apatógeno para el vertebrado, su presencia en infecciones puras o mezcladas con *T. cruzi*, interfiere con el acertado diagnóstico de la enfermedad de Chagas, debido a las frecuentes reacciones serológicas cruzadas (Guhl y Marinkelle, 1982) o a la existencia de algunos flagelados intestinales, presentes en los triatomíneos vectores, los cuales son morfológicamente indiferenciables cuando se examinan en placas coloreadas con el microscopio de luz (Schottelius, 1982; Schottelius y Müller, 1984; Vallejo, tesis M. Sc., Universidad de los Andes, Bogotá, 1984).

Es un hecho conocido que los fracasos para infectar experimentalmente a los mamíferos susceptibles con *T. rangeli*, están relacionados con la pérdida de la infectividad de los flagelados cuando se mantienen *in vitro* durante largo tiempo. Este fenómeno se ha observado aún cuando los flagelados se formen en las glándulas salivares de los triatomíneos vectores com-

probados, pero por razones desconocidas, los metatripomastigotes se tornan no infectivos (D'Alessandro, 1976).

Consecuentemente, se piensa que las cepas de *T. rangeli*, se deben estudiar tan pronto como sea posible después de su aislamiento, antes que se modifiquen algunas de sus principales características biológicas. Alternativamente, varios investigadores han diseñado mecanismos para mantener cíclicamente a *T. rangeli* en el laboratorio, a través de pasajes seriados por ratón-triatomíneo-ratón-triatomíneo, etc., cultivo-ratón-cultivo-ratón, etc., o triatomíneo-cobayo-triatomíneo-cobayo, etc., (Tobie, 1964, 1968; D'Alessandro, 1972; Cuba, 1975). Estos procedimientos han prolongado por mayor tiempo la infectividad de las cepas.

Como consecuencia del reciente reporte de *T. rangeli* en el Brasil (Miles, 1983), así como del interés de varios investigadores por los estudios epidemiológicos, serológicos o bioquímicos comparativos entre *T. cruzi* y *T. rangeli*, se decidió a partir de los resultados obtenidos en la presente investigación, señalar la importan-

cia del mantenimiento adecuado de *T. rangeli*, para que los flagelados conserven sus características biológicas similares a aquellas que presentan en la naturaleza.

MATERIAL Y METODOS

Trypanosoma rangeli stock San Agustín, fue aislado de las glándulas salivares de *Rhodnius prolixus*, previamente usado en un xenodiagnóstico humano en la región de Choachí (Colombia). Los tripomastigotes metacíclicos se sembraron directamente en medio difásico de Tobie y se efectuaron repiques semanales; adicionalmente, la infectividad de las formas glandulares se comprobó por inoculación de las mismas en ratones CFW.

Los flagelados de cultivo contenidos en 0,01 ml. se inocularon intrafemoralmente en ninfas de *R. prolixus* de quinto estadio, según la técnica usada por Alvarenga N.J. (comunicación personal a F. Guhl N.) Cuando el inóculo se practicaba por vía intrafemoral, se utilizaba una aguja No. 27 cuyo diámetro se ajustaba exactamente al diámetro interno del tercer fémur seccionado; cuando el inóculo se aplicaba por vía intracelómica, se utilizaba una aguja No. 30 o un capilar muy fino, cuya inserción se practicaba lateralmente entre el 4º y 5º segmento abdominal, de acuerdo al método descrito por Coutinho y Nussen-zweig (1952) y D'Alesandro (1972).

Con la finalidad de investigar el efecto del número de flagelados inoculados, sobre la mortalidad de los *Rhodnius* y sobre la producción de los tripomastigotes metacíclicos en las glándulas salivares, se inocularon cuatro grupos de ninfas de quinto estadio, con diferentes cantidades de flagelados (desde 450 hasta 74000 flagelados de cultivo/*Rhodnius*). Se estudió la mortalidad de los vectores a partir del segundo día postinoculación y durante un mes.

Se contaron los epimastigotes y tripomastigotes metacíclicos observados en las glándulas salivares de otros cuatro grupos de *Rhodnius* inoculados en las mismas condiciones del experimento anterior. Con tal fin, a partir del octavo día y después cada tres días, las glándulas procedentes de tres insectos, se colocaron en 0,5 ml de PBS de pH 7,2; se rompieron cuidadosamente para liberar su contenido y los flagelados se contaron por duplicado en cámara de Neubauer, calculando finalmente el número por glándula.

Una vez escogido el inóculo, se diseñaron dos métodos de mantenimiento de *T. rangeli* en el laboratorio:

Mantenimiento A: Los flagelados de cultivo se repicaron semanalmente a nuevos medios durante 14 meses; mensualmente, se inocularon ninfas de quinto estadio con 0,01 ml de cultivo, conteniendo aproximadamente 10.000 flagelados. Los insectos se alimentaron sobre gallinas 48 horas después de inoculados y se guardaron en la oscuridad a 28 °C y 75% de humedad relativa. Durante las cuatro semanas siguientes se examinaron las glándulas de los insectos y su infectividad se comprobó por inoculación intraperitoneal de ratones CFW.

Mantenimiento B: En cada experimento se extrajeron las glándulas salivares de tres *R. prolixus* inoculados previamente con formas de cultivo de *T. rangeli*; si el número de formas infectantes oscilaba entre 100.000 y 200.000, se inoculaban intraperitonealmente en un ratón CFW. A partir del tercer día, se examinó la sangre del ratón para verificar la presencia de flagelados. Una vez confirmada la parasitemia, se sembró sangre del ratón en seis tubos de medio de Tobie. Los flagelados que aparecieron en el cultivo inicial, se repicaron sucesivamente a nuevos medios cada semana. Después de cuatro a seis repiques, un inóculo de 0.01 ml de cultivo, conteniendo 10.000 flagelados aproximadamente, se aplicó intrafemoral o intracelómicamente en ninfas de *R. prolixus* de quinto estadio. Los insectos se alimentaron sobre gallina 48 horas después de inoculados y se guardaron en las mismas condiciones de aquellos utilizados en el mantenimiento de tipo A. Las glándulas de los insectos se examinaron durante las cuatro semanas siguientes y cuando presentaron entre 100.000 y 200.000 tripomastigotes metacíclicos por glándula, se inocularon nuevamente ratones CFW, cada uno con las glándulas de tres *Rhodnius*, para así reiniciar el ciclo anteriormente descrito. Cada pasaje cíclico por *R. prolixus*-ratón-cultivo-*R. prolixus*, se repitió cada tres meses durante tres años.

RESULTADOS

La Fig. 1, representa la mortalidad acumulada de los triatomíneos cuando se inocularon intracelómicamente con 0.01 ml de cultivo, conteniendo un número variable de formas de

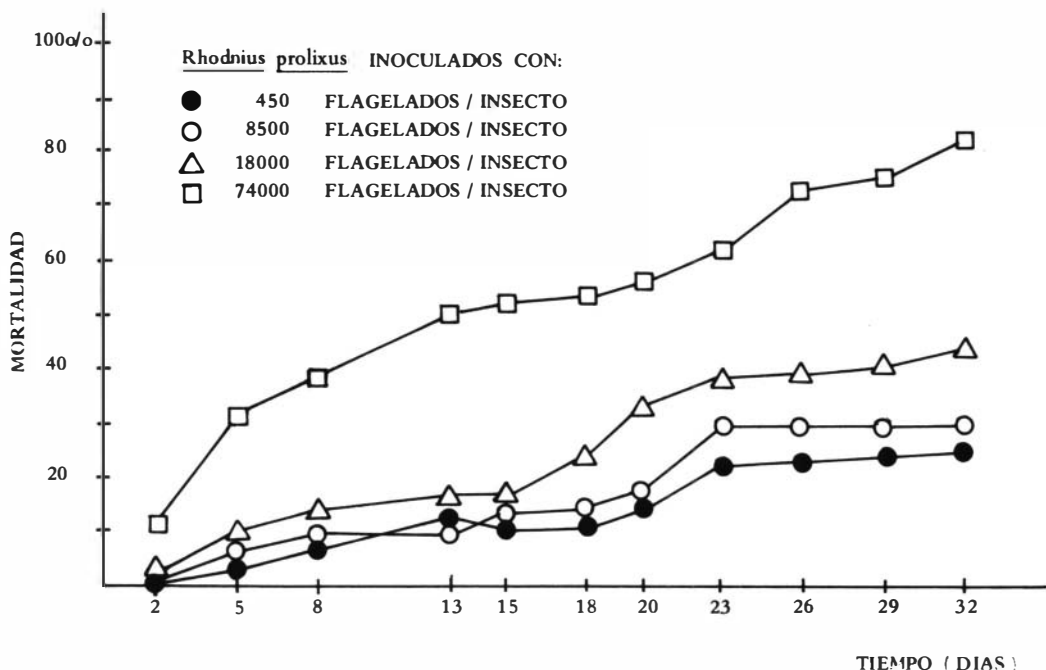


Fig. 1. Mortalidad de *Rhodnius prolixus* inoculados intracelómicamente con formas de cultivo de *Trypanosoma rangeli* stock San Agustín.

T. rangeli. La mortalidad no presentó diferencia significativa, cuando los insectos se inocularon con una dosis comprendida entre 450 flagelados/*Rhodnius* y 8500 flagelados/*Rhodnius* (24,5% y 29% de mortalidad respectivamente, 32 días postinoculación). Pero cuando los insectos se inocularon con 18.000 flagelados/*Rhodnius* y 74.000 flagelados/*Rhodnius*, la mortalidad fue significativamente mayor (44,4% y 82% respectivamente, 32 días postinoculación).

Estos resultados permitieron estimar que el inóculo productor de baja mortalidad, contenía desde un flagelado por cada cinco campos microscópicos hasta tres flagelados por campo microscópico, cuando 7,5 μ l de cultivo, se colocaban bajo una laminilla de 22 x 22 mm y se observaba con un objetivo de 40 x y un ocular de 10 x. Si el número de flagelados estaba en este rango, entonces se inoculaba 0,01 μ l.

Los presentes resultados coinciden con los obtenidos por D'Alessandro (1976), en el sentido de que sólo a partir del décimo primer día postinoculación, comenzaron a aparecer los tripomastigotes metacíclicos en las glándulas salivares.

Se observó que entre los 11 y 32 días, el número de tripomastigotes metacíclicos varió entre 5.000 y 200.000 por glándula, sin que exis-

tiera alguna relación entre el número de flagelados inoculados intracelómicamente y el número de tripomastigotes metacíclicos producidos. En algunos insectos que sobrevivieron hasta los 60 días postinoculación, el número de tripomastigotes metacíclicos ascendió hasta 500.000 por glándula.

La Fig. 2 indica la producción, expresada en porcentaje, de tripomastigotes metacíclicos de *T. rangeli* en las glándulas salivares de cuatro grupos de *R. prolixus* inoculados intracelómicamente con dosis variables de formas de cultivo. Los resultados revelaron que los tripomastigotes variaron desde 7,6% en el décimo primer día hasta 82% en el día 60 postinoculación. No se observó correlación entre el número de flagelados inoculados y la proporción de tripomastigotes metacíclicos producidos por glándula salivar.

Mantenimiento A (Figura 3): La inoculación intrafemoral de las ninfas de *R. prolixus*, condujo invariablemente a la formación de tripomastigotes metacíclicos en las glándulas salivares, cuya infectividad fue evidente hasta el noveno mes de mantenimiento de los flagelados en los medios de cultivo. Durante este tiempo, todos los ratones inoculados intraperitoneal-

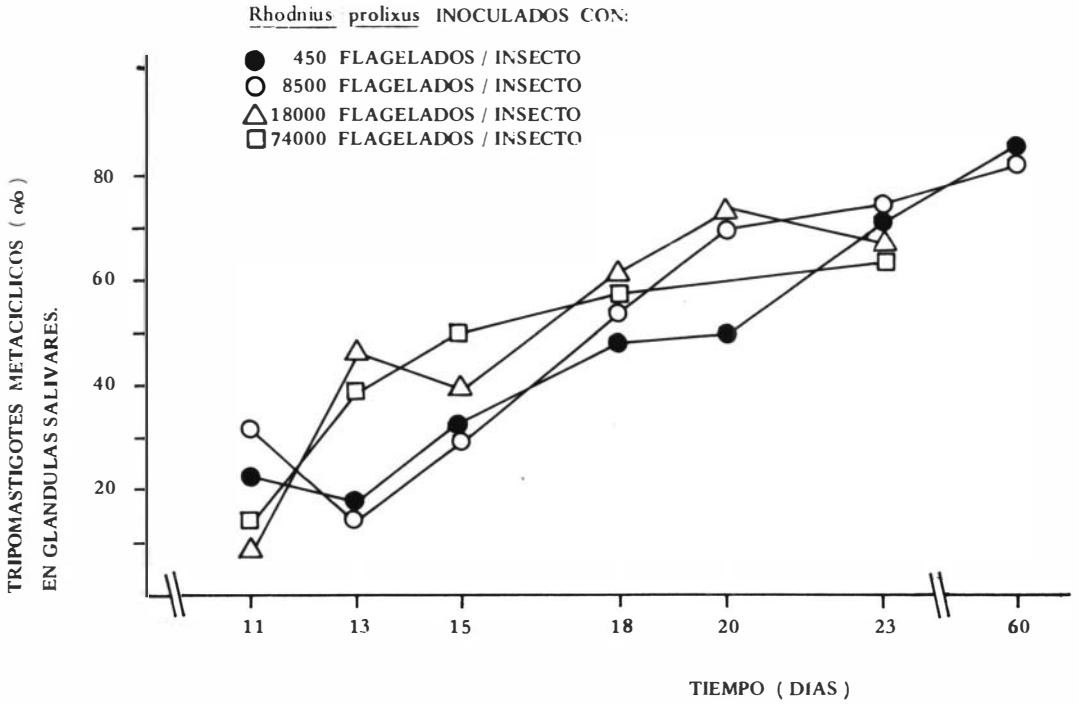


Fig. 2. Producción de tripomastigotes metacíclicos de *Trypanosoma rangeli* en las glándulas salivares de *Rhodnius prolixus* inoculados intracelómicamente con flagelos de cultivo. Cada punto representa el promedio de seis glándulas salivares.

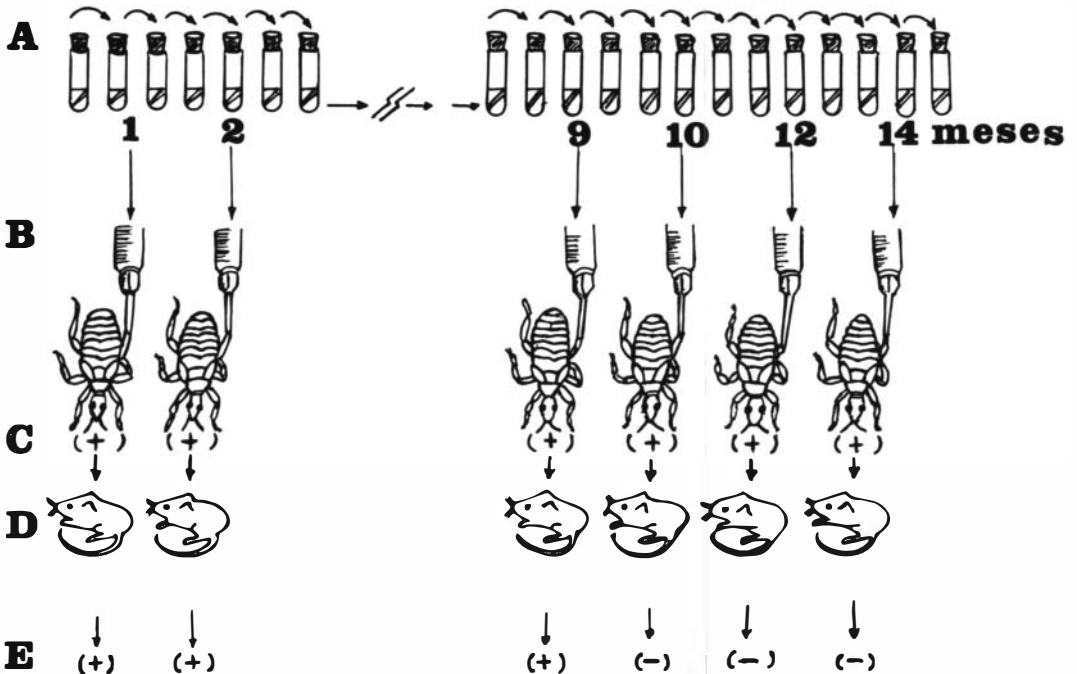


Fig. 3. Mantenimiento de *T. rangeli* (MÉTODO A): A. Repiques semanales de *T. rangeli* en medios de cultivo de Tobic B. Inoculación intrafemoral de ninfas de *R. prolixus* C. Examen de glándulas salivares para verificar la presencia de tripomastigotes metacíclicos. D. Inoculación intraperitoneal de glándulas positivas en ratones CFW. E. Examen parasitológico de sangre de ratón.

mente con las glándulas salivares, presentaron una parasitemia fácilmente detectable desde el tercero hasta el décimo segundo día postinoculación.

Después del décimo mes de mantenimiento de los flagelados en medios de cultivo, los tripomastigotes metacíclicos formados en las glándulas fueron incapaces de infectar a los ratones. En un experimento particular, se inocularon 33 ratones con edades comprendidas entre 2 y 60 días sin que hubiesen presentado formas sanguíneas detectadas por examen directo o por xenodiagnóstico.

Mantenimiento B (Figura 4): El mantenimiento cíclico de *T. rangeli* a través de cultivo-*Rhodnius*-ratón-cultivo-*Rhodnius* cada tres meses, durante los tres años del experimento, mostró invariablemente que la formación de los tripomastigotes metacíclicos en las glándulas salivares, se iniciaba a partir del décimo primer día postinoculación, presentando una relación equivalente de tripomastigotes metacíclicos y epimastigotes aproximadamente en el día 18 (figura 5); pero en el día 30, entre el 70% y 80% de las formas glandulares, correspondieron a tripomastigotes metacíclicos. Durante el experimento, la cepa conservó su infectividad y siempre produjo parasitemia evidente cuando se inoculaban ratones CFW con glándulas salivares de 18-20 días postinoculación de los insectos.

DISCUSION

No se observó relación entre el número de formas de cultivo inoculadas intracelómica o intrafemoralmente y la cantidad o proporción de tripomastigotes metacíclicos desarrollados en las glándulas salivares, en donde se produjo un número similar de formas infectantes, independientemente de los flagelados inoculados. Estos resultados son similares a los obtenidos por Zeledón y Monge (1966), cuando inocularon *R. prolixus* con dosis comprendidas entre 50×10^3 y 223×10^3 flagelados/insecto, logrando parasitemias máximas en la hemolinfa de 43×10^6 flagelados/ml, sin observar una correlación entre los picos de parasitemia y el tamaño del inóculo.

Por el contrario, el tamaño del inóculo mostró relación con la mortalidad de los insectos, pues cuanto más pequeña era la cantidad de flagelados inoculada, menor mortalidad presentaron los triatómíneos.

D'Alessandro (1976), reportó pérdida de infectividad de *T. rangeli* en cepas mantenidas por inoculación intracelómica seriada de hemolinfa positiva. Tobie (1964), señaló que un mantenimiento cíclico de *T. rangeli* a través de *Rhodnius*-ratón-*Rhodnius*, condujo a un incremento en la infectividad de las glándulas salivares. Los presentes resultados, señalan que el mantenimiento cíclico de *T. rangeli* a través de cultivo-*Rhodnius*-ratón-cultivo-*Rhodnius*, mantiene la infectividad de las glándulas salivares probablemente por tiempo indefinido y los tripomastigotes metacíclicos aparecen invariablemente a partir del décimo primer día de postinoculación de los insectos, en contraste de un mantenimiento no cíclico, en el cual la aparición de los tripomastigotes metacíclicos se inicia varios días más tarde y estos finalmente pierden su infectividad, no obstante ser morfológicamente indiferenciables de aquellos con infectividad comprobada.

Recientemente, Marinkelle *et al.* (datos no publicados), utilizando varias lectinas, demostraron la presencia de glico-proteínas sobre la membrana de flagelados de *T. rangeli* provenientes de glándulas infectantes de *R. prolixus*; como estas glicoproteínas estaban ausentes de las formas de cultivo, intestinales y de hemolinfa, se propone la hipótesis de que probablemente constituyen una cubierta que protege a los tripomastigotes metacíclicos de la lisis mediada por la activación de la vía alterna del complemento o que estas glicoproteínas ejercen una protección contra los anticuerpos. El uso de lectinas con especificidad para ciertos carbohidratos, podría ser un procedimiento adecuado para demostrar que los tripomastigotes metacíclicos de *T. rangeli* carentes de infectividad para el huésped vertebrado, habrían perdido su cubierta glicoproteica protectora.

El mantenimiento cíclico aquí experimentado, presenta algunas ventajas frente a otros tipos de mantenimiento cíclico, pues puede completarse en un período no inferior a un mes, permitiendo así obtener rápidamente formas de cultivo, tripomastigotes metacíclicos, flagelados de hemolinfa, tripomastigotes sanguíneos y flagelados intestinales en *R. prolixus*; siendo estas formas de gran utilidad en estudios bioquímicos o inmunológicos.

RESUMEN

Se compararon dos sistemas de mantenimiento de *Trypanosoma rangeli* en el laborato-

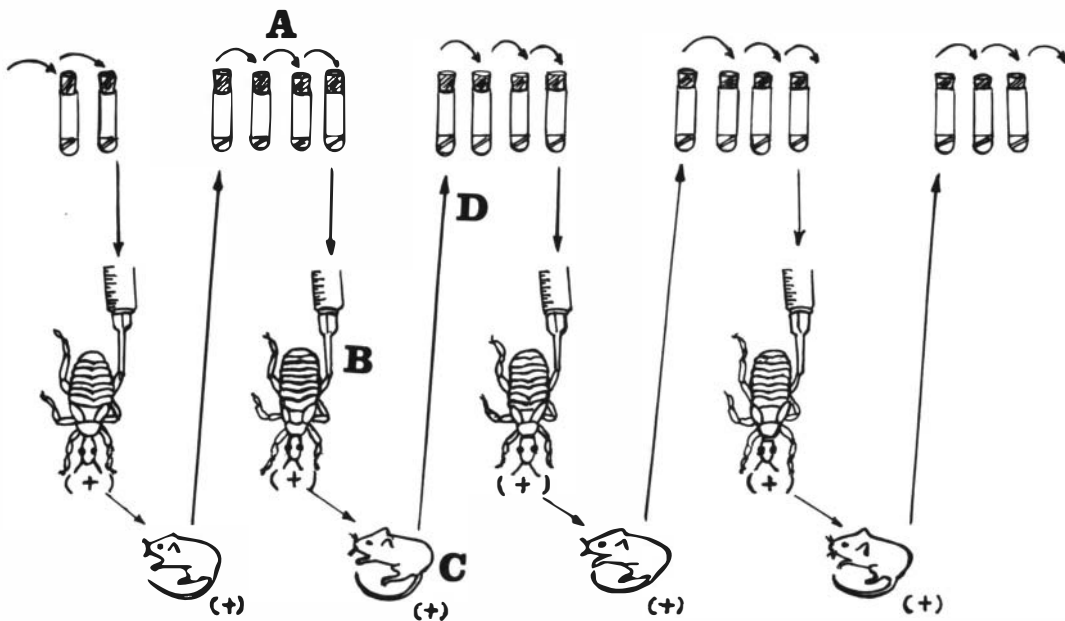


Fig. 4. Mantenimiento de *T. rangeli* (MÉTOD B): A. Repiques semanales de *T. rangeli* en medios de cultivo de Tobie. B. Inoculación intrafemoral de ninfas de *R. prolixus*. C. Inoculación intraperitoneal de ratones CFW con tripomastigotes metacíclicos. D. Inoculación de medios de Tobie con tripomastigotes sanguíneos.

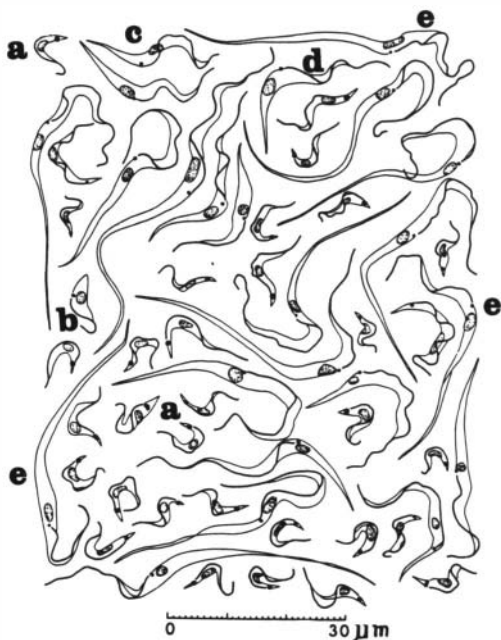


Fig. 5. Formas de desarrollo de *T. rangeli*, observadas en las glándulas salivares de *R. prolixus*, 11 a 30 días después de inoculados intrafemoralmente con formas de cultivo. a. tripomastigotes metacíclicos. b. forma transitoria entre epimastigote y tripomastigote. c. tripomastigote no metacíclico. d. epimastigote pequeño. e. epimastigote largo. Dibujos obtenidos con cámara lúcida.

rio. El mantenimiento por repiques semanales en medio de Tobie e inoculación intrafemoral de *Rhodnius prolixus* con flagelados de cultivo, dio por resultado que los tripomastigotes metacíclicos formados en las glándulas salivares, perdieron su infectividad para ratones después de diez meses de mantenimiento en cultivo. En contraste, un sistema de pasajes cíclicos seridos a través de cultivo-*Rhodnius*-ratón-cultivo-*Rhodnius*, mostró que los tripomastigotes metacíclicos, conservaron su infectividad para ratones, durante los tres años del experimento. El número y proporción de los tripomastigotes metacíclicos formados en las glándulas salivares de los *R. prolixus*, previamente inoculados intrafemoral o intracelómicamente con formas de cultivo de *T. rangeli*, no presentó correlación con la dosis inoculada; no obstante, la cantidad aplicada mostró relación directa con la tasa de mortalidad de los insectos. Los resultados indican que *T. rangeli* requiere un sistema de mantenimiento adecuado, para que en condiciones experimentales, conserve las características biológicas que normalmente expresa en condiciones naturales.

REFERENCIAS

- Coutinho, J.O., & V. Nussenzweig. 1952. Infecção experimental de triatomíneos pelo *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920. *Fol. Clin. Biol. (S. Paulo)* 18: 181-188.
- Cuba, C. A. 1975. Estudo de una cepa peruana de *Trypanosoma rangeli* IV Observações sobre la evolução e morfogênese na hemocele e nas glandulas salivares de *Rhodnius ecuadoriensis*. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* 17: 283-297.
- D'Alessandro, A. 1972. New experimental vectors of Colombian *Trypanosoma rangeli*. *J. Med. Ent.* 9: 187-195.
- D'Alessandro, A. 1976. Biology of *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli* Tejera, 1920. *In* Biology of the Kinetoplastida. v. 1, p. 327-493, eds. W. H. R. Lumsden, D. A. Evans, London, New York and San Francisco, Academic Press.
- Guhl, F. & C. J. Marinkelle. 1982. Antibodies against *Trypanosoma cruzi* in mice infected with *T. rangeli*. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 76: 361.
- Miles, M. A., J. R. Arias, S.A.S. Valente, R. D. Naiff, A.A. de Sousa, M.M. Puda, J.A.N. Lima & R. A. Cedillos. 1983. Vertebrate hosts and vectors of *Trypanosoma rangeli* in the Amazon basin of Brasil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 32: 1251-1259.
- Schottelius, J., 1982. Differentiation between *Trypanosoma cruzi* and *T. rangeli* by their different complement sensitivity. *Tropenmed. Parasit.* 33: 147-150.
- Schottelius, J. & V. Müller. 1984. Interspecific differentiation of *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma conorhini* and *Trypanosoma rangeli* by lectins in combination with complement lysis. *Acta Tropica* 41: 29-38.
- Tobie, E. J., 1964. Increased infectivity of a cyclically maintained strain of *Trypanosoma rangeli* to *Rhodnius prolixus* and mode of transmission by invertebrate host. *J. Parasitol.* 50: 593-598.
- Tobie, E. J., 1968. The relation of *Trypanosoma rangeli* to its vector. *In* Medicina Tropical (Ed. A. Anselmi), Talleres gráficos de Editorial Fournier, México, p. 291-305.
- Vallejo, G. A., 1984. Diferenciación entre las formas de desarrollo de *Trypanosoma cruzi* y las formas de desarrollo de *Trypanosoma rangeli* en el intestino del vector *Rhodnius prolixus*. Thesis M. Sc. Universidad de los Andes, Bogotá, Colombia. 335 pp.
- Zeledón, R. & E. Monge. 1966. Natural immunity of the bug, *Triatoma infestans* to the protozoan *Trypanosoma rangeli*. *J. Invertebr. Pathol.* 8: 420-423.