

## Plasmodium vinckei petteri: ALGUNOS ASPECTOS DE SU ESPOROGONIA Y ESQUIZOGONIA EXOERITROCITARIA.

Ana M. MONTALVO ALVAREZ(1), Irene LANDAU(2) & Doanh BACCAM(2)

### RESUMEN

Por medio de la infección experimental de *Anopheles stephensi*, a partir de ratones portadores de gametocitos de *Plasmodium vinckei petteri*, se realizó el estudio morfológico de la esporogonia, que comprende: la descripción del ooquineto, la evolución completa de los ooquistes y su transformación final en esporozoítos. Estos fueron empleados más tarde para infectar por vía intravenosa nuevos ratones, a los que se realizó biopsias sucesivas, para el estudio de los esquizontes exoeritrocíticos, cuya morfología no difiere de la de otras especies del grupo. Se determinó la duración mínima del ciclo hepático, que resultó ser de 61 horas. Estos datos, junto a otros que refieren las características del ciclo hemático, ayudan a completar la información que se tiene sobre la especie, que la hacen recomendable para su utilización como modelo experimental en el estudio de la malaria humana.

**KEYWORDS:** *Plasmodium vinckei petteri*; Esporogonia; Esquizogonia exoeritrocitaria; Ooquineto; Ooquiste; Esporozoítos; Esquizontes exoeritrocíticos.

### INTRODUCCION

*P. berghei* (VINCKE y LIPS, 1948), *P. vinckei* (RODHAIN, 1952), *P. chabaudi* (LANDAU, 1965) y *P. yoelii* (LANDAU y KILLICK-KENDRICK, 1966), constituyen las 4 especies de *Plasmodia* de roedores, descritas hasta el momento.

La caracterización de especies, subespecies y cepas de *Plasmodia*, ha sido posible no sólo en base a la descripción morfológica de los estadios sanguíneos, sino también por el conocimiento de otros factores relacionados con el ciclo de vida: el rango de maduración de los esquizontes exoeritrocíticos (EE), la temperatura óptima de obtención de esporozoítos infectantes y su longitud media en glándulas salivales, el diámetro de los ooquistes maduros<sup>1, 2, 7, 9, 10</sup>, así como las características genéticas<sup>4, 5</sup>, isoenzimáticas y antigénicas del protozoo en cuestión<sup>13, 14, 16</sup>.

Los conocimientos acumulados en relación a

lo anteriormente planteado, han posibilitado el empleo cada vez más amplio y diverso de estas especies en investigaciones concernientes a la malaria humana.

La acción combinada de drogas antipalúdicas en infecciones establecidas de *P. berghei* y *P. yoelii*, fue estudiada por HILL<sup>6</sup> en 1978, de otra parte, WISER & PLITT<sup>17</sup> reportaron similitud en las fosfoproteínas y la actividad de proteínas kinasas de *P. berghei*, *P. chabaudi* y *P. falciparum*, lo que justifica el empleo de la malaria de roedores en la investigación del potencial de dichas proteínas como blancos quimioterapéuticos.

*P. vinckei* es una especie sincrónica, cuyas formas sanguíneas maduras facilitan la diferenciación entre anillos y otros estadios, contrariamente a *P. yoelii* y *P. berghei* parasita exclusivamente hematíes maduros, lo que la aproxima a *P. falciparum* y es, por otra parte, sensible a la cloroquina.

(1) Laboratorio de Protozoología. Instituto Medicina Tropical "Pedro Kouri" Ministerio de la Salud Pública. Apdo. 601 Zona Postal Marianao 13. Habana, Cuba.  
(2) Laboratoire de Zoologie-Vers. Museo Nacional de História Natural. Paris, Francia.

Toda vez que la subespecie que nos ocupa es la menos conocida y utilizada, su transmisión por *Anopheles* no había sido hasta el momento obtenida en el laboratorio, ni la esquizogonia exoeritrocitaria descrita, decidimos emprender este estudio, con el objetivo de aportar nuevos datos que permitan su utilización como modelo biológico.

## MATERIALES Y METODOS

**Parásito:** *Plasmodium vinckei petteri* (CARTER y WALLIKER, 1975) cepa 279 BY.

La misma fue aislada en 1969, alimentando *Anopheles stephensi* a partir de *Thamnomys rutilans*, roedor salvaje de República Centroafricana, esplenectomizado. Dicha cepa fue mantenida hasta el momento de su utilización, através de pases cíclicos sobre A.s y ratones albinos suizos o por congelación en nitrógeno líquido.

**Vector experimental:** *Anopheles stephensi*, procedente de la India, mantenidos en el laboratorio de Zoologie-Vers del MNHN de París, según el método establecido por SHUTE & MARION en 1966<sup>15</sup>.

**Infección experimental de ratones:** Se utilizaron ratones albinos suizos, machos, con peso aproximado de 20 g. Las inoculaciones fueron realizadas a partir de sangre parasitada descongelada, una misma cantidad de ésta fue inoculada por vía intraperitoneal, inmediatamente después de la descongelación.

**Infección de *Anopheles*:** El ratón portador de gametocitos fue rasurado, inmovilizado en una rejilla y presentado a los mosquitos durante una hora. Pasado ese tiempo los mosquitos no alimentados fueron eliminados. El resto fue mantenido a una temperatura de 24-25°C.

**Inoculación de esporozoitos:** Después de la maduración de los ooquistes, los esporozoitos de *P. vinckei petteri* no invaden masivamente las glándulas salivares, como es el caso para la mayoría de otras especies de *Plasmodia* de roedores. Gran parte de estos esporozoitos permanece en el hemocele. Por tales razones, se efectuó un macerado total de mosquitos con RPMI más 10% de suero fetal de ternera. Después de una primera centrifugación, el sobrenadante fue de nuevo centrifugado a 300 g por

3 minutos e inoculado por vía intravenosa a varios ratones. Los esporozoitos, previa inoculación, fueron contados en una celda de Malassez.

**Estudio de la esporogonia:** Para ello, los mosquitos fueron disecados entre el quinto y décimo-cuarto día posteriores a la ingesta. La morfología y evolución de los ooquistes fue estudiada en preparaciones frescas de estómago, en solución salina 0,9%. Las glándulas salivares fueron examinadas de igual forma para estudiar los esporozoitos. Asimismo, se preparon láminas que fueron secadas al aire, fijadas en metanol y coloreadas con Giemsa, para realizar las mediciones de esporozoitos. Las medidas del diámetro de los ooquistes fueron tomadas con un micrómetro ocular y la longitud de los esporozoitos, con la ayuda de un curvímetro, posterior al dibujo en la cámara lúcida. Para establecer la media del diámetro de los ooquistes, fueron medidos entre 15 y 35 de éstos en cada caso.

**Estudio de la duración mínima del ciclo hepático:** Para conocer la hora de ruptura de los esquizontes exoeritrocíticos, se realizó la inoculación intravenosa de esporozoitos a los ratones. Se tomaron dos gotas de sangre de la cola a intervalos de 1 a 2 horas que fueron inoculados a nuevos ratones. Esto fue realizado entre las 55 y 62 horas posteriores a la infección inicial, tomando en cuenta lo ocurrido para otras especies. La hora de inoculación de los primeros ratones que aparecieron positivos, indicó la ruptura de los primeros esquizontes en el ratón donante.

**Estudio de la esquizogonia propiamente dicha:** Se efectuaron autopsias de ratones que habían recibido esporozoitos entre las 57 y 62 horas posteriores a la inoculación de los mismos. Las piezas histológicas fueron fijadas en solución de Carnoy 4 horas, incluidas en parafina y los cortes, de 5 µm de espesor, coloreados según la técnica de Giemsa-colofano. Las medidas de los esquizontes exoeritrocíticos fueron tomadas con un micrometro ocular.

## RESULTADOS

### Esporogonia

**Ooquineto:** El ooquineto, observado en el contenido estomacal de un mosquito 24 horas posteriores a la ingesta, midió 16 µm de largo por 2 µm de ancho. El núcleo, de gran talla, ocupa todo el grosor

del parásito y se sitúa en la unión de los tercios medio y posterior. El pigmento está reunido en un amasijo de gránulos oscuros a nivel del tercio anterior.

**Evolución de ooquistes:** (Fig. 1). La velocidad de desarrollo de los ooquistes, es variable. Diferentes estados coexisten en el mismo mosquito. El primero estudiado (Fig. 1a) mide  $x = 19 \pm 3,2 \mu\text{m}$  de media, tiene un doble contorno, contiene un pigmento dispersado y gránulos amarillos y brillantes relativamente groseros. El estadio siguiente (Fig. 1b) mide  $x = 26 \pm 5,2 \mu\text{m}$  el pigmento deviene más fino y ocupa aún una amplia superficie central, el citoplasma parece homogéneo.

A continuación (Fig. 1c) el pigmento se agrupa y forma líneas convergentes de longitud variable, la talla aumenta a  $x = 32 \pm 4,8 \mu\text{m}$ . La longitud del ooquiste continúa aumentando (Fig. 1d), el doble contorno es aún visible, el pigmento, mucho más fino, es menos visible y se limita a un pequeño grupo de gránulos finos. La talla está próxima a aquella de las formas maduras que describimos a continuación: La maduración se produce por el brote de esporozoitos en la periferia de varios cuerpos residuales (Fig. 1e), se trata de un ooquiste multilocular. Cuando alcanzan los  $45 \pm 8,5 \mu\text{m}$  de media (Fig. 1f), forman una esfera llena de esporozoitos dispuestos en haces entrecruzados, se distinguen aún los cuerpos residuales libres en el ooquiste y el pigmento ya no es visible.

Después de la ruptura de todos los ooquistes maduros, se observan formas inmaduras en vías de degeneración y a veces de melanización.

### Esporozoitos:

Los primeros esporozoitos aparecen en las glándulas salivares, donde no son muy numerosos, tardíamente (décimoquinto día). Sin embargo, muchos son encontrados en el hemocele hasta las últimas observaciones, a los 17 días posteriores a la infección de los mosquitos.

La talla media de 40 esporozoitos medidos en fresco en el hemocele, alrededor del estómago, es de  $x = 14 \pm 1,7 \mu\text{m}$  y en preparaciones de glándulas salivares, es de  $x = 13,2 \pm 2,2 \mu\text{m}$ .

### Esquizogonia exoeritrocitaria:

La duración del período prepatente, determinado por subinoculaciones de sangre a nuevos ratones es de 61 horas.

Los esquizontes tienen forma ovalada y su aspecto morfológico es comparable al de otros *Plasmodia* de roedores. A las 57 horas observamos 2 esquizontes inmaduros (Fig. 2a,b), cuya medida es de  $36 \pm 6,5 \times 31 \pm 4,4 \mu\text{m}$ . A las 61 horas, la talla media de 30 esquizontes maduros fue de  $40 \pm 7,6 \times 30 \pm 6,8 \mu\text{m}$  (Fig. 2 c,d).

### DISCUSION

La morfología de las formas sanguíneas de subespecies de *P. vinckei* no permite diferenciarlas entre ellas. Sin embargo, el estudio morfológico y biológico de otros estadios del ciclo,

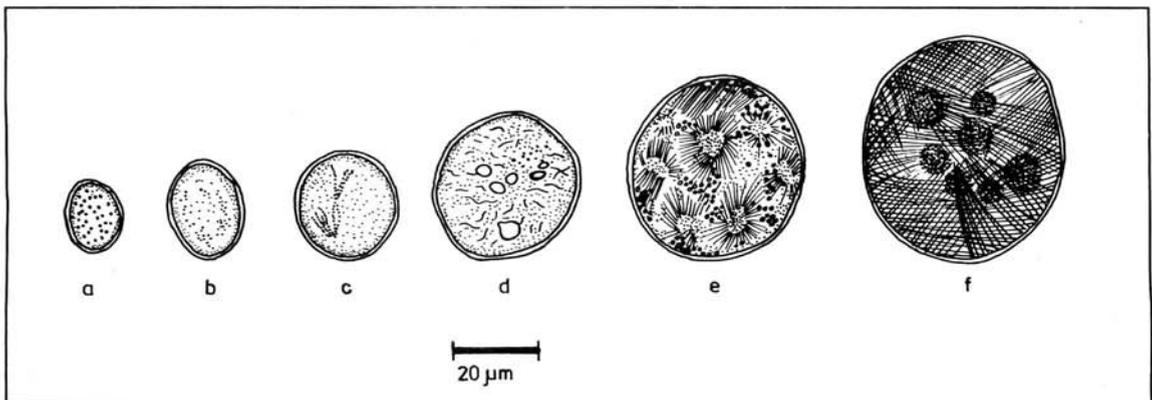


Fig. 1 (a-f)  
abc. Formas observadas el 5to. día posterior a la ingesta de los mosquitos.  
cde. Formas observadas al 9no. día post a la ingesta.  
def. Formas observadas al 14to. día post a la ingesta.

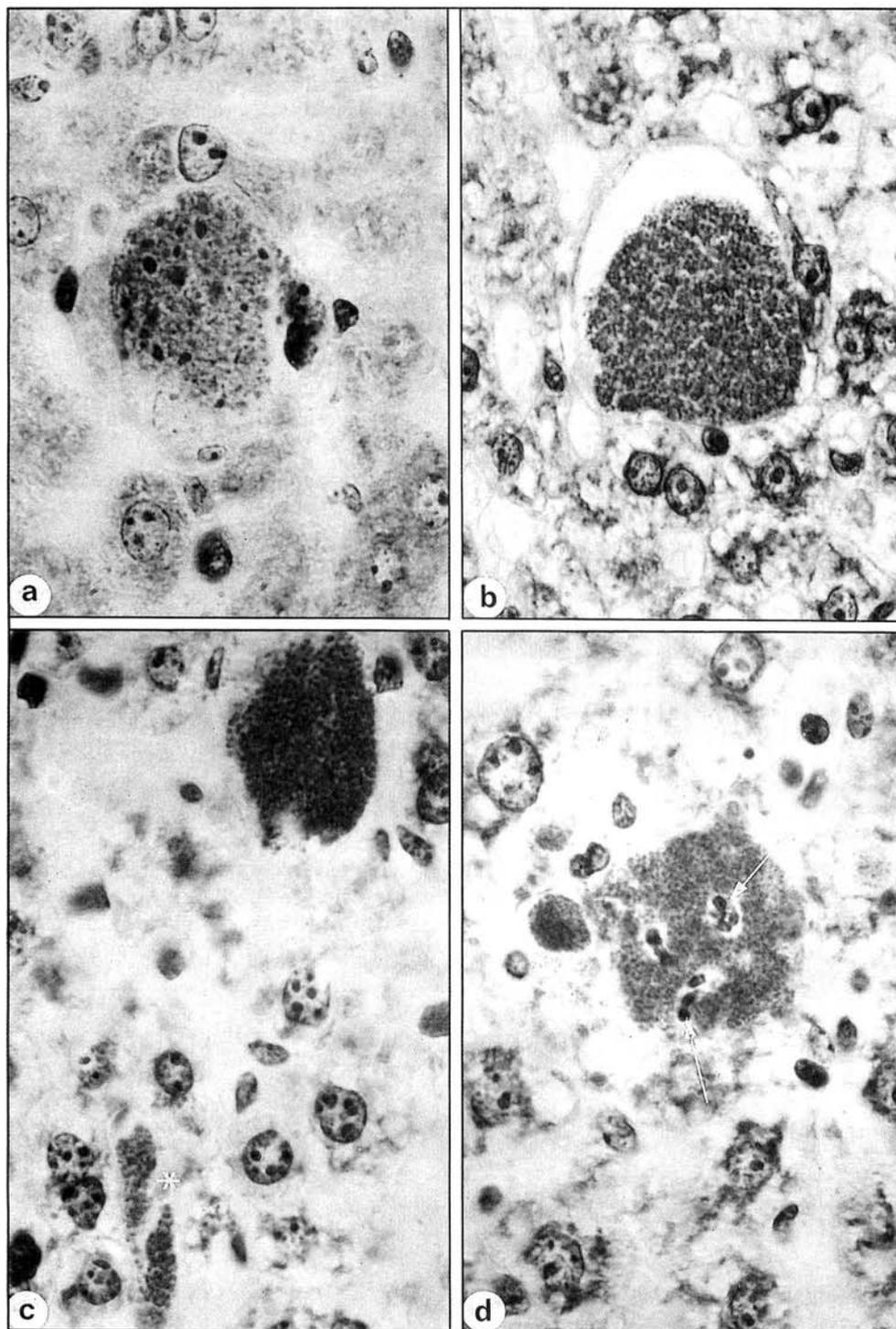


Fig. 2 (a.d)

Fig. 2a. Esquizonte hepático de 57 h. inmaduro.

Fig. 2b. Esquizonte hepático de 61 horas, aún inmaduro.

Fig. 2c. Esquizonte hepático maduro y roto, con merozoitos en capilares vecinos 61 horas.

Fig. 2d. Esquizonte hepático maduro, de 61 horas, atacado por macrófagos.

revela variaciones entre cepas vicariantes, que el análisis iso-enzimológico de los estadios sanguíneos, comprendidos los de nuestra especie de estudio, así confirma<sup>1,2,3</sup>.

Nuestro trabajo pretende aportar conocimientos sobre una subespecie del grupo, aún poco conocida y cuyas características la hacen favorable para su utilización con fines investigativos, tal como ocurre con otras especies de *Plasmodia* de roedores, ampliamente utilizados como modelos experimentales.

En cuanto a la talla de los ooquistes maduros, podemos señalar que en *P.v.p.* ésta es comparable a la de *P.v. lentum* (44  $\mu\text{m}$ ) (11) y más pequeña que en *P.v. brucechwatti* (54  $\mu\text{m}$ ) (8).

Las diferencias de talla entre nuestras medidas de esporozoitos y las reportadas por CARTER & WALLIKER en 1975 para la misma especie, (16,23  $\mu\text{m}$ )<sup>3</sup>, pudieran explicarse por el hecho de que estos autores midieron esporozoitos obtenidos de ooquistes destruídos mecánicamente y posiblemente, aún inmaduros. Por otra parte, *P.v. lentum* tiene esporozoitos mucho más largos (21  $\mu\text{m}$ ) que las otras subespecies del grupo.

La talla de los esquizontes hepáticos maduros de *P.v.p.* es también comparable a la de *P.v. lentum* (37  $\mu\text{m}$ ). Sin embargo, es más pequeña que la de *P.v. brucechwatti* (43  $\mu\text{m}$ ).

Señalamos por otra parte, que contrariamente a otras subespecies, la mayoría de los esporozoitos infectantes de *P.v. petteri* en *Anopheles stephensi* permanece en el homocelo y no alcanza las glándulas salivares, lo que pudiera indicar que quizás este no sea el vector idóneo para esta subespecie.

Finalmente significamos, que la duración de la maduración del parásito de estudio en el hígado (61 horas) en ratones albinos suizos, es idéntica a la de *P.v. vinckei* y *P.v. brucechwatti* y más corta que en *P.v. lentum* (más de 65 horas).

La información acumulada en relación a las diferentes variables morfológicas de esta subespecie, los resultados a que arribamos en este trabajo y otros recientemente realizados en nuestro laboratorio en que mostramos su utilización en estudios experimentales del ritmo circadiano<sup>12</sup>, nos permiten concluir que *P. vinckei petteri*, parece

ser un modelo experimental satisfactorio para el estudio de la malaria humana.

## SUMMARY

***Plasmodium vinckei petteri***: some aspects of its sporogony and exoerythrocytic schizogony.

A study of *Plasmodium vinckei petteri* sporogony was performed by experimental infection of *Anopheles stephensi* with gametocytes from infected mice. The study includes the description of the ookinete, complete evolution of oocysts and their final transformation to sporozoites. These were later used for intravenous infection of new mice, in order to study the exoerythrocytic schizogony. The morphology of exoerythrocytic schizonts was similar to that of other species of the same group. The minimal duration of the hepatic cycle was found to be of 61 hours. These data, along with other related to the hematic cycle characteristics, help to complete the information on the species, which can be recommended as a model for the study of human malaria.

## REFERENCIAS

1. BAFORT, J. - Étude du cycle biologique du *Plasmodium vinckei vinckei* Rodhain, 1952. *Ann. Soc. belge Med. trop.*, 49: 553-628, 1969.
2. BAFORT, J. - Le cycle biologique du *Plasmodium vinckei* de Nigeria. In: *Multicolloque Europeen de Parasitologie*, ler., Rennes, 1971. *Compte Rendu*. p. 235-237.
3. CARTER, R. & WALLIKER, D. - New observations on the malaria parasites of rodents of the Central African Republic. *Plasmodium vinckei petteri* subsp. nov. and *Plasmodium chabaudi* Landau, 1965. *Ann. trop. Med. Parasit.*, 69:187-196, 1975.
4. COPPEL, R.L.; SAINT, R.B.; STAHL, H.D.; LANGFORD, C.J.; BROWN, G.V.; ANDERS, R.F. & KEMP, D.J. - *Plasmodium falciparum*: Differentiation of isolates with DNA Hybridization using antigen gene probes. *Exp. Parasit.*, 60:82-89, 1985.
5. FUCHAROEN, S.; TIRAWANCHAI, N.; WILAIRAT, P.; PANYIM, S. & THAITHONG, S. - Differentiation of *Plasmodium falciparum* clones by means of a repetitive DNA probe. *Trans. roy. Soc. trop. Med. Hyg.*, 82:209-211, 1988.
6. HILL, J. - The activity of drug combination against established infections of rodents malaria. *Parasitology*, 95:17-23, 1987.

7. KILLICK-KENDRICK, R.-Parasitic protozoa in the blood of rodents. I. The life-cycle and zoo-geography of *Plasmodium berghei nigeriensis* subsp. nov. *Ann. trop. Med. Parasit.*, 67:261-277, 1973.
8. KILLICK-KENDRICK, R. - Parasitic protozoa of the blood of rodents. V. *Plasmodium vinckei brucechwatti* subsp. nov. A malaria parasite the ticket rat, *Thamnomys rutilans*, in Nigeria. *Ann. Parasit. hum. comp.*, 50:251-264, 1975.
9. LANDAU, I. -Description de *Plasmodium chabaudi* n. sp., parasite de rongeurs africain. *C.R. Acad. Sci. (Paris)*, 260:3758-3761, 1980.
10. LANDAU, I. & CHABAUD, A.G. - Nouvelles donnees sur le cycle nyctheméral des Plasmodium. *C.R. Acad. Sci. (Paris)*, 291 (Ser.D):985-988, 1980.
11. LANDAU, I.; MICHEL, J.C.; ADAM, J.P. & BOULARD, Y. - The life cycle of *Plasmodium vinckei lentum* subsp nov. in the laboratory; comments on the nomenclature of the murine malaria parasites. *Ann. trop. Med. Parasit.*, 64:315-323, 1970.
12. MONTALVO ALVAREZ, A.M.; LANDAU, I.; BACCAM, D.; Chabaud, A.G. & Gingsburg, H. - Experimental modifications of the circadian rythm of *Plasmodium vinckei petteri* following cryopreservation; probable resistance of the merozoite to thawing. *C.R. Acad. Sci. (Paris)*, S.III, 307:5-10, 1988.
13. OO, M. - Isoenzyme variation in schizonts of *Plasmodium vivax* from Burma. *Trans. roy Soc. trop. Med. Hyg.*, 8:1-4, 1986.
14. SANDERSON, A.; WALLIKER, D. & MOLEZ, J.F. - Enzyme typing of *Plasmodium falciparum* from African and some other Old World countries. *Trans. roy Soc. trop. med. Hyg.* 75:263-267, 1981.
15. SHUTE, P.G. & MARYON, M. - *Laboratory techniques for the study of malaria*. London, J. and A. Churchill, 1966.
16. WALLIKER, D. - Characterization of *Plasmodium falciparum* of differents countries. *Ann Soc. belge. Med. trop.*, 65:69-75, 1985.
17. WISSR, M.F. & PLITT, B. - *Plasmodium berghei*, *Plasmodium chabaudi* and *Plasmodium falciparum*: Similarities in phosphoproteins and protein kinase activities and their stage specific expression. *Exp. Parasit.*, 64: 328-335, 1987.

Recebido para publicação em 20/12/1989.  
Aceito para publicação em 30/4/1991.