

ESTUDIOS SOBRE *TRYPANOSOMA RANGELI* TEJERA, 1920. VIII. RESPUESTA A LAS REINFECCIONES EN DOS MAMIFEROS

N. AÑEZ, J. VELANDIA & A.M. RODRIGUEZ

Bajo condiciones experimentales se estudia el curso de la infección primaria y la respuesta a las reinfecciones por Trypanosoma rangeli en ratones albinos y Didelphis marsupialis.

Durante el curso de la infección primaria en ratones, se observa una parasitemia relativamente baja y de corta duración. Los mismos muestran durante la primera reinfección una parasitemia escasa de cuatro días de duración, siendo resistentes a las sucesivas reinfecciones con T. rangeli.

Los ejemplares de D. marsupialis exhiben una parasitemia de más larga duración, pero con un nivel de parásitos sanguíneos mucho menor que el detectado en el modelo ratón, siendo la respuesta a las reinfecciones similar a la observada en ratones.

Se detectan anticuerpos hemaglutinantes en los sueros inmunes de ratones y Didelphis marsupialis, sometidos a la reinfección por T. rangeli.

Se especula sobre la posible acción sinérgica de una respuesta inmune en el sitio de deposición en contra de las formas metacíclicas de T. rangeli y la acción de anticuerpos circulantes en contra de las formas sanguíneas, para explicar la resistencia de ambos modelos a las reinfecciones por T. rangeli.

En el hospedador mamífero, el ciclo vital de *Trypanosoma rangeli* tiene su inicio cuando triatominos infectados en las glándulas salivares depositan, mediante la picadura, las formas metacíclicas infectivas directamente en los capilares (Tobie, 1961; D'Alessandro, 1968) o en la dermis de los animales expuestos, para migrar posteriormente al torrente circulatorio (Añez, 1981 a). Una vez en la sangre, los parásitos experimentan durante los primeros tres días de la infección un crecimiento progresivo en su longitud total, observándose la transformación de las formas metacíclicas a los típicos tripomastigotes sanguíneos, detectados durante el período patente de la infección (Añez, 1981 a).

El curso de la infección por *T. rangeli* en el vertebrado, se caracteriza por presentar parasitemias generalmente bajas y un período patente relativamente corto, sin que los parásitos se multipliquen en la sangre o otros tejidos (Grewal, 1956; Herbig-Sandreuter, 1957; D'Alessandro, 1976; Añez, 1981 a).

En relación a la respuesta del hospedador mamífero a las reinfecciones por *T. rangeli*, D'Alessandro (1976) afirma que cuando la infección primaria deja de ser patente, el animal se muestra aparentemente resistente a la reinfección con el mismo parásito. Pruebas preliminares realizadas por Añez (1981 b) en ratones, apoyan esa afirmación.

El presente artículo da cuenta de un estudio sobre el curso de la infección por *T. rangeli*, la respuesta a las reinfecciones y la evolución de anticuerpos hemaglutinantes anti-*T. rangeli*, utilizando un modelo experimental (*Mus musculus*) y un posible reservorio silvestre (*Didelphis marsupialis*).

MATERIAL Y METODOS

Animales experimentales: se utilizó el aislado Perro/78 de *T. rangeli* (Añez, 1981 a).

Los triatominos utilizados fueron ninfas de IV, V estadios y adultos de *Rhodnius prolixus* sanos, e infectados con *T. rangeli* en las glándulas salivares, mantenidos en un incubador a 25°C y 75% de humedad relativa.

Se trabajó con un lote de veinte ratones albinos machos, de 30 días de edad y 20 g de peso, mantenidos a 25°C y alimentados con concentrado y agua.

Se utilizaron dos ejemplares de *Didelphis marsupialis* hembras, de 8 y 12 meses de edad y de 2 kg de peso, criados en el laboratorio y provenientes de madres sanas capturadas en una zona no-endémica. Los mismos fueron mantenidos en un bioterio a 25°C y alimentados con frutas, carne y agua.

Técnicas y procedimientos: la infección por *T. rangeli* en las glándulas salivares de cada ejemplar de *R. prolixus* utilizado, se detectó mediante la técnica de salivación sobre porta-objetos de vidrio (Añez, 1980).

Previo a la infección de los ratones y *D. marsupialis*, se tomaron muestras de suero, en cada uno de los animales, como controles negativos en la detección de anticuerpos anti-*T. rangeli*.

Las infecciones fueron obtenidas exponiendo cada animal a la picadura de ejemplares de *R. prolixus*, a los cuales se les detectó previamente la infección por *T. rangeli* en las glándulas salivares: cada ratón fue picado por cinco ninfas y cada ejemplar de *D. marsupialis* por diez ninfas de V estadio.

La parasitemia fue estimada diariamente y por duplicado en muestras de sangre de la cola, hasta la desaparición de los parásitos circulantes, por el método de Pizzi (1957) modificado por Brener (1961).

Para la obtención de sueros, los ratones fueron sangrados por punción del plexo retro-orbital (Lumsden, Herbert & McNeillage, 1973) en los días 3, 5, 7, 15 y 20 de la infección (40 μ l por animal) y los ejemplares de *D. marsupialis* por cardiopuntura los días 15, 30 y 60 de la infección patente (2 ml de sangre en cada oportunidad).

Después de la desaparición de los parásitos de la circulación sanguínea se realizaron xenodiagnósticos con cinco ninfas de IV estadio de *R. prolixus* por animal y se sembró sangre en tubos de cultivo NNN con medio 199 (Flow Laboratories) como fase líquida.

Superada la primo-infección los animales fueron sometidos a tres reinfecciones sucesivas, con el mismo aislado y método descrito para la infección inicial. Se examinó la sangre diariamente durante 10 días, seguidos de xenodiagnóstico y hemocultivo en dos oportunidades para cada animal después de cada reinfección y se obtuvo sangre para la serología de los ratones en los días 3 y 5, y para la de *D. marsupialis* el día 5.

Para evaluar la respuesta humoral se utilizó la técnica de hemaglutinación indirecta en micrométodo (Kagan & Norman, 1970), usando como antígeno epimastigotes de *T. rangeli* en concentración final de 120 mg (peso seco)/ml de PBS, obtenidos de cultivo con 15 días de evolución.

RESULTADOS

Curso de la infección por *T. rangeli* en ratones albinos: observaciones diarias realizadas en un lote de veinte ratones expuestos a la picadura de ejemplares de *R. prolixus* infectados con *T. rangeli*, permitió seguir con bastante precisión el curso de la infección.

Los niveles de parasitemias estimados, revelaron una marcada tendencia a incrementar a partir de las 24 horas después de la picadura infectante, alcanzando su nivel máximo al 4to día post-infección. Entre el 4to y 8vo días la parasitemia se mantuvo fluctuando alrededor de su valor máximo, para comenzar a decrecer progresivamente a partir del 9no día de la infección, desapareciendo los parásitos de la circulación a los 16 días de la picadura infectante. Durante los 15 días siguientes, se intentó la detección de infecciones sub-patentes de *T. rangeli* utilizando los métodos de xenodiagnóstico y hemocultivo, con resultados negativos.

La Fig. 1 muestra los valores estimados de parasitemia promedio durante el curso de la infección por *T. rangeli* en ratones albinos.

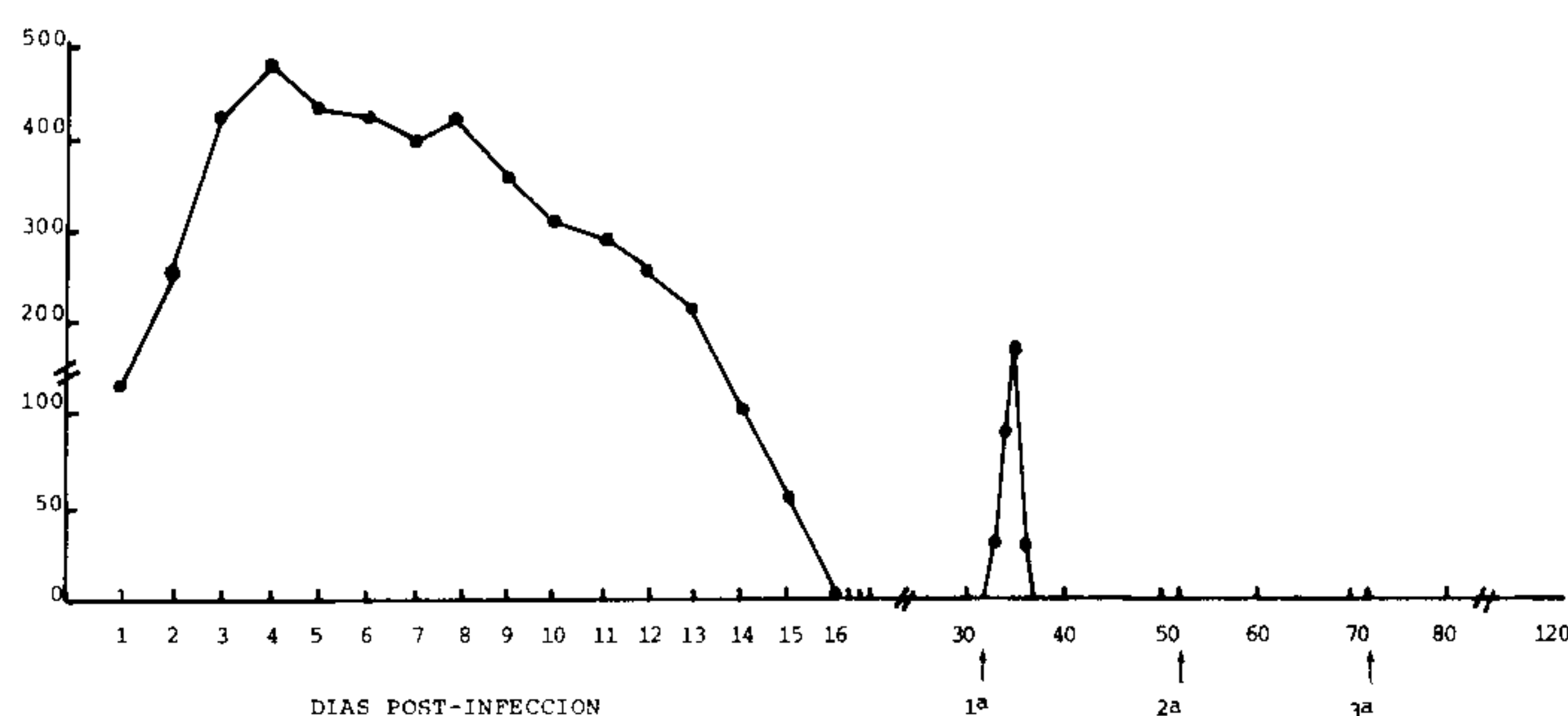


Fig. 1: curso de la infección y respuesta a las reinfecciones por *Trypanosoma rangeli* en ratones albinos. Las flechas indican los días en los cuales se hicieron las reinfecciones.

Curso de la infección por *T. rangeli* en *Didelphis marsupialis*: seguimientos diarios de los niveles de parasitemias llevados a cabo durante 52 días en dos ejemplares de *D. marsupialis* infectados con *T. rangeli*, revelaron que la misma exhibió un incremento entre el 1ro y el 3er día, cuando alcanzó su máximo nivel. En el período comprendido entre el 4to y el 9no día de la infección, la parasitemia fluctó alrededor de valores algo menores que el nivel máximo alcanzado al 3er día. A partir del 9no día el número de parásitos en sangre decreció considerablemente, observándose una diferencia del 60% entre el valor máximo alcanzado al 3er día y el estimado al 14to día. Entre el día 20 y el 30 de la infección, la parasitemia fue decreciendo progresivamente hasta alcanzar valores de 63 trip/mm³, los cuales se mantuvieron hasta el día 51 de la infección, desapareciendo los parásitos de la sangre circulante, en ambos ejemplares, a partir del día 52 de la picadura infectante.

Tanto el uso del xenodiagnóstico como el hemocultivo resultaron infructuosos en la búsqueda de infecciones sub-patentes, durante los 15 días subsiguientes a la desaparición de los parásitos de la circulación.

La Fig. 2 detalla el curso de la parasitemia promedio en los dos ejemplares de *D. marsupialis* infectados con *T. rangeli*.

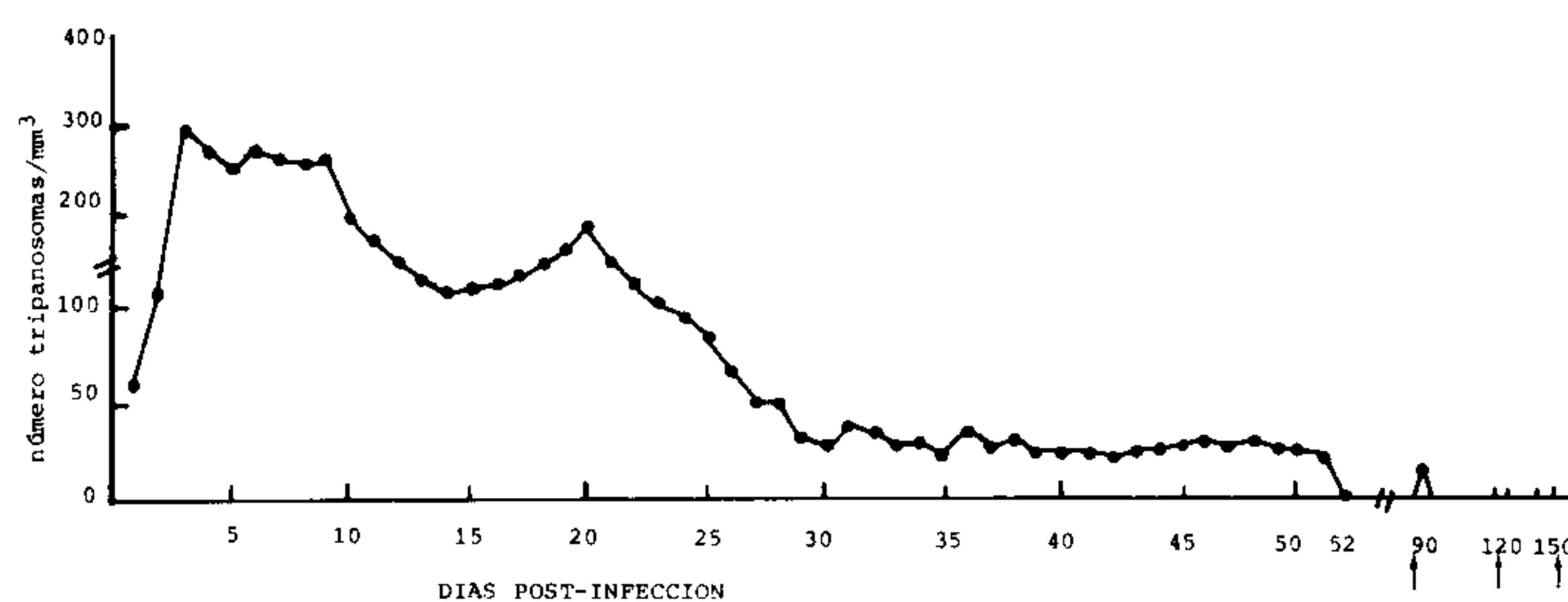


Fig. 2: curso de la infección y respuesta a las reinfecciones por *Trypanosoma rangeli* en *Didelphis marsupialis*. Las flechas indican los días en los cuales se hicieron las reinfecciones.

Respuesta a las reinfecciones por *T. rangeli* en ratones albinos: ratones que habían superado la infección inicial por *T. rangeli*, fueron expuestos a tres sucesivas reinfecciones con el mismo parásito a los 32, 52 y 72 días de la primera exposición.

La parasitemia observada durante la primera reinfección, reveló un escaso número de parásitos, con un valor máximo de 180 trip/mm³ detectado al 3er día. A partir de esta fecha, el número de parásitos decreció bruscamente, para desaparecer de la circulación al 5to día de la reinfección, lo que indica una patencia de la parasitemia de tan sólo cuatro días. En las dos reinfecciones subsiguientes, no se detectaron parasitemias patentes ni sub-patentes en los animales examinados.

En la Fig. 1 se compara la parasitemia correspondiente a la primo-infección, con las observadas durante las tres reinfecciones.

Respuesta a las reinfecciones por *T. rangeli* en *D. marsupialis*: los ejemplares de *D. marsupialis* fueron sometidos a tres reinfecciones con *T. rangeli* a los 40, 70 y 100 días después de haber superado la infección inicial.

La presencia de parásitos en sangre sólo fue detectada un día después de la primera reinfección, siendo la misma sumamente baja en relación a las parasitemias observadas durante el curso de la primo-infección.

Después de la segunda y tercera reinfecciones no se detectó parasitemia alguna en los dos ejemplares utilizados.

El curso de la primo-infección en comparación con la de las reinfecciones se muestran en la Fig. 2.

Evolución de anticuerpos hemaglutinantes anti-*T. rangeli*: en los sueros de los ratones no se detectaron títulos de anticuerpos hemaglutinantes en las muestras tomadas a los 3, 5, 8, 15 y 20 días de la infección inicial. Sin embargo, sueros obtenidos al 3er día de la primera reinfección mostraron un título débil de anticuerpos anti-*T. rangeli* (1:4), el cual se incrementó ligeramente hasta 1:8 al 5to día de la reinfección. A partir de esa fecha no se logró detectar título alguno, así como tampoco durante los días que siguieron a la 2da y 3ra reinfecciones.

En los sueros de los ejemplares de *D. marsupialis*, se observó un ligero, pero constante incremento de los títulos de anticuerpos anti-*T. rangeli*, tanto durante la primo-infección, como en las tres reinfecciones sucesivas. En el curso de la infección inicial se observaron títulos de 1:4, 1:4 y de 1:8, de las muestras tomadas a los 15, 30 y 60 días respectivamente. Las muestras tomadas durante el período correspondiente a la 1ra reinfección, revelaron títulos de 1:8 para un ejemplar y de 1:32 para el otro. A partir de la 2da reinfección y hasta la 3ra, se observaron títulos de 1:128 para ambos ejemplares.

DISCUSION

Añez (1981a) trabajando con ratones de diferentes edades infectados con un aislado fresco de *T. rangeli*, observó que la parasitemia sufría un incremento progresivo a partir de las 6 horas, alcanzando un nivel máximo al 4to día post-infección, manteniéndose niveles bajos de parásitos circulantes por un lapso de 15 a 20 días, al cabo de los cuales las formas sanguícolas desaparecían completamente de la circulación. El mismo autor afirma que el nivel máximo de parasitemia alcanzado al 4to día, es el resultado de la migración progresiva de los parásitos desde el sitio de deposición, en las capas de la piel, hasta el torrente sanguíneo.

En nuestro estudio, las parasitemias estimadas en ratones albinos demuestran que el nivel de parásitos sanguícolas incrementa acentuadamente hasta el 4to día después de la picadura infectante, manteniéndose alrededor de estos valores hasta el día 9, cuando comienza un descenso paulatino del número de parásitos por volumen de sangre. La parasitemia desaparece totalmente entre los 15 y 17 días post-infección, corroborándose así las observaciones de Añez (1981a).

En relación al curso de la infección por *T. rangeli* en animales silvestres, considerados como posibles reservorios de este parásito en la naturaleza, Añez (1981a) observó que en un ejemplar de *Didelphis*

albiventris, infectado subcutáneamente con metacíclicos obtenidos de las glándulas salivares de *R. prolixus*, la parasitemia detectada a partir de las 48 horas de la infección, se mantuvo por un mayor período y a niveles mucho más bajos que el observado en ratones.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo, utilizando el modelo *T. rangeli*-*D. marsupialis* concuerdan con los de Añez (1981a), observándose positividad en el vertebrado hasta los 52 días de la infección, cuando ocurrió la desaparición total de los parásitos de la sangre circulante, hecho demostrado por la aplicación de métodos para la detección de posibles parasitemias sub-patentes.

En lo que se refiere a la respuesta a las reinfecciones por *T. rangeli*, la detección de una baja parasitemia de apenas 4 días de duración en ratones y de 1 día en *D. marsupialis*, después de la primera reinfección y los resultados negativos obtenidos en las dos reinfecciones sucesivas, sugieren la acción de una respuesta inmune local, capaz de controlar los parásitos depositados por el vector en el sitio de la picadura. Este hecho determinaría que sólo las formas metacíclicas que logren escapar de la acción de las células defensivas, puedan migrar al torrente sanguíneo, aprovechando su movilidad y las cercanías a los vasos capilares en el sitio de deposición.

Por otra parte, es posible que las formas del parásito que logran alcanzar la sangre circulante, después de los 3 días de la picadura infectante sean reconocidas y eliminadas totalmente de la circulación, como consecuencia del establecimiento de una respuesta inmune protectora probablemente de tipo humoral, inducida y desarrollada durante la infección por *T. rangeli*.

Lo anteriormente expuesto, permitiría sugerir que en nuestros modelos experimentales la razón de la escasa parasitemia detectada después de la primera reinfección y la negatividad observada en sucesivas reinfecciones, podría ser interpretada como el resultado de la acción sinérgica de una respuesta en el sitio de deposición en contra de las formas metacíclicas de *T. rangeli* depositadas por el vector infectado y la posible acción de anticuerpos contra las formas sanguícolas del mismo parásito.

Este argumento se ve reforzado por las afirmaciones de Añez (1981a), quien sostiene que las formas infectivas de *T. rangeli* una vez que invaden el torrente sanguíneo, sufren un continuo crecimiento hasta las 72 horas post-infección, cuando los tripomastigotes sanguícolas alcanzan su tamaño definitivo.

Pareciera que durante el período de crecimiento de estos flagelados en la sangre, hubiera también una transformación en su constitución antigénica de superficie, que les permite, aparentemente, evadir la respuesta inmune humoral durante un corto período de tiempo y una vez que aparecen los tripomastigotes sanguícolas típicos, en contra de los cuales se ha formado la respuesta específica, éstos son inmediatamente destruidos.

SUMMARY

Under experimental conditions, the course of the infection and the response to the reinfection by *Trypanosoma rangeli* in mice and *Didelphis marsupialis*, are studied.

During the initial infection the mice show a relatively low parasitaemia and a short patent period. A scanty parasitaemia level of four days length, was observed following the first reinfection, being the mice resistant to new reinfections by *T. rangeli*.

In opossums a lower parasitaemia and a longer patent period than that detected in mice, were observed during the initial infection. The response to reinfections in this mammal, was similar to that observed in mice.

After reinfection with *T. rangeli*, haemagglutinant antibodies in immune-sera of both mice and opossums, were detected.

The possible immune-response at the site of deposition against the metacyclic-forms of *T. rangeli*, and the action of circulating antibodies against the blood forms of the parasite, are speculated to explain the resistance of mice and opossums to the reinfection by *T. rangeli*.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Dr. A. Valderrama por facilitar los triatominos utilizados, a la Dra. Morelia Pérez por sus sugerencias, a los Sres. A. Rojas y S. Díaz por su ayuda técnica y la Srta. Irlanda Márquez por su trabajo mecanográfico.

REFERENCIAS

- AÑEZ, N., 1980. Detection of *Trypanosoma rangeli* by salivation of infected *Rhodnius prolixus* on glass slide. *Ann. Trop. Med. & Parasitol.*, 74 (5) :561-562.
- AÑEZ, N., 1981a. Studies on *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920. I. Deposition, migration and growth of *T. rangeli* in two mammals. In: *Parasitological Topics Sp. Publi. No. 1* :19-25. *Soc. Protozool. Allen Press. Kansas.*
- AÑEZ, N., 1981b. Trypanosomatidae of Venezuela with special reference to *Trypanosoma rangeli* and *Leishmania garhami*. Ph.D. Thesis. University of London.
- BRENER, Z., 1961. Contribuição ao estudo da terapêutica experimental da doença de Chagas. Thesis Fac. Farmacia. Univ. Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil.

- D'ALESSANDRO, A., 1968. *T. rangeli*. Abstracts and reviews of the 8th International Congress on Tropical Medicine and Malaria. 362-3.
- D'ALESSANDRO, A., 1976. Biology of *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli* Tejera, 1920. In: Lumsden W.H.R., Evans D.A., ed., *Biology of the Kinetoplastida*. Academic Press, London, New York, 1, 328-93.
- GREWAL, M.S., 1956. Studies on the "occult" trypanosomes. Ph.D. Thesis. University of London.
- HERBIG-SANDREUTER, A., 1957. Further studies on *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920. *Acta Tropica*, 14 :193-207.
- KAGAN, I.G. & NORMAN, L., 1970. Serodiagnosis of parasitic diseases. In: *Manual of Clinical Microbiology*. pp. 453-486. Bethesda. Academic Press.
- LUMSDEN, W.H.R.; HERBERT, W.J. & McNEILLAGE, G.J.C., 1973. Techniques with Trypanosomes. Ed. Churchill Livingstone Edinburgh. London.
- PIZZI, T., 1957. La inmunología de la Enfermedad de Chagas. *Tesis. Univ. Chile. Santiago*.
- TOBIE, E.J., 1961. Experimental transmission and biological comparison of strains of *Trypanosoma rangeli*. *Exp. Parasit.*, 11 :1-9.