

ARTÍCULO ORIGINAL

***Variaciones biológicas de Trypanosoma cruzi (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) asociadas con la ingestión de diferentes tipos de sangre por el vector Triatoma dimidiata (Hemiptera: Reduviidae)***

OLGER CALDERÓN-ARGUEDAS\*, MISAEL CHINCHILLA\*, FERNANDO GARCÍA\* y MARIO VARGAS\*

BIOLOGICAL VARIATIONS OF *Trypanosoma cruzi* (KINETOPLASTIDA: TRYPANOSOMATIDAE) ASSOCIATED TO THE INGEST OF DIFFERENT KINDS OF BLOOD BY THE VECTOR *Triatoma dimidiata* (HEMIPTERA: REDUVIDAE)

*The effect of avian and mouse blood in the gut of Triatoma dimidiata (Hemiptera: Reduviidae) on the biological characteristics of two costarican strains of T. cruzi (TC-2 and TC-4) was evaluated in a murine model. This relationship defined four experimental systems named TC-2 gallina, TC-2 raton, TC-4 gallina and TC-4 raton. Parasites from each system were inoculated intraperitoneally in C<sub>3</sub>H mice and the course of the infections were observed three times a week during 60 days. The observations included parasitemia levels (parasites/mm<sup>3</sup>), concentration of slender and broad forms, duration of prepatent and patent periods, survival, and cumulated mortality. The infection characteristics in all the systems were similar with parasitemia peaks in the days 23 to 33 post infection and broad forms as the predominant tripomastigote circulating forms in all the systems. Some variables such as prepatent and patent periods did not show statistically significant differences (p < 0.05). However, the survival was prolonged in mice that were infected to parasites associated to avian blood. The evolution of the mortality was slower in these systems. The data suggests that the parasite virulence modulation could be related to the particular blood sources in the vectors.*

**Key words:** *Trypanosoma cruzi*, Trypanosomatidae, *Triatoma dimidiata*, virulence, infections.

INTRODUCCIÓN

La modulación de la virulencia y la infectividad de *Trypanosoma cruzi* asociadas con los vectores han sido fenómenos documentados en la literatura científica<sup>1-3</sup>. Dado que el parásito utiliza el lumen intestinal del insecto como ambiente de multiplicación y diferenciación, las interacciones que *T. cruzi* pueda establecer con su entorno podría condicionar la variación de sus propiedades biológicas dentro de las cuales figuran la virulencia y la patogenicidad.

El tipo de sangre ingerida por los vectores puede ejercer algún efecto en los parásitos que están en procesos de multiplicación y diferenciación propios de su ciclo de vida<sup>4</sup>.

Algunos estudios de carácter epidemiológico han demostrado que en las zonas donde predominan vectores con un comportamiento altamente ornitofílico, la prevalencia de la infección con *T. cruzi* en humanos, así como las manifestaciones clínicas de la enfermedad de Chagas tienden a ser mínimas<sup>5,6</sup>. Esta observación plantea la posibilidad de que la sangre aviar, como

\* Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales (CIET,) y Departamento de Parasitología. Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica.

un eventual sustrato de alimentación en los vectores, pueda modular las características patogénicas o de infectividad en el parásito.

Basado en estos antecedentes se decidió implementar un modelo experimental en el cual se pueda comprobar la influencia de dos tipos de sangre (aviar y murina), ingerida por los triatominos, sobre las características biológicas de dos cepas costarricenses de *T. cruzi*.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Se usaron dos cepas costarricenses de *T. cruzi*, denominadas arbitrariamente TC-2 y TC-4, las cuales se mantienen en el Departamento de Parasitología de la Universidad de Costa Rica mediante pasajes sanguíneos en ratones C<sub>3</sub>H.

Se trabajó con ratones (*Mus musculus*) machos de la cepa C<sub>3</sub>H con un peso de 18-20 g, los cuales fueron mantenidos en grupos de 5 dentro de cajas plásticas de 28 x 16 x 12 cm con agua y alimento "ad libitum" y bajo un fotoperíodo de aproximadamente 12 horas.

Se usaron ninfas de 3° y 4° estadio de *Triatoma dimidiata* obtenidas de la colonia que se mantiene en el Departamento de Parasitología de nuestra Facultad. Dichos insectos tuvieron un ayuno de aproximadamente cinco semanas, al momento de inicio del experimento.

**Ensayo de interacción parásito-sangre aviar:** Se infectaron 30 triatominos con la cepa TC-2 y un número igual con la TC-4 de *T. cruzi*. Dicha infección se realizó mediante alimentación por 90 minutos en ratones que mostraban parasitemias del orden de 10<sup>3</sup> - 10<sup>4</sup> formas sanguíneas/mm<sup>3</sup> (FS/mm<sup>3</sup>).

De los triatominos infectados con cada una de las cepas, 15 fueron alimentados con sangre de gallina y 15 con sangre de ratón, lo que definió, en concordancia con las cepas utilizadas, cuatro sistemas experimentales denominados TC-2 gallina, TC-2 ratón, TC-4 gallina y TC-4 ratón. Las alimentaciones se efectuaron en los días 30 y 60 post infección.

Transcurridos 90 días, los insectos que no murieron y a los cuales se les confirmó la infección con *T. cruzi* mediante observación microscópica de las heces (Tabla 1), se diseccionaron para separar el tubo digestivo y transferirlo a placas Petri de 35 mm de diámetro. El contenido intestinal fue suspendido y emulsificado en 2,0 mL de solución salina estéril al 0,85% y pH 7,0 con antibióticos (penicilina 100

UI/mL y estreptomina 100 mg/mL). Las formas de *T. cruzi* presentes en la suspensión fueron cuantificadas en un hemo-citómetro de Neubauer.

Se ajustó, a partir de cada una de las suspensiones, un inóculo promedio de 7,6 x 10<sup>2</sup> tripomastigotos metacíclicos, el cual fue inyectado intraperitonealmente en cada ratón.

Los ratones fueron sangrados tres veces por semana y la parasitemia fue cuantificada por hemocitometría. Adicionalmente, para cada ratón se preparó un frotis de sangre el cual se fijó con metanol por 5 minutos y se tiñó con Giemsa para su observación microscópica en la cual se determinó la proporción de formas gruesas ("broad forms") y formas delgadas ("slender forms") del parásito. Estas fueron expresadas como formas/50 campos 40X. Las observaciones realizadas incluyeron, además, los períodos prepatente y patente, la supervivencia y la mortalidad acumulada durante un período de observación de 60 días.

Los promedios de los períodos prepatente, patente y la supervivencia de los sistemas correspondientes a cada cepa fueron comparadas mediante pruebas de T Student utilizando un nivel de significancia del 95%<sup>7</sup>. La mortalidad acumulada que se observó en los sistemas relativos a cada cepa fue evaluada mediante pruebas de hipótesis para la comparación de proporciones muestrales, utilizando un nivel de significación del 90%<sup>7</sup>.

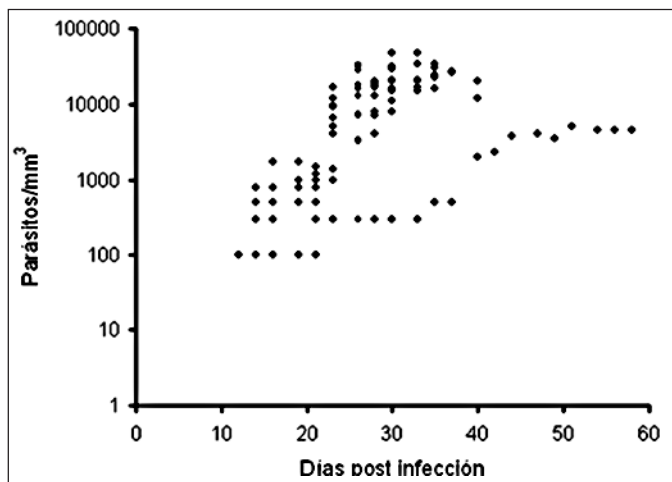
## RESULTADOS

Las infecciones por *T. cruzi* observadas en los ratones correspondientes a los sistemas en estudio tuvieron importantes similitudes. Las características relativas al tropismo tisular observado han sido publicadas con anterioridad<sup>8</sup>.

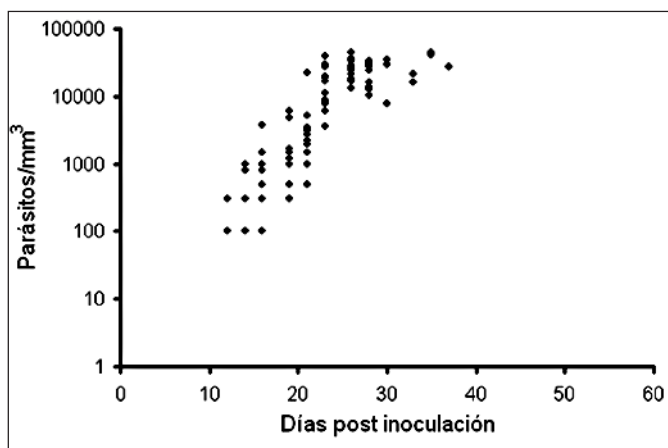
En los cuatro sistemas, la evolución de la

**Tabla 1. Evidencia de la infección por *Trypanosoma cruzi* en los triatominos trabajados en el momento de su disección**

Sistema	Triatominos Trabajados	Triatominos muertos o negativos	Nº de Triatominos para infectar ratones
TC-2 gallina	15	3	12
TC-2 ratón	15	2	13
TC-4 gallina	15	4	11
TC-4 ratón	15	5	10
Total	60	14	46



**Figura 1.** Valores de parasitemia mostrados por los ratones pertenecientes al sistema TC-2 gallina, durante el período de observación.



**Figura 2.** Valores de parasitemia mostrados por los ratones pertenecientes al sistema TC-2 ratón, durante el período de observación.

parasitemia tuvo un comportamiento creciente, cuyos niveles máximos se alcanzaron entre los días 23 y 33 (Figuras 1- 4, Tabla 2). Cabe destacar que en los sistemas relacionados con sangre murina, la parasitemia máxima se alcanzó precozmente (Figuras 2 y 4). Por otro lado, la dispersión de los valores fue más marcada en los sistemas vinculados con la sangre aviar (Figuras 1 y 3).

Tanto con la cepa TC-2 como con la TC-4, se pudo observar un marcado predominio de las formas gruesas, independiente de su eventual relación con el tipo de sangre utilizado como

sustrato para los triatominos (Figuras 5-8). Con respecto a los períodos prepatentes, éstos tuvieron duraciones de entre 13,0 a 14,1 días, sin que se pudieran evidenciar diferencias significativas entre los sistemas (Tabla 2).

La duración de los períodos patentes fue de 18,1 a 29,4 días sin que existieran diferencias significativas entre los sistemas relativos a cada cepa (Tabla 2). Cabe destacar que la mayoría de los ratones murieron en la fase aguda de la infección, sin que haya ocurrido la negativización de la parasitemia.

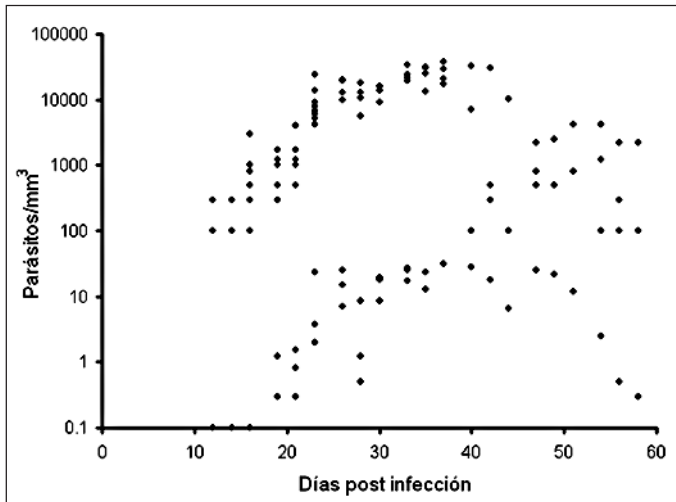
La supervivencia promedio se vio prolongada en los sistemas relacionados con sangre aviar (Tabla 2). Tanto en la cepa TC-2 como en la TC-4, los sistemas aviarios tuvieron períodos de supervivencia significativamente mayores que los sistemas murinos ( $p < 0,05$ ) (Tabla 2).

La mortalidad progresó de una manera más marcada en los sistemas relacionados con sangre murina (Figuras 9 y 10). En la cepa TC-2 se dieron diferencias que fueron significativas entre los sistemas TC-2 gallina y TC-2 ratón en los días 30, 33 y 35 post infección ( $p < 0,1$ ) y para el día 40, se alcanzó la mortalidad total de los ratones del sistema TC-2 ratón. En relación con la cepa TC-4, las diferencias significativas se evidenciaron únicamente en el día 33 ( $p < 0,1$ ).

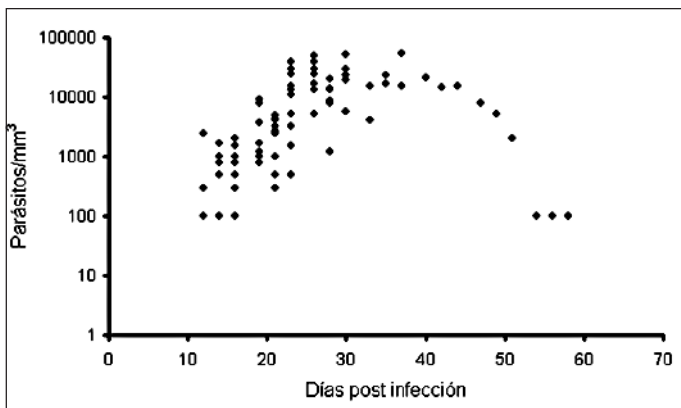
Es importante mencionar que tanto en el sistema TC-2 gallina como en el TC-4 gallina, nunca se alcanzó el 100% de mortalidad.

## DISCUSIÓN

El hecho de que las aves sean refractarias a la infección por *T. cruzi*<sup>9-11</sup>, más las observaciones epidemiológicas en las cuales un comportamiento oritofílico en vectores se ha relacionado con el bajo impacto de la enfermedad de Chagas en poblaciones humanas<sup>5,6</sup> justifica la posibilidad de considerar a la sangre aviar como un agente



**Figura 3.** Valores de parasitemia mostrados por los ratones pertenecientes al sistema TC-4 gallina, durante el período de observación.



**Figura 4.** Valores de parasitemia mostrados por los ratones pertenecientes al sistema TC-4 ratón, durante el período de observación.

modulador del comportamiento parasitario.

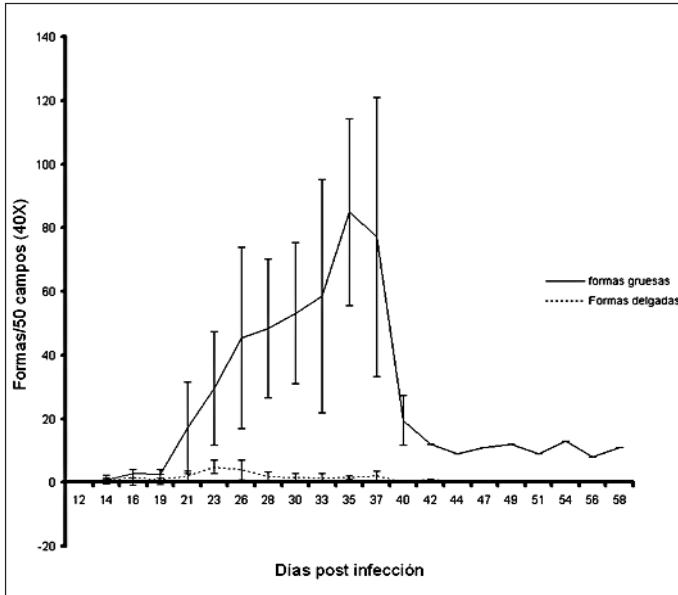
A diferencia de las aseveraciones hechas por algunos investigadores<sup>4</sup>, el presente modelo permitió demostrar que la alimentación de los triatominos infectados con sangre de ave no produce una depuración de las infecciones acarreadas por los invertebrados, por lo menos en el período que comprendió el ensayo de interacción.

A pesar de que la presencia de sangre aviar o murina en el intestino del vector podría representar una fuente de variación en las condiciones de multiplicación y diferenciación para los parásitos, las características de las infecciones generadas en los ratones tuvieron importantes similitudes. Dentro de estas figuran las características de las curvas de parasitemia (Figuras 1 - 4, Tabla 2), el tipo de formas sanguíneas predominantes (Figuras 5 - 8) y la duración de los períodos prepatente y patente (Tabla 2), lo que permitió visualizar cierta estabilidad en las características biológicas de las cepas estudiadas. No obstante, se pudo observar que los períodos de supervivencia fueron significativamente mayores en los ratones vinculados con la sangre aviar ( $p < 0,05$ ) (Tabla 2), presentándose además una evolución menos marcada de la mortalidad acumulada

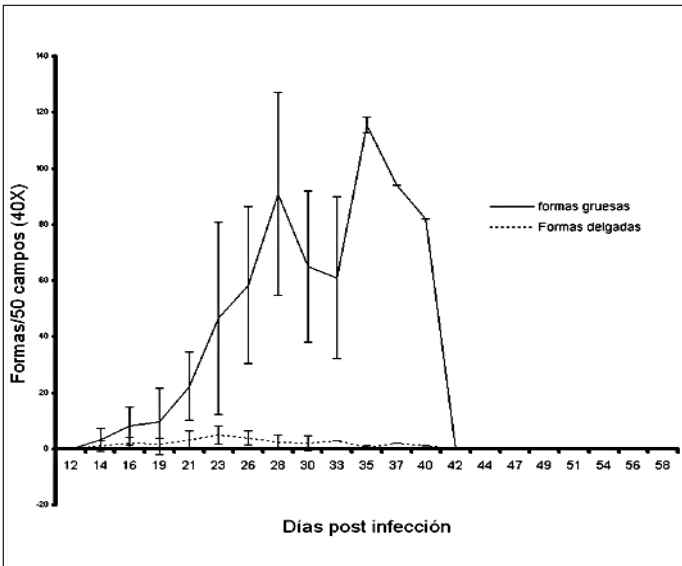
**Tabla 2.** Características de las infecciones por *Trypanosoma cruzi* sufridas por los ratones correspondientes a los sistemas experimentales

Sistema	Período prepatente (en días)	Período patente (en días)	Supervivencia (en días)	Niveles máximos de parasitemia (parásitos/mm <sup>3</sup> )	Tropismo Tisular***
TC-2 gallina	14,1* (2,6)**	23,0 (7,8)	35,0 (10,9)	4.0 x 10 <sup>4</sup>	Miocardio
TC-2 ratón	13,2 (1,0)	18,1 (3,8)	28,9 (3,3)	4.0 x 10 <sup>4</sup>	Miocardio
TC-4 gallina	13,6 (1,5)	29,4 (15,7)	41,8 (17,8)	4.0 x 10 <sup>4</sup>	Miocardio
TC-4 ratón	13,0 (1,7)	21,2 (8,1)	31,7 (10,1)	5.0 x 10 <sup>4</sup>	Miocardio

\* Promedio, \*\* Desviación estándar, \*\*\* Ver referencia 8.



**Figura 5.** Distribución de las formas sanguíneas gruesas y delgadas observadas en los ratones pertenecientes al sistema TC-2 gallina, durante el período de observación.



**Figura 6.** Distribución de las formas sanguíneas gruesas y delgadas observadas en los ratones pertenecientes al sistema TC-2 ratón, durante el período de observación.

(Figuras 9, 10). El análisis histopatológico de estos ratones, el cual fue informado previamente<sup>8</sup> permitió la observación de un menor número de nidos chagásicos por unidad de área así como

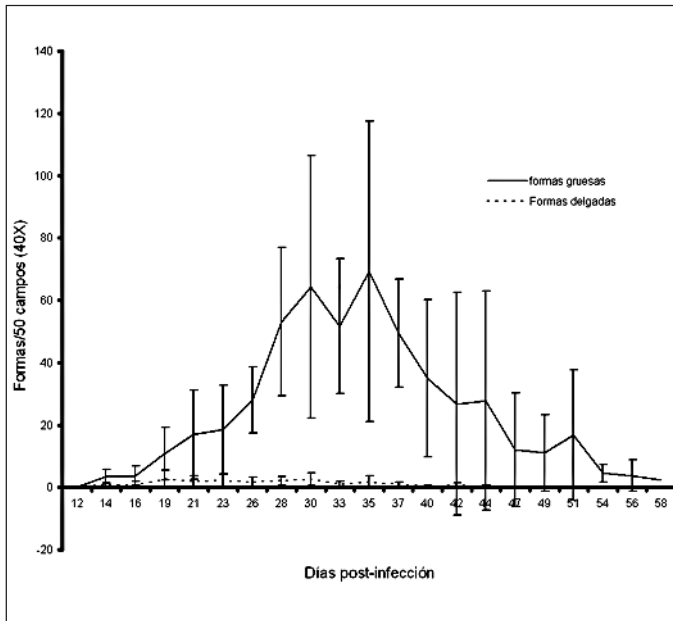
infiltrados inflamatorios menos severos, lo que podría indicar una menor activación de fenómenos fisiopatológicos asociados con la infección por *T. cruzi*.

Diversas investigaciones han demostrado que el comportamiento de *T. cruzi* puede ser modulable, algunas veces perdiendo su identidad isoenzimática y sus propiedades biológicas. Este es el caso de la cepa Y, la cual puede perder sus características de Zymodeme A para convertirse en Zymodemes B y C cuando se le cultiva en medios con cantidades decrecientes de suero fetal, desde un 10% hasta un 5%<sup>12</sup>. Este comportamiento puede ser revertido cuando se realiza una inoculación de los parásitos en un ratón lactante<sup>12</sup>. Así, investigadores encontraron que al pasar por *Triatoma infestans* dos cepas altamente patógenas de *T. cruzi* (RA y UP), presentaban una disminución en sus características de virulencia e infectividad<sup>13</sup>. También trabajaron con una cepa poco virulenta denominada CA-I, en la cual se pudo observar un incremento en sus propiedades de virulencia y patogenicidad.

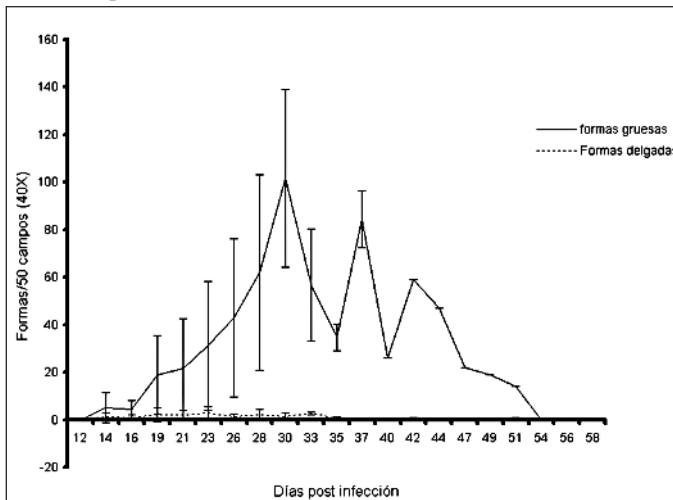
Otros experimentos han mostrado la influencia positiva de componentes del vector como la hemolinfa o extractos de órganos y tejidos en los procesos de multiplicación y diferenciación de *T. cruzi* en sistemas "in vitro"<sup>14,15</sup>. Los aspectos anteriormente señalados demuestran que componentes inherentes al hospedador invertebrado pueden relacionarse con las características que expresan los parásitos.

Los mecanismos por los cuales los componentes anteriormente mencionados puedan ejercer su influencia sobre las características de los

parásitos no se conocen; sin embargo, evidencias señalan la posibilidad de que ocurran fenómenos de selección en los cuales clones más o menos virulentos se constituyan como los dominantes



**Figura 7.** Distribución de las formas sanguíneas gruesas y delgadas observadas en los ratones pertenecientes al sistema TC-4 gallina, durante el período de observación.



**Figura 8.** Distribución de las formas sanguíneas gruesas y delgadas observadas en los ratones pertenecientes al sistema TC-4 ratón, durante el período de observación.

en una cepa y los cuales condicionarían el comportamiento del parásito en el hospedador<sup>3,16</sup>.

Diversos estudios han demostrado la presencia de factores potencialmente selectivos en el lumen intestinal de los triatomíneos. En *Rhodnius prolixus* se ha descrito la presencia de un factor hemolítico, el cual es capaz de lisar con diferentes cinéticas de lisis a cepas y clones particulares de

*T. cruzi*<sup>17</sup>, lo que demuestra la posibilidad de que existan parásitos que sean depurados más rápidamente que otros. Otro tipo de sustancias que podrían interactuar con los parásitos son las lectinas<sup>18</sup>. En relación con lo anterior se ha demostrado, mediante experimentos en cultivos celulares<sup>19</sup>, que cuando los parásitos son expuestos a diferentes tipos de monosacáridos, previo a un ensayo de infección celular, éstos muestran variaciones en sus propiedades de infectividad. Estos componentes, de tipo endógeno, podrían potenciarse o neutralizarse por agentes exógenos, donde la la sangre presente en el intestino de los vectores podría figurar como un agente selectivo.

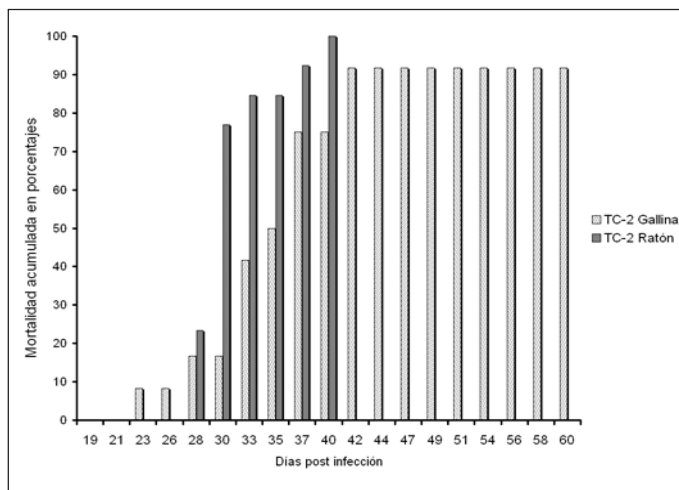
A pesar de que los mecanismos de resistencia de las aves han sido ampliamente estudiados y caracterizados<sup>9-11</sup>, no se puede asegurar de que éstos mismos sean los responsables de los efectos observados en el experimento, por cuanto los componentes humorales como el complemento y las gama globulinas, serían degradados por los componentes digestivos propios del intestino de los triatomíneos.

Queda pendiente el estudio de potenciales metabolitos resistentes a la degradación enzimáticos o productos de la misma que puedan interactuar y de esta manera mediar una eventual selección clonal que pueda ser el responsable de las modulaciones en las características observadas.

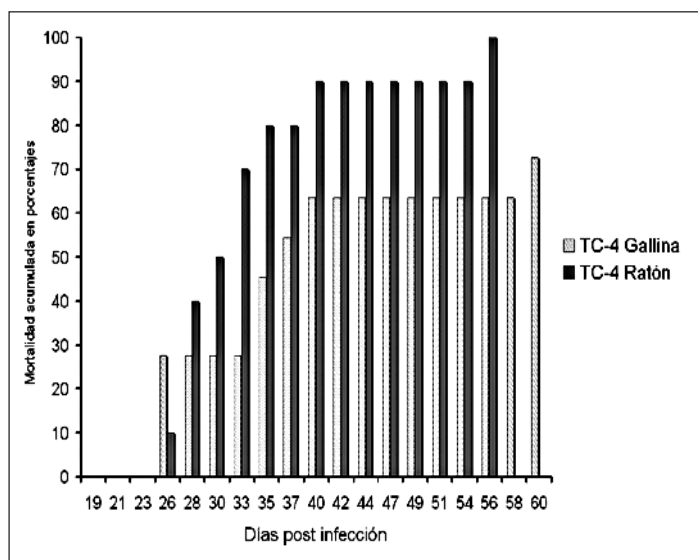
## RESUMEN

El efecto de las sangres aviar y murina sobre las características biológicas de dos cepas costarricenses de *T. cruzi* (TC-2 y TC-4) fue evaluado mediante un modelo experimental en el cual se infectaron ratones con parásitos previamente expuestos a estos tipos de sangre en el intestino del vector *Triatoma dimidiata* (Hemiptera:





**Figura 9.** Mortalidad acumulada observada en los ratones infectados con los parásitos pertenecientes a cepa TC-2 (Sistemas TC-2 gallina y TC-2 ratón).



**Figura 10.** Mortalidad acumulada observada en los ratones infectados con los parásitos pertenecientes a la cepa TC-4 (Sistemas TC-4 gallina y TC-4 ratón).

Reduviidae). La relación que se estableció entre las cepas y los tipos de sangre utilizados permitió definir cuatro sistemas experimentales denominados arbitrariamente TC-2 gallina, TC-ratón, TC-4 gallina y TC-4 ratón.

Parásitos de cada sistema fueron inoculados intraperitonealmente en ratones C<sub>3</sub>H y el progreso de la infección fue registrado tres veces por semana durante un período de 60 días. Las observaciones incluyeron: niveles de parasitemia

(parásitos/mm<sup>3</sup>), concentración de formas gruesas y delgadas, duración de los períodos prepatente, patente y de supervivencia y la mortalidad acumulada.

Las características de las infecciones en todos los sistemas fueron similares. Estas mostraron picos de parasitemia entre los días 23 y 33 post infección y las formas gruesas fueron los tripomastigotos sanguíneos predominantes. Algunas variables como los períodos prepatente y patente no mostraron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ).

Sin embargo, el período de supervivencia se vio significativamente prolongado en los ratones infectados con parásitos asociados a sangre aviar ( $p < 0,05$ ). La evolución de la mortalidad fue menos marcada en estos sistemas.

Los datos sugieren la ocurrencia de una modulación en la virulencia parasitaria que podría estar relacionada con el tipo de sangre presente en el insecto vector.

## REFERENCIAS

- 1.- MAGALHAES J B, ANDRADE S G, SHERLOCK I. *Trypanosoma cruzi* strains: behaviour after passage into autochthonous or foreign species of triatomine (Biological and biochemical patterns). Rev Ins Med Trop Sao Paulo 1996; 38: 23-8.
- 2.- LANA M, CHIARI C A. Caracterizacáo biológica comparativa das cepas Berenice e Berenice-78 de *Trypanosoma cruzi* isoladas da mesma paciente em diferentes períodos. Mem Inst Osw Cruz 1986; 81: 247-53.
- 3.- LAURIA-PIRES L, SANTANA J M, TAVARES, F S, TEIXEIRA A R. Diversity of *T. cruzi* stocks and clones derived from Chagas' disease patients: I-Behavioral characterization *in vitro*. Rev Soc Bras Med Trop 1997; 30: 187-92.
- 4.- SCHAUB G. *Trypanosoma cruzi*: Quantitative studies of development of two strains in small intestine and rectum of the vector *Triatoma infestans*. Exp Parasitol 1989; 68: 260-73.
- 5.- QUINTAL R, POLANCO G. Feeding preferences of *T. dimidiata macu-lipennis* in Yucatán, México. Am J Trop Med Hyg 1977; 26: 176-8.

- 6.- CHRISTENSEN H, SOUSA O, VÁSQUEZ A M. Host feeding profiles of *T. dimidiata* in peridomestic habitats of Western Panamá. *Am J Trop Med Hyg* 1988; 38: 477-9.
- 7.- DANIEL W. Pruebas de hipótesis. En: Bioestadística. Base para el análisis de las ciencias de la salud. Editorial Limusa, México, 1988. 667 pp.
- 8.- CALDERÓN O, CHINCHILLA M, GARCÍA F, VARGAS M. Multiplificación tisular de *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) luego de su interacción con sangre aviar en el vector *Triatoma dimidiata* (Hemiptera: Reduviidae). *Patología* 2001; 39: 177-84.
- 9.- NERY-GUIMARAES F A. A refratariedade das aves ao *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*. I Ausencia de passagem para o sangue I duracao da viabilidade e destruicao dos Parasitos na pele. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1972; 70: 37-48.
- 10.- NERY-GUIMARAES F, LAGE H A. A refratariedade das aves ao *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* II. Refratariedade das galinhas desde o nascimento, persistencia da refratariedade após bursectomia I infeccoes em ovos embrionados. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1972; 70: 97-10.
- 11.- KIERSZENBAUM F, IVANYI J, BUDZCO D. Mechanisms of natural resistance to trypanosomal infection. Role of complement in avian resistance to *T. cruzi* infection. *Immunology* 1976; 30: 1-6.
- 12.- ALVES A, TANURI A, DE ALMEIDA D, VON KRÜGER W. Reversible Changes in the Isoenzyme electrophoretic mobility pattern and infectivity in clones of *Trypanosoma cruzi*. *Exp Parasitol* 1993; 77: 246-53.
- 13.- LAMMEL E, MÜLLER A, ISOLA E, GONZÁLEZ-CAPPA S. Effect of vector infectivity of *T. cruzi*. *Acta Tropica* 1982; 42: 149-55.
- 14.- ISOLA E, LAMMEL E, GONZÁLEZ-CAPPA S. *T. cruzi*: Differentiation after interaction of epimastigotes and *T. infestans* intestinal homogenate. *Exp Parasitol* 1986; 62: 339-335.
- 15.- ALVARENGA N, MORATO M, BAHIA-OLIVEIRA L et al. Triatomine's embryo extrates promote growth of culture forms of *Trypanosoma cruzi*. *Rev Soc Bras Med Trop* 1996; 29: 53-4.
- 16.- CALDERÓN-ARGUEDAS O, TROYO A, VA-LERIO I, CHINCHILLA M. Heterogeneidad clonal en epimastigotos de una cepa centroamericana de *T. cruzi*. *Parasitol Latinoam* 2002; 57: 40-5.
- 17.- AZAMBUJA P, GUIMARAES J, GARCÍA E. Haemolytic factor from the crop of *Rhodnius prolixus*: evidence and partial characterization. *J Insect Physiol* 1983; 29: 833-7.
- 18.- PEREIRA M, ANDRADE A, RIBEIRO J. Lectins of distinct specificity in *Rhodnius prolixus* interact selectively with *T. cruzi*. *Science* 1981; 211: 59-60.
- 19.- DOYLE P, DVORAK J, ENGEL J. *Trypanosoma cruzi*: Quantification and analysis of the infectivity of cloned stocks. *J Protozool* 1984; 3: 280-3.

**Agradecimientos:** Los autores quieren expresar su agradecimiento a los señores Iván Coronado y Eddy Camacho por su labor asistencial y a la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica por su apoyo financiero al proyecto VI- 803-097-251.