

Epimastigogénesis de *Trypanosoma cruzi*: método para estudiar *in vivo* la transformación de tripomastigota en epimastigota

Trypanosoma cruzi Epimastigogenesis: A Method for Studying
Trypomastigote to Epimastigote Transformation In Vivo

**Navarro A., María C.; Córdova L., Angi S.;
Fernández B., Karla N.; Arteaga O., Rosa Y.;
Graterol R., Diana I.; Domínguez B., María I.;
De Lima R., Ana R.; Pineda, Wilmer A.
y Contreras A., Víctor T. ***

Laboratorio de Protozoología, Instituto de Biología Molecular de
Parásitos (InBioMolP), Facultad de Ciencias de la Salud,
Universidad de Carabobo. Valencia, Venezuela. *convictu@cantv.net

Resumen

La epimastigogénesis de *Trypanosoma cruzi* ocurre naturalmente en el intestino del hospedador invertebrado. Se desconoce si los cambios morfológicos que ocurren durante la transformación de los tripomastigotas sanguíneos en epimastigotas son idénticos para diferentes aislados de *T. cruzi*. Aquí mostramos un método útil para estudiar los eventos que ocurren durante la epimastigogénesis, comparando parásitos de diferentes procedencias epidemiológicas. Se alimentaron artificialmente ninfas de V estadio de *Rhodnius prolixus* con una solución *ad hoc* conteniendo tripomastigotas tipo-sanguíneo y siguiendo los cambios morfológicos por 8 días. Los contenidos del intestino anterior de las ninfas se obtuvieron decapitando y comprimiendo el abdomen lo que permitió obtener rápidamente casi 100% del inóculo con cargas entre $1,9$ y $8,9 \times 10^6$ tripomastigotas/ninfa. El número de parásitos por ninfa y los cambios morfológicos se determinaron por Microscopia de Contraste de Fases y coloración con Giemsa. Las ninfas ingirieron 7,4 veces su peso de solución infectante, con volúmenes entre 101 y 357 μL (229 ± 66 mg), 50% de esa ingesta se eliminó como orina durante las primeras 24 h. Los tripomastigotas se transformaron en formas redondeadas antes de evolucionar a epimastigotas, siguiendo cinéticas diferentes según el aislado. Pro-

ponemos esta metodología para estudiar rápida y cuantitativamente los eventos tempranos de la epimastigogénesis de *T. cruzi* in vivo.

Palabras clave: *Trypanosoma cruzi*, epimastigogénesis in vitro e in vivo, *Rhodnius prolixus*.

Abstract

Trypanosoma cruzi epimastigogenesis naturally occurs in the intestine of the invertebrate host. It is not known whether the morphological changes that occur during transformation of bloodstream trypomastigotes to epimastigotes are identical for different *T. cruzi* isolates. This research shows a useful method for studying the events that occur during epimastigogenesis, comparing parasites from epidemiological sources. *Rhodnius prolixus* V stage nymphs were fed artificially with an *ad hoc* solution containing blood-like trypomastigotes and the morphological changes were examined during eight days. Anterior intestinal contents were removed by decapitation and squeezing the abdomen of the nymphs, which permitted obtaining quickly almost 100% of the inoculate with loads between 1.9 and 8.9×10^6 trypomastigotes/nymph. The number of parasites per nymph and morphological changes were determined using phase microscopy with Giemsa staining. The nymphs ingested 7.4 times their weight of the infecting solution with volumes between 101 e $357 \mu\text{L}$ (229 ± 66 mg); 50% of the ingest was eliminated as urine during the first 24 hours. The trypomastigotes transformed to rounded forms before evolving into epimastigotes following different kinetics according to the isolate. This method is proposed for rapid, quantitative study of the early events of epimastigogenesis for *T. cruzi* in vivo.

Key words: *Trypanosoma cruzi*, in vitro e in vivo epimastigogenesis, *Rhodnius prolixus*.

Introducción

La transformación del tripomastigota sanguíneo de *Trypanosoma cruzi* en epimastigota se identifica como epimastigogénesis, ocurre naturalmente en el intestino del hospedador invertebrado en respuesta a la caída de temperatura entre el mamífero y el insecto (1). El tracto intestinal de los insectos se divide en cuatro regiones: la parte anterior del canal alimentario (Región I), estómago o intestino anterior (Región II), intestino medio posterior o delgado (Región III) y porción final del intestino o cloaca rectal (Región IV) (2). Sin embargo, se ha reportado como conformado por tres compartimientos: el intestino anterior o estómago, el intestino medio y el intestino posterior (3). La bibliografía consultada describen las morfologías en el intes-

tino del vector sin detallar los eventos tempranos de la diferenciación y donde ocurre la epimastigogénesis de *T. cruzi*. García y Azambuja (4) proponen que los tripomastigotas sanguíneos se transforman directamente en epimastigotas, formas redondeadas con flagelo libre (esferomastigotas) y amastigotas que luego también se transforman en epimastigotas. Otros autores plantean que una parte de los tripomastigotas sanguíneos se transforman directamente en epimastigotas y otros pasan a esferomastigotas, que se transforman en epimastigotas cortos con capacidad replicativa y permanecen en el estómago, o en epimastigotas largos que no se dividen y se dirigen a la porción final del tracto intestinal (2). Se acepta que los parásitos están sometidos a fuertes presiones microambientales según la región del tracto in-

testinal, entre ellas la osmolaridad ya que $\frac{3}{4}$ partes del agua constituyente de la sangre ingerida por el insecto se elimina como orina en las primeras 4 horas (5) formándose un hemo-concentrado que se digiere por acción de las enzimas digestivas (2) y la liberación de hormonas del sistema endocrino del triatomo (6).

Para estudiar la relación parásito/hospedador invertebrado se debe ponderar variables asociadas al insecto, tales como el segmento del intestino donde ocurre la transformación y los cambios del contenido intestinal durante la digestión y variables inherentes a los parásitos, como tamaño del inóculo, cambios poblacionales y morfológicos mientras progresa la infección, constitución genética de los parásitos y triatominos. Es conocido el polimorfismo de los tripomastigotas sanguíneos de *T. cruzi*, en algunas cepas predominan las formas anchas, en otras las formas intermedias y finas (7). Se ha reportado que los tripomastigotas anchos son competentes para colonizar el invertebrado y que las formas finas se destruyen en el tracto intestinal (8,7). Existen técnicas que permiten la separación de estas morfologías (9) y evidencias indicando que *in vitro*, los eventos de diferenciación de los tripomastigotas gruesos y finos son semejantes (10). La epimastigogénesis de *T. cruzi* puede ser simulada *in vitro* y esos estudios usando aislados y medios diferentes presentan en común que la transformación se dispara por la caída de temperatura (11, 12), aparecen formas redondeadas precediendo los epimastigotas y aislados diferentes siguen cinéticas de transformación diferentes indicando que la constitución genética del parásito es un factor relevante en la epimastigogénesis *in vitro* (13). Se desconoce si los eventos de transformación estudiados *in vitro* son equivalentes a los que ocurren en el intestino del invertebrado.

En este estudio se ensaya una metodología para estudiar cuantitativamente los eventos primarios de la transformación de tripomastigotas sanguíneos en epimastigotas en el intestino de *R. prolixus*, utilizando aislados de *T. cruzi* procedentes de fuentes epidemiológicas diferentes.

Material y método

Parásitos, estadios e Insectos

Se trabajó con tres aislados de *T. cruzi* mantenidos en el laboratorio por al menos veinte años por pases sucesivos alternos triatomo/ratón: clon EPm6 clonado de la cepa humana EPm; cepa DmN5 aislada de *Didelphys marsupialis* y cepa RpN2 aislada de un *R. prolixus* domiciliario (14). Se emplearon parásitos recientemente aislados de ratón por hemocultivo. Los tripomastigota tipo hemático se obtuvieron del sobrenadante de células Vero cultivadas en medio MEM con 5% Suero Fetal Bovino (SFB) en atmósfera de CO₂ (5%) a 35°C según el protocolo rutinario del laboratorio (15). Los tripomastigotas se concentraron (1.500 × g 15 min a 4°C). Para los ensayos de epimastigogénesis *in vivo* se emplearon *R. prolixus* sanos mantenidos en el insectario experimental del Instituto Bio-MolP a temperatura ambiente y adecuada humedad relativa.

Epimastigogénesis de *T. cruzi* en *R. prolixus*

Se hicieron ensayos pilotos con ninfas de *R. prolixus* para establecer las condiciones de trabajo. Las variables ensayadas fueron: (a) determinación del mejor estadio de las ninfas para la infección, (b) identificación indeleble de las ninfas, (c) alimentación artificial y controlada de las ninfas, (d) estimación del inóculo por insecto, (e) estimación de los cambios de volumen de la ingesta sanguínea

en el tiempo, (f) determinación del número y morfología de los parásitos en el contenido intestinal de los insectos a diferentes tiempos de digestión. Para el análisis del contenido intestinal se varió: (i) la cantidad de glóbulos rojos en las soluciones de infección, (ii) el tiempo de alimentación de los insectos, (iii) el tamaño del inóculo y (iv) la solución de lisis de los glóbulos rojos para estandarizar los recuentos parasitarios en cámara de Neubauer.

1. *Procedimiento para la infección de los insectos y determinación del inóculo.*

Ninfas de V estadio de *R. prolixus* se identificaron individualmente tiñendo diferencialmente las patas y el dorso con pintura de uñas. Se pesaron (balanza electrónica AND modelo GF-200 con precisión $\pm 0,1\text{mg}$) y tabularon los pesos por individuo. Lotes de 30 ninfas se mantuvieron en envases de vidrio (frascos de compota) tapados con tul y ligas de goma, conteniendo en su interior armazones de papel de filtro para evitar hacinamiento. Las ninfas fueron sometidas a ayuno prolongado (4 semanas) para aumentar su voracidad y garantizar con menor tiempo de alimentación, mayores ingestas y mayor número de insectos alimentados. Las ninfas se infectaron experimentalmente dentro de los 10 días siguientes a su identificación y peso, utilizando un alimentador artificial de vidrio como el descrito por García y col. (16). El alimentador o tetero (Figura 1A) consta de una cámara interna tipo embudo con pistilo largo rodeado de una chaqueta de vidrio a manera de cámara externa para circular agua a 40°C . La cámara interna del dispositivo se completó usando una membrana de látex sujeta al borde del embudo con ligas de goma. El dispositivo se mantuvo vertical sujetado con pinzas a un soporte universal. Por el pistilo del embudo se inyectaron en la cámara interna 12 mL de solución de alimentación infectante (Figura 1B). El envase de mantenimien-

to de las ninfas (30/envase) se acopló a la cámara interna yuxtaponiendo la tapa de tul a la membrana de látex (Figura 1C). La temperatura de la solución de alimentación se mantuvo colocando agua a 40°C en la cámara externa del dispositivo. La solución de alimentación infectante se preparó mezclando 5 mL de medio MEM sin suero (con un número conocido de parásitos/mL); 0,5 mL de suspensión de glóbulos rojos humanos y 6,5 mL de solución de disolución (150 mM NaCl, 2 mM EDTA). La papilla de glóbulos rojos se preparó usando 5 mL de sangre humana (RhO⁻) descartada por vejez, lavada 3 veces con buffer salino fosfato (PBS) (3.000 xg, 10 min 4°C) y del sedimento de la 3ra centrifugación se retiraron con pipeta los volúmenes de papilla según el protocolo experimental. La solución de alimentación tenía un hematocrito del 3% y se incubó 10 min a 37°C , antes de colocarla en la cámara interna del alimentador artificial para ofrecer la temperatura ideal de alimentación de las ninfas. Para aumentar el número de ninfas alimentadas, la infección experimental se hizo en oscuridad dentro de una estufa a 37°C por períodos de 10 a 30 minutos.

Se seleccionaron las ninfas alimentadas, se pesaron individualmente y se tabularon los pesos post-alimentación. Las ninfas infectadas se colocaron en nuevos envases con papel de filtro hasta su procesamiento. El peso neto ingerido por ninfa se estimó gravimétricamente por sustracción del peso de la ninfa antes de su alimentación. Previamente se hizo una curva de calibración pesando volúmenes conocidos de la solución de alimentación y se determinó que 1 mg era equivalente a 1 μL de mezcla. Esta calibración se usó para estimar el volumen ingerido por ninfa. Conociendo el número de parásitos por μL de solución de alimentación, se estimó la carga parasitaria por ninfa a tiempo 0 (inóculo in-

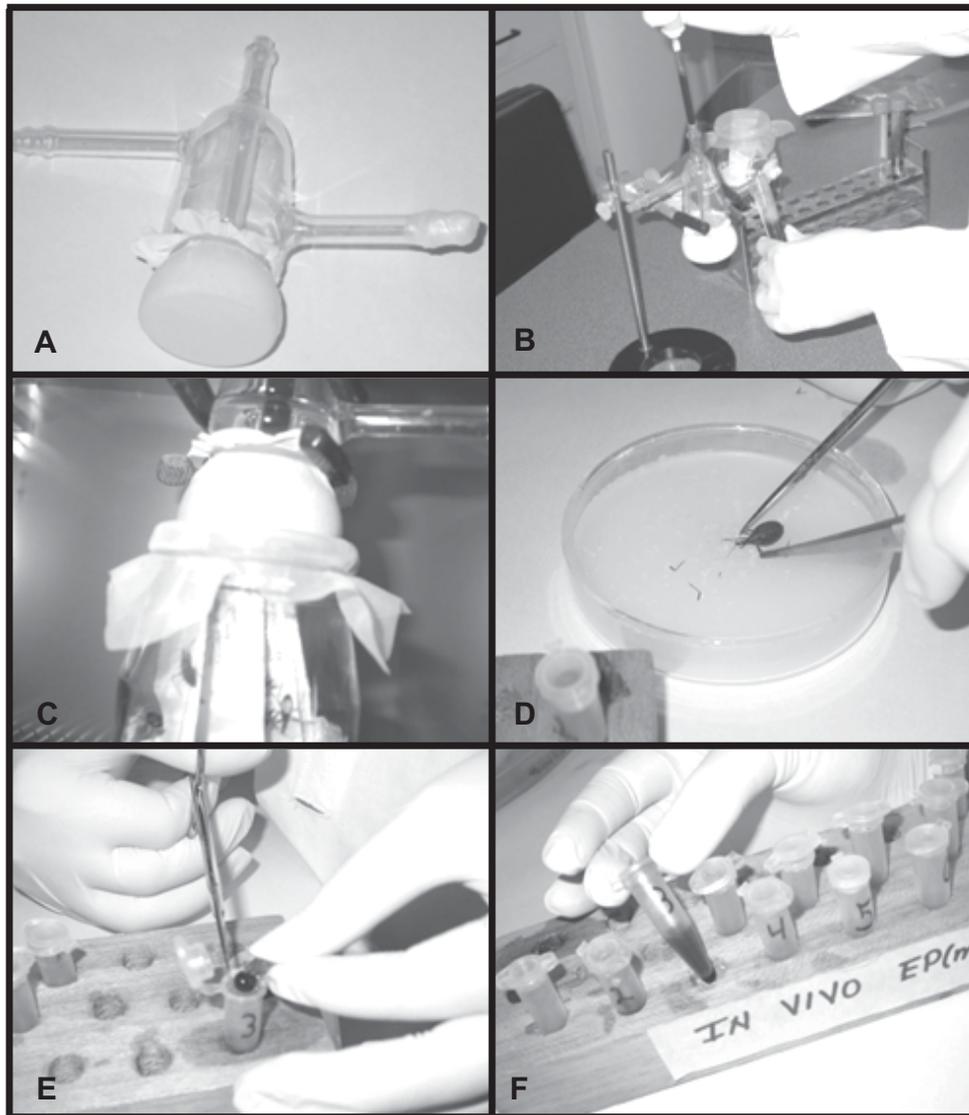


Figura 1. Método para estudiar la epimastigogénesis de *T. cruzi* en el insecto vector. (A) Alimentador artificial (tetero), (B) Llenado del tetero con solución de alimentación infectiva, (C) Alimentación de los insectos. (D) Preparación de las ninfas antes de decapitarlas, (E) Corte de la cabeza y recolección del contenido estomacal por compresión abdominal en tubo Eppendorf con 500 μ L de PBS previamente pesado, (F) Tubo con el contenido intestinal para determinar peso, volumen y número de parásitos a tiempo t.

gerido) en ninfas con menos de 40 minutos de alimentadas.

Por acto reflejo, las ninfas eliminan orina al finalizar su alimentación, lo que afecta la estimación gravimétrica del volumen ingerido. Para estimar el porcentaje de pérdida de volumen durante la manipulación, se pesaron algunas ninfas recién alimentadas (tiem-

po menor a 40 min) y se usaron como control, encontrando que las desviaciones eran menores al 5%. La estimación del número de parásitos/mL en la solución de alimentación infectante se hizo por triplicado al inicio y una hora después de culminar la alimentación de las ninfas, y no se apreció efecto lítico ni cambios morfológicos. Los recuentos dife-

renciales se hicieron en cámara de Neubauer bajo microscopio de contraste de fases.

2. *Determinación del volumen del contenido intestinal y la carga parasitaria.* La determinación de los cambios de volumen del contenido intestinal a diferentes tiempos de digestión de los insectos se hizo gravimétricamente. Lotes de 30 tubos Eppendorf con 500 μ L de PBS se rotularon y pesaron individualmente para ser usados como tubos de recolección. Se cortaron las patas (Figura 1D), se decapitó y comprimió el abdomen de cada ninfa, dejando caer el contenido intestinal dentro del tubo de recolección (Figura 1E) y se mezcló (Figura 1F). El peso del contenido intestinal de la ninfa, se estimó por sustracción sabiendo que 1 mg es equivalente a 1 μ L de mezcla. Los tiempos de digestión estudiados fueron 0 horas, 6 horas (1/4 de día), 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8 y 10 días. El número de parásitos/insecto se determinó por recuento diferencial de parásitos/mL en la mezcla y se refirió al volumen del contenido digestivo de la ninfa. Al menos 3 ninfas infectadas con cada aislado se examinaron después de 30 días para confirmar la presencia de metacíclicos en la orina.

3. *Estudios de los cambios morfológicos de T. cruzi que ocurren en el contenido intestinal del insecto.* Para obtener muestras enriquecidas en parásitos, con pocos detritus y glóbulos rojos, los contenidos intestinales de los tubos de recolección se sedimentaron (3 min a $7.000 \times g$ $4^{\circ}C$) y se suspendieron en 500 μ L PBS (0,15 M pH 7.2). Se hizo una segunda sedimentación delicada (4 seg a $7.000 \times g$ $4^{\circ}C$) para reducir la presencia de glóbulos rojos y detritus. Se colectó el sobrenadante enriquecido en parásitos y se hizo una 3era sedimentación de 1 min ($7.000 \times g$ $4^{\circ}C$), descartando el sobrenadante y suspendiendo el sedimento (vórtex) en 50 a 70 μ L de PBS. Los parásitos se fijaron agregando 20 μ L de solu-

ción salina con 2,0% de glutaraldehído y se colocaron gotas de 10 μ L en láminas portaobjeto las cuales se secaron a temperatura ambiente y se fijaron con metanol 100% por 3min. Adicional al recuento diferencial en cámara de Neubauer, la morfología de los parásitos se estudió en láminas coloreadas por la técnica de giemsa ácido (17). Las láminas fijadas se trataron por 10 min con HCl 5N, retirando el ácido con abundante agua y se colorearon con solución giemsa 5% en PBS 1/10. Los tiempos de tinción variaron entre 19 y 26 min según la cepa y el estadio (19 min para epimastigotas, 24 min para amastigotas y 26 min para tripomastigotas). Las morfologías se observaron con un aumento final de 1000X en un microscopio óptico (Nikkon, Eclipse 400) contando al menos 300 formas para determinar porcentajes morfológicos. Las morfologías más representativas se fotografiaron con cámara digital (Nikkon, Coolpix, 4500).

Resultados

Las ninfas de V estadio de *R. prolixus* pesaron en promedio 31 ± 8 mg/ninfa e ingirieron volúmenes variables de mezcla de alimentación e infección entre un máximo de 357 μ L y un mínimo de 101 μ L. En promedio, las ninfas infectadas con el clon EPm6 ingirieron 261 ± 36 μ L, con la cepa DmN5 224 ± 86 μ L y con la cepa RpN2 202 ± 68 μ L. En la Tabla 1 se compara en términos porcentuales la caída del contenido intestinal de ninfas alimentadas con tripomastigotas de los diferentes aislados (EPm6, DmN5, RpN2). Se aprecia que en las primeras 24 horas hay una disminución del contenido intestinal en las ninfas de las tres condiciones que representa en promedio un $52,4 \pm 9,4\%$.

Las ninfas de V estadio de *R. prolixus* ingirieron inóculos variables entre 1,9 y 16,7

$\times 10^6$ tripomastigotas/ninfa. El promedio de carga parasitaria ingerida a tiempo 0 (N_0) fue: $6,7 \pm 1,0 \times 10^6$ parásitos/insecto para el clon EPm6, $3,0 \pm 0,9 \times 10^6$ para la cepa DmN5 y $10,1 \pm 3,4 \times 10^6$ para la cepa RpN2. La Tabla 2 muestra la relación N_t/N_0 entre la carga parasitaria inicial (N_0) y la carga parasitaria a cada tiempo de infección (N_t) para ninfas alimentadas con mezclas conteniendo cada uno de los aislados. Se aprecia que en los tres aislados, los índices son menores que 1, lo que indica que la carga parasitaria inicial

se reduce siguiendo cinéticas diferentes según el aislado parasitario que infecta las ninfas. Para el aislado DmN5 la caída es abrupta (0,21 al día 0 a 0,04 al día 8), progresiva para RpN2 (0,76 al día 0 a 0,31 al día 8) y lenta para EPm6 (0,60 al día 0 a 0,70 al día 8).

La Figura 2 muestra los cambios morfológicos que ocurren durante la diferenciación de tripomastigotas en epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* en el intestino anterior del insecto. *Se aprecia que* los cambios morfológicos fueron similares indistintamente de

Tabla 1. Variación del contenido intestinal de ninfas de V estadio de *R. prolixus* infectadas con *T. cruzi* (EPm6; DmN5; RpN2).

Tiempo (días)	Caída del contenido intestinal a tiempo t (%)		
	EPm6	DmN5	RpN2
0	3,0	0,6	4,1
1/4	26,2	26,1	8,7
1	54,4	60,7	42,2
2	48,4	64,4	48,5
3	55,6	29,0	66,9
4	74,1	38,3	56,7
6	56,3	71,2	60,4
8	87,5	61,2	68,8

El 100% de los volúmenes de mezcla de alimentación conteniendo los tripomastigotas ingerido por insecto a tiempo cero fueron para el clon EPm6 $261 \pm 36 \mu\text{L}$, para la cepa DmN5 $224 \pm 86 \mu\text{L}$ y para la cepa RpN2 $202 \pm 68 \mu\text{L}$.

Tabla 2. Variaciones de las cargas parasitaria en el intestino anterior de ninfas de V estadio de *R. prolixus* alimentadas con mezclas conteniendo *T. cruzi* (EPm6; DmN5 y RpN2).

Tiempo (días)	N_t/N_0 de los aislados		
	EPm6	DmN5	RpN2
0	0,60	0,21	0,76
1/4	0,68	0,22	0,94
1	0,98	0,09	0,63
2	0,53	0,05	0,33
4	0,42	0,30	0,23
8	0,70	0,04	0,31

N_t/N_0 es el cociente entre el número de parásitos totales por ninfa a tiempo t (N_t) y el número de parásitos ingeridos por esa ninfa a tiempo cero N_0 (inóculo).

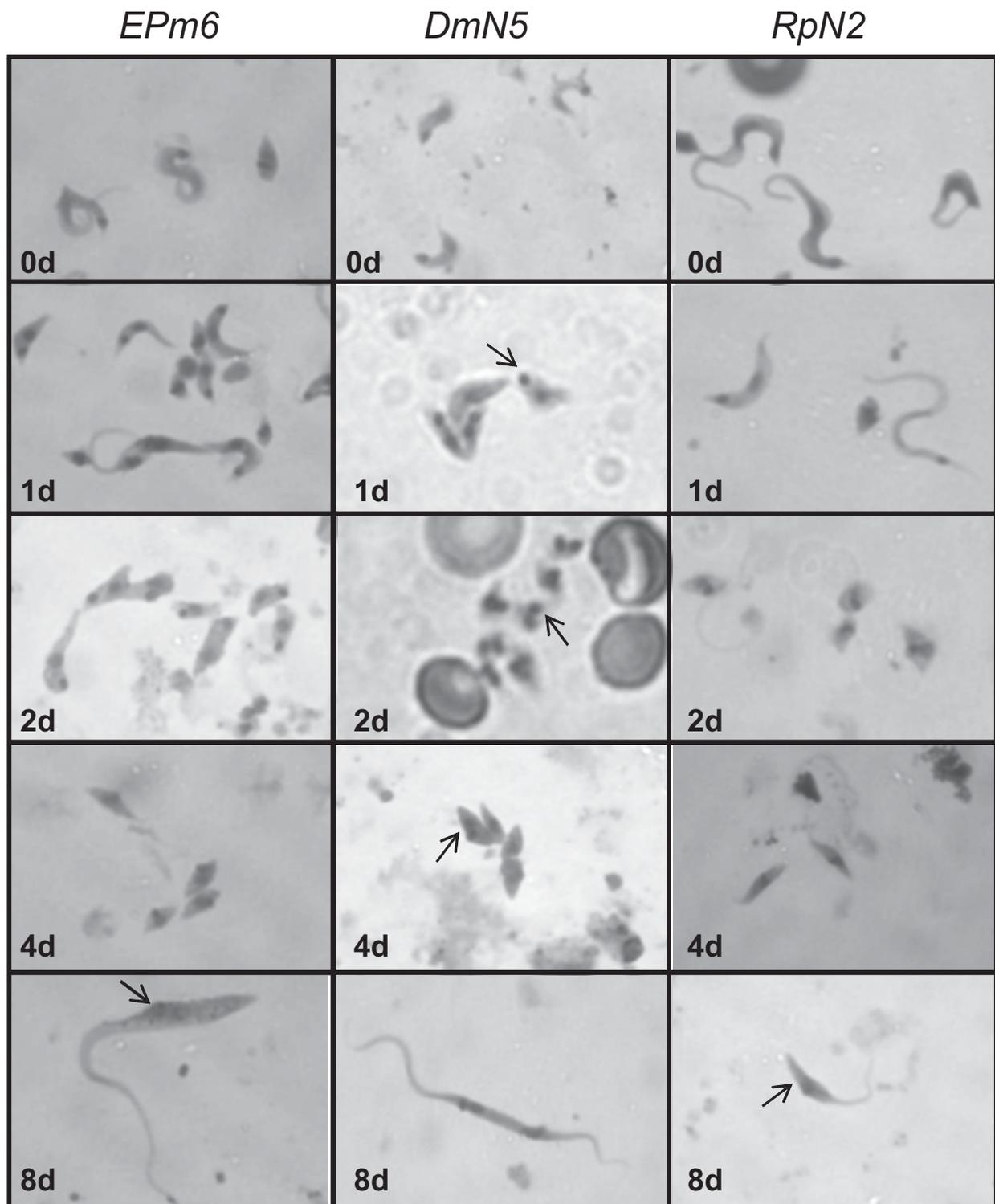


Figura 2. Cambios morfológicos que ocurren durante la diferenciación de tripomastigotas en epimastigotas (clon EPm6, cepa DmN5 y cepa RpN2) de *T. cruzi* en el intestino anterior de *R. prolixus*. Los números corresponden a tiempo en días. Coloración de Giemsa-Ácida (1000 X).

la procedencia epidemiológica del parásito. Las *micrografías muestran que* los tripomastigotas se redondean antes de convertirse en epimastigotas (Filas 0d a 8d de las columnas EPm6, DmN5 y RpN2). El proceso de transformación se inicia con un *acortamiento longitudinal de los tripomastigotas a formas redondeadas conservando el* kinetoplasto circular típico de los tripomastigota (flechas en Filas 1d y 2d, columna DmN5). Seguidamente se observan formas redondas u ovaladas (navetas) con kinetoplasto en barra, típico del estadio amastigota que se mantiene bajo esta morfología hasta el día 4 (flecha en Fila 4d, columna DmN5). Posteriormente se observaron escasos parásitos con kinetoplasto de ubicación anterior, flagelo conspicuo identificado como epimastigota (flecha en Fila 8d, columnas EPm6 y RpN2). Algunos epimastigotas muestran un gran tamaño que no se corresponde a los epimastigotas típicos.

La Tabla 3 muestra los cambios morfológicos que sufre el parásito en el intestino anterior del insecto. Nótese que a tiempo 0 los porcentajes de tripomastigotas son meno-

res que los obtenidos por recuento en las soluciones de alimentación e infección (ver pie de tabla). Se aprecia que en los tres aislados decrece el porcentaje de tripomastigotas concomitantemente con un incremento del porcentaje de las formas redondeadas y que la velocidad de transformación es diferente (DmN5 > EPm6 > RpN2). Las caídas de los porcentajes de tripomastigotas fueron rápidas para los aislados DmN5 y EPm6 (54,2 y 53,4% al día 0 a 2,1 y 6,3% al día 1, respectivamente) y más lenta para RpN2 (52,1% al día 0 a 0,9% al día 2). Simultáneamente las formas redondeadas y amastigotas incrementaron progresivamente hasta el día 4 y comenzaron a disminuir al octavo día. El porcentaje de epimastigotas en EPm6 varió de manera errática en las primeras 24 horas, alcanzó un máximo al día 2 (13,7%) y decreció progresivamente hasta el día 8. En DmN5 no se apreció epimastigotas excepto un bajo porcentaje (1,5%) a las 6 horas. En RpN2 se apreció una caída progresiva de los epimastigotas desde 6,6% a tiempo 0 hasta 1,9 al día 2. La suma de los porcentajes de tripomastigotas, formas redondeadas y epimastigotas en cada tiempo

Tabla 3. Cambios en los porcentajes de formas parasitarias que ocurren en el intestino anterior de ninfas de V estadio de *R. prolixus* infectadas con *T. cruzi* (EPm6; DmN5; RpN2).

Tiempo (días)	Porcentaje de formas según el aislado								
	EPm6			DmN5			RpN2		
	Tri	Red	Epi	Tri	Red	Epi	Tri	Red	Epi
0	53,4	20,5	3,4	54,2	5,8	0	52,1	16,8	6,6
1/4	26,3	26,3	0	12,4	18,2	1,5	18,4	34,8	6,2
1	6,3	39,1	0,8	2,1	67,0	0	12,7	45,3	1,3
2	0	67,9	13,7	0	78,2	0	0,9	75,9	1,9
4	0	79,6	7,8	0	100	0	0	92,9	0
8	0	65,4	2,8	0	51,4	0	0	90,6	0

Tri igual a tripomastigotas; Red a formas redondeadas y amastigotas, Epi a epimastigotas. La diferencia hasta 100% corresponde a formas en diferenciación de Tri a Red y de Red a Epi. Las soluciones de alimentación e infección (inoculas) de EPm6 y DmN5 tenían 100% de tripomastigotas y la de RpN2 71% de tripomastigotas y 28 % de formas redondeadas.

es menor que 100% debido a que no se tabularon las formas en diferenciación de tripomastigotas hacia formas redondas y de formas redondas hacia epimastigotas.

Discusión

Este trabajo muestra una metodología útil para estimar cuantitativamente los eventos primarios de la epimastigogénesis *in vivo* de *T. cruzi*. Se evidenció que la transformación de los tripomastigotas sanguíneos hacia epimastigotas es precedida por formas tipo amastigota, siguiendo cinéticas diferentes en aislados de diferente procedencia epidemiológica de forma equivalente a lo que ocurre *in vitro*.

El protocolo optimizado para este estudio se resume en la Figura 1. El tiempo para la obtención del contenido intestinal se disminuyó de varias horas a unos pocos minutos decapitando y comprimiendo el abdomen de las ninfas por cuanto en ninfas recién alimentadas, la distensión abdominal no permitió la separación del conxivo sin perforar el intestino anterior. La eficiencia del tetero para ninfas de V estadio fue alta, permitiendo una ingesta de 7,4 veces el peso del insecto. Este valor coincide con resultados encontrados en la literatura mostrando que *R. prolixus* alimentados sobre animales ingieren de 8 a 12 veces su peso en sangre, con volúmenes que oscilan entre 0,1 a 0,6 mL por insecto, dependiendo del estadio de la ninfa (14). La disminución del contenido intestinal del 50% en las primeras 24 horas, también coincide con evidencias previas (5, 18). Los cambios de volumen estimados como cambios porcentuales en los 8 días estudiados (Tabla 1), mostraron que la dinámica del tracto intestinal es similar a insectos infectados alimentados con sangre en condiciones naturales, indicando que nuestras condiciones experimentales si-

mulan la condición natural y son adecuadas para determinar cuantitativamente las cargas parasitarias.

Cabe destacar que no se encontró en la bibliografía reportes que indiquen la carga parasitaria mínima necesaria para infectar los insectos. Para los tres aislados empleados, las ninfas alimentadas con soluciones conteniendo tripomastigotas, se infectaron y llegaron hasta la producción de metacíclicos. Las cargas parasitarias infectantes a tiempo 0 fueron variables, siendo hasta 3 veces mayor para RpN2 ($10,1 \pm 3,4 \times 10^6$) que para DmN5 ($3,0 \pm 0,9 \times 10^6$). Era de esperar que a tiempo 0, la carga parasitaria ingerida fuese igual o ligeramente superior a 1 (debido a la pérdida porcentual del contenido intestinal por eliminación de orina), indicando igual concentración de tripomastigotas antes y después de la alimentación. Sin embargo, el análisis de los valores en la relación N_t/N_0 para los tres aislados a tiempo 0 muestra valores menores para RpN2, EPm6 y DmN5 (0,76; 0,60 y 0,21, respectivamente, Tabla 2), lo que representa una caída del inóculo de 34 %, 40 % y 89 %, respectivamente. Esta caída ocurrió sin pérdida de la infección, lo que indica que una parte de los tripomastigotas ingeridos se lisaron al entrar al insecto, en particular el aislado DmN5 procedente del reservorio silvestre fue más sensible al microambiente del intestino del insecto que los procedentes del insecto (RpN2) y de humano (EPm6). El papel selectivo del microambiente intestinal está soportado por el hecho que los tripomastigotas mantenidos en la solución de alimentación por 2 horas a temperatura ambiente no se lisaron ni transformaron de manera significativa. La acción de factores hemolíticos y la resistencia diferencial de los aislados de *T. cruzi* al microambiente intestinal ha sido reportada por diferentes autores (2, 19, 20). Si bien, se trabajo con tripomasti-

gotas morfológicamente homogéneos (formas intermedias sobrenadantes de células Vero), no se excluye que esos tripomastigotas mantengan la resistencia diferencial a lisarse en el microambiente intestinal asociado al polimorfismo de los aislados (8, 7).

Nuestros resultados muestran que indistintamente de la procedencia de los tripomastigotas de *T. cruzi*, en el estómago del insecto no ocurre transformación directa hacia epimastigotas, sino que los epimastigotas son precedidos por formas tipo amastigotas. En las cinéticas de transformación de los tres aislados se observaron formas tipo amastigota redondas y/o alargadas con kinetoplasto en barra y no aparecen amastigotas en división. Estos amastigotas se mantuvieron por tiempos variables según el aislado y en ningún caso por periodos menores a 8 días, aún cuando varió la proporción en función de la cepa. Es evidente de este análisis, que existe una morfología tipo amastigota extracelular en el intestino del triatomino y que se ubica en el intestino anterior. En relación a la presencia de epimastigotas, en los tres aislados se apreció que los porcentajes decrecieron, sugiriendo que los epimastigotas remanentes del inóculo pudieran migrar de compartimiento. Razonando que el tracto intestinal está conformado por tres compartimientos diferentes, proponemos que en nuestras condiciones experimentales, la compresión del abdomen permitió colectar predominantemente el contenido del estómago y que los cambios morfológicos estudiados en los primeros 8 días, no mostraron la fase de multiplicación de los epimastigotas que ocurre en el intestino medio (2). Es necesario desarrollar experimentos orientados al estudio de las propiedades biológicas y antigénicas de esas formas redondas (tipo amastigota) antes de concluir sobre la existencia del estadio amas-

tigota en el intestino del vector. El estudio de la epimastigogénesis de esos tres aislados *T. cruzi* en medios axénicos, evidenció que también *in vitro*, los tripomastigotas se diferencian a formas redondas y amastigotas antes de transformarse en epimastigotas (resultados no mostrados). Nuestro estudio de eventos morfológicos *in vivo* coincide con las investigaciones *in vitro* previamente reportadas (11-13), indicando que la epimastigogénesis *in vitro* mimetiza lo que ocurre en el hospedador invertebrado. Afirmar que las formas redondas que aparecen en el intestino del insecto son verdaderas amastigotas está más allá del alcance de este estudio. Sin embargo, tenemos evidencias mostrando que las formas redondas que aparecen durante la epimastigogénesis *in vitro* expresan antígenos específicos del estadio amastigota (sometidas a publicación) apoyando la hipótesis que la transformación de tripomastigotas hacia epimastigotas, es precedida por formas amastigotas.

Agradecimientos

Al Sr. Jhonny Albanese por la asistencia infraestructural. Organismos Financiadores: FONACIT S1-2001000683; CDCH-UC FCS-2003-005; CDCH-UC FCS-2010-001 e Investigaciones Menores CDCH-AM 0394-2010; CDCH-AM 011-2011; CDCH-AM 180-2011 y Ayuda Menor CDCH-AM 0461-2010.

Referencias bibliográficas

- (1) Rey L. Parasitología. 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan Editores; 2001. p. 151-160.
- (2) Kollien AH, Schaub GA. The developmental of *Trypanosoma cruzi* in *Triatominae*. Parasitol Today 2000; 16:381-387.

- (3) García ES, Ratcliffe NA, Whitten MM, Gonzalez MS, Azambuja P. Exploring the role of insect host factors in the dynamics of *Trypanosoma cruzi*-*Rhodnius prolixus* interactions. *J Insect Physiol* 2007; 53:11-21.
- (4) García ES, Azambuja P. Development and interactions of *Trypanosoma cruzi* within the insect vector. *Parasitol Today* 1991; 7:240-244.
- (5) Wigglesworth VB. The physiology of excretion in a blood-sucking insect, *Rhodnius prolixus* (Hemiptera, Reduviidae). I.- Composition of the urine. *J Exp Biol* 1931; 8:411-427.
- (6) Azambuja P, Feder D, García ES. Isolation of *Serratia marcescens* in the midgut of *Rhodnius prolixus*: impact of the establishment of the parasite *Trypanosoma cruzi* in the vector. *Exp Parasitol* 2004; 107:89-96.
- (7) Brener Z. Life cycle of *Trypanosoma cruzi*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 1971; 13:171-178.
- (8) Pereira Da Silva LH. Observações sobre o ciclo evolutivo do *Trypanosoma cruzi*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 1959; 1:99-118.
- (9) Schmatz DM, Boltz RC, Murray PK. *Trypanosoma cruzi*: separation of broad and slender trypomastigotes using a continuous hypaque gradient. *Parasitology* 1983; 87:219-227.
- (10) López EN, D' Jesús R. Infectividad en ratón de las formas de *Trypanosoma cruzi* diferenciadas por primocultivo en medio LIT. *Med-ULA* 1999; 5:44-47.
- (11) De Lima AR, Aparicio A, Berrocal A, Navarro MC, Graterol D, Contreras V. Epimastigogénesis de *Trypanosoma cruzi* en medio axénico: cambios peptídicos, glicopeptídicos y enzimáticos. *Salus* 2007; 11:39-47.
- (12) Barrios JG, Contreras O, Graterol D, Navarro MC, Contreras VT, De Lima AR. *Trypanosoma cruzi*: Epimastigogénesis en condiciones axénicas, cambios morfológicos, peptídicos, glicopeptídicos y antigénicos. *Acta Cient Venez* 2008; 59:1-11.
- (13) Contreras VT, De Lima AR, Navarro MC. Revisión: Morfogénesis de *Trypanosoma cruzi*: Factores relevantes para la diferenciación *in Vitro*. *Acta Biol Venez* 2006; 26:49-60.
- (14) Contreras V. Elementos de Apoyo para Trabajar en Enfermedad de Chagas. 1era ed. Fondo Editorial Universidad de Carabobo. Valencia: Clemente Editores; 1994. p. 35-47.
- (15) Andrews NW, Hong K, Robbins ES, Nussenzweig V. Stage-specific surface antigens expressed during the morphogenesis of vertebrate forms of *Trypanosoma cruzi*. *Exp Parasitol* 1987; 64:474-484.
- (16) García ES, Azambuja P, Contreras V. Large-scale rearing of *Rhodnius prolixus* and preparation of metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. In: Morel CM. *Genes and Antigens of parasites. A Laboratory Manual*. 2nd ed. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz: World Health Organization; 1984. p. 43-46.
- (17) Carvalho ALM. Estudos sobre a posição sistemática, a biología e a transmissão de tripanosomatídeos encontrados em *Zelus leucogrammus* (Perty, 1834) (Hemiptera, Reduviidae). *Rev Pat Trop* 1973; 2:223-274.
- (18) Montoreano R. Encuentro con *Rhodnius prolixus* y su sistema excretor. *Salus* 2003; 7:2-12.
- (19) Azambuja P, Guimarães JA, García ES. Haemolytic factor from the crop of *Rhodnius prolixus*: evidence and partial characterization. *J Insect Physiol* 1983; 29:833-837.
- (20) Azambuja P, Mello CB, D'Escoffier LN, García ES. *In Vitro* cytotoxicity of *Rhodnius prolixus* hemolytic factor and mellitin towards different trypanosomatids. *Braz J Med Biol Res* 1989; 22:597-599.