

## Immunidad natural de algunos *Triatominae* al *Trypanosoma equinum* Vogues, 1901\*

por

Rodrigo Zeledón\*\*

(Recibido para su publicación el 3 de diciembre, 1955)

La transmisión del *Trypanosoma equinum* Vogues, 1901, ha sido atribuida a diversos artrópodos, a ciertos hirudíneos y hasta a murciélagos hematófagos. Hasta hoy no ha sido posible, sin embargo, incriminar a ningún invertebrado como verdadero huésped intermediario de la parasitosis, toda vez que, no fue comprobado parte de un ciclo evolutivo en ninguno de ellos.

No obstante, NEIVA en 1913 (5) afirmó haber conseguido la evolución del flagelado en *Triatoma infestans* Klug, con cuyas deyecciones logró infectar cobayos por vía conjuntival, que presentaron tripanosomas 10 a 15 días después. NEIVA, que no refiere detalles de su experiencia, ni siquiera en relación a las formas presentadas por el tripanosoma en el hemíptero, cree que ese insecto no sea el transmisor natural del protozooario, basado, posiblemente, en la poca relación existente entre este grupo de hematófagos y las víctimas del mal de caderas: los caballos.

Posteriormente esa experiencia parece haber sido verificada de nuevo por DEL PONTE en 1921 (3) quien usó un único ejemplar de *T. infestans*. Los datos aportados por este autor no permiten formar un juicio exacto sobre el asunto.

De otro lado, DÍAS & SEABRA en 1943 (2) citan una serie de experiencias negativas, realizadas por algunos investigadores y por uno de ellos, en el sentido de conseguir la evolución del *T. equinum* en insectos triatóminos.

En esas condiciones decidimos investigar cualquier relación entre el flagelado del mal de caderas y algunas especies de *Triatominae* tratando de obtener las posibles formas evolutivas, no sólo en el tubo digestivo de los insectos, sino también en la cavidad general o hemocele de los mismos.

---

\* Trabajo realizado en el Laboratorio de Entomología del Instituto Oswaldo Cruz, Brasil.

\*\* Facultad de Ciencias, Universidad de Costa Rica.

## MATERIAL EMPLEADO

Los insectos utilizados pertenecen a las especies *Triatoma infestans*, *Panstrongylus megistus* y *Rhodnius prolixus*, de diversos estadios, y pertenecientes a la colección del Dr. Herman Lent del Instituto Oswaldo Cruz. La cepa de *T. equinum* nos fue suministrada por el Dr. Julio Muniz del mismo Instituto, siendo mantenida por nosotros por pasajes en ratón y rata.

## EXPERIENCIAS REALIZADAS

## ALIMENTACIÓN DE INSECTOS EN ANIMALES INFECTADOS

Primero fueron alimentados en fechas diferentes tres lotes de triatóminos, que eran disecados a intervalos sucesivos, como se relata a continuación:

LOTE 1: 10 *T. infestans* y 10 *R. prolixus* (ninfas) comen en 5/1/55; 24 horas después se hace la disección de un ejemplar de cada especie y en su contenido se encuentran tripanosomas muertos; 15 días después se abren 2 *T. infestans* y 1 *R. prolixus*: negativos; 20 días después 2 *T. infestans* y 1 *R. prolixus*: negativos; 25 días después 2 *T. infestans* y 2 *R. prolixus*: negativos.

LOTE 2: 10 *T. infestans* (adultos) comen en 26/1/55; 24 horas después se abren 2 y los tripanosomas están muertos; 8 días después se abre 1 hembra: negativa.

LOTE 3: 10 *P. megistus* (ninfas) comen en 5/2/55; 36 horas después se abre 1 ejemplar y los tripanosomas están muertos; un mes después se examinan 2 ejemplares: negativos.

Los ejemplares restantes de los tres lotes comen por segunda vez: un mes después los del 1º lote (3 *T. infestans* y 5 *R. prolixus*); 10 días después los del 2º lote (5 *T. infestans*), y un mes después los del 3º lote (3 *P. megistus*). Los del 2º y 3º lote se examinan a los 8 días, y 2 *Rhodnius* del 1º lote un mes después. De este último quedan ese día 2 *Rhodnius* y 3 *Triatoma* que se alimentan una tercera vez en animal infectado y 8 días después todos son disecados: negativos por tripanosomas.

Posteriormente es alimentado en rata infectada un cuarto lote compuesto de 32 *T. infestans* en todos los estadios evolutivos, con excepción de las primeras larvas; 10 días después se examinan 4 de ellas: negativas; 15 días después 7: negativas; 20 días después 2: negativas y 22 días después 13 más: negativas.

Con suspensión de contenido estomacal de 3 ejemplares de *T. infestans*, sacrificados 24 horas después de haber retirado la rata infectada en que comieron, son inoculados 1 ratón y 1 rata. El ratón muere 4 días después sin presentar tripanosomas y la rata tampoco los presentó hasta un mes después de la inoculación.

Por otro lado 2 ratones inoculados con contenido intestinal de 3 *T. infestans* sacrificados 5 horas después de retirada la rata, se presentan positivos al 3º día.

## INOCULACIÓN DE INSECTOS EN EL HEMOCELE

En una primera oportunidad, son inoculados con una suspensión de tripanosomas 12 *R. prolixus* y 8 *T. infestans*. Estos tripanosomas se conservan en la hemolinfa hasta 24 horas después.

En otra ocasión se inoculan 7 *P. megistus* y 5 *T. infestans* y del mismo modo, al día siguiente de la inoculación todavía es posible observar tripanosomas en algunos de ellos.

## INOCULACIÓN DE INSECTOS PREVIO "BLOQUEO" CON TINTA CHINA

Varios lotes de triatóminos fueron inoculados primero con una suspensión de tinta china en suero fisiológico estéril. Como testigos se inoculan algunos insectos con sólo la solución salina. Al día siguiente (24 horas después), eran inoculados todos con la suspensión de tripanosomas.

Los detalles los damos a continuación:

LOTE 1: 15 *T. infestans*, 15 *R. prolixus* y 8 *P. megistus* (larvas) inoculados con tinta china. Como testigos 6 *T. infestans*, 6 *R. prolixus* y 4 *P. megistus*. Al día siguiente mueren algunos, quedando además de los testigos 12 *T. infestans*, 10 *R. prolixus* y 6 *P. megistus* que se inoculan con tripanosomas. El resultado 24 horas después es el siguiente: todos los *Rhodnius* inoculados con tinta china están bien positivos, los *Panstrogylus* están negativos con excepción de uno con muy escasos tripanosomas, y los *Triatoma* están negativos todos. De los testigos hay únicamente 3 *Rhodnius* con muy pocos tripanosomas. A las 48 horas los *Rhodnius* permanecen positivos y los testigos están negativos; 72 horas después aún se encuentran 2 *Rhodnius* positivos de los inoculados con tinta china.

LOTE 2: se inoculan 12 *T. infestans* con tinta china y 8 se usan como testigos. Al día siguiente son inoculados con tripanosomas que 24 horas después ya no se encuentran.

LOTE 3: 9 *T. infestans*, 5 *P. megistus* y 5 *R. prolixus* se inoculan con tinta china. Como testigos 5 *T. infestans*, 4 *P. megistus* y 4 *R. prolixus*. Los primeros, los segundos y los testigos no presentan tripanosomas 24 horas después de su inoculación; de los *Rhodnius*, 4 se presentan positivos y uno negativo, al igual que los testigos que no presentaron flagelados; 48 horas después uno de estos *Rhodnius* aun presenta tripanosomas.

LOTE 4: 6 *R. prolixus* y 5 *T. infestans* inoculados con tinta china y 5 *R. prolixus* y 5 *T. infestans* como testigos; 24 horas después de la inoculación con tripanosomas los primeros *Rhodnius* se presentan bien positivos en cuanto que los *Triatoma* negativos. De entre los testigos solamente 2 *Rhodnius* presentaron escasos tripanosomas.

## ACCIÓN DE LA HEMOLINFA SOBRE LOS TRYPANOSOMAS

A fin de comprobar cualquier acción perjudicial de la hemolinfa de los insectos sobre los tripanosomas, se llevaron a cabo diversas experiencias.

En láminas excavadas depositáronse unas cuantas gotas de hemolinfa, de los tres insectos mencionados, por separado para cada especie; en otra lámina se colocó igual cantidad de solución salina para usar como testigo. Se hizo una suspensión gruesa de tripanosomas sanguíneos y se adicionó una gota de la misma a cada lámina así preparada. Un tiempo después no se observó ninguna modificación digna de nota.

Procedimos a repetir la experiencia usando esta vez una suspensión de tripanosomas más diluida, esto es, con menos parásitos. Media hora después de juntar las hemolinfas con los tripanosomas se nota que los flagelados prácticamente han desaparecido en el caso de *Panstrongylus* y *Triatoma*, en cuanto que permanecían móviles en el testigo y en la hemolinfa de *Rhodnius*.

En otra oportunidad el resultado no fue tan evidente notándose que los tripanosomas resistían más de media hora cuando mezclados con la hemolinfa de los insectos.

Por ocasión de estas experiencias pudimos notar la presencia en la hemolinfa de *P. megistus* de una sustancia aglutinante (títulos hasta de 1:640) para glóbulos rojos de varios animales (ratón, cobayo, paloma, hombre). Esta hemaglutinina no es evidenciable o es muy escasa en la hemolinfa de las otras especies.

#### TRYPANOSOMA EQUINUM Y GARRAPATAS

Quisimos verificar lo que acontecía con la inoculación de *T. equinum* en la cavidad general de otro artrópodo y escogimos para ello garrapatas.

En una primera experiencia se inoculan 6 hembras adultas de *Amblyomma cajennense* que 2 y 3 días después presentaban abundantes tripanosomas en el líquido hemolinfático obtenido, como en el caso de los triatóminos, por punción y expresión. En algunas de ellas, al tercer día nótanse flagelados en activa división, a veces en pequeñas rosetas de cuatro o cinco elementos. Al cuarto día el número de tripanosomas había disminuido en casi todos los ejemplares con excepción de uno que seguía presentando suficientes formas. Ese día se inoculó una ratón con hemolinfa de las garrapatas y se hace positivo tres días después. Al quinto día, la situación no ha variado nada y al sexto día solamente una garrapata, la que presentó más flagelados, permanece positiva aunque con menor número de tripanosomas, que desaparecen al noveno día.

Tanto a fresco como en láminas coloreadas no se notó en ningún momento entre los flagelados, otra forma que no fuera la de tripanosoma.

La experiencia se repite con otro lote de garrapatas de sapo (*Amblyomma* sp.) obteniéndose resultados en todo similares, inclusive en la inoculación de ratón con resultado positivo con hemolinfa de cuarto día. Debemos anotar que el tamaño de la garrapata es un factor importante ya que en ejemplares mayores podemos inyectar más inóculo, aumentando con ello la posibilidad de supervivencia de los tripanosomas. El método sería recomendable para transportar o enviar cepas de *T. equinum* de un lugar a otro, lo que sólo puede hacerse, en el momento actual, por medio de mamíferos susceptibles inoculados.

## DISCUSION Y CONCLUSIONES

A pesar de haber alimentado numerosos ejemplares de triatóminos en animales altamente infectados con *T. equinum*, en ningún caso observamos evolución del flagelado en el tracto digestivo de los insectos. La experiencia de NEIVA en 1913 (5), por lo demás poco detallada, tratando de demostrar esa evolución, puede haber tenido su origen en un cambio con insectos positivos por *Schizotrypanum cruzi*.

Todo indica que los triatóminos presentan una alta resistencia al *T. equinum* que muere en pocas horas en su tubo digestivo. Asimismo esta resistencia se pone de manifiesto cuando se inocula el tripanosoma en la cavidad general de los insectos. De acuerdo con TOUMANOFF en 1949 (7) la dificultad de infección experimental de los insectos por los gérmenes, por la vía bucal, es también una manifestación de su inmunidad natural. A pesar de que el concepto se refiere a infecciones bacterianas, podríamos adaptarlo a nuestro caso y tendríamos una relación clara entre lo que podríamos llamar inmunidad natural de un insecto a determinado organismo, por la vía bucal y por inoculación en su cavidad general. Recordemos por ejemplo que flagelados tales como el *S. cruzi* y el *T. rangeli* que evolucionan normalmente en el tubo digestivo de triatóminos, lo hacen también en la hemolinfa de los mismos (DÍAS en 1932 (1), ZELEDÓN en 1954 (8) ).

Debemos tomar en cuenta las necesidades metabólicas de estos organismos parasitarios y el comportamiento doble de los insectos, como un medio de cultivo y al mismo tiempo como un ser vivo capaz de defenderse. En primer lugar debe el microorganismo encontrar las condiciones indispensables para su buen desarrollo, superando las defensas del insecto y estableciéndose un estado parasitario más o menos perjudicial al mismo; por otro lado cuando esas condiciones no se presentan, el parásito no consigue multiplicarse debidamente, siendo vencido por defensas humorales o celulares, o por ambas a la vez, existentes en el artrópodo.

Nuestras experiencias indican que, en el caso de introducción de *T. equinum* en la cavidad general de triatóminos, la reacción humoral es mínima, y la mayor defensa parece estar a cargo de las células fagocitarias. Así parece indicarlo además, por lo menos en el caso de *R. prolixus*, la inyección previa de tinta china cuyas partículas llegan a llenar el citoplasma de los fagocitos, trayendo consigo un retardo en la capacidad fagocitaria de los mismos hacia los protozoarios. Así tenemos que, en insectos previamente "bloqueados" por este sistema, los flagelados se conservan en el hemocele por lo menos 24 horas más, en relación a los testigos.

Todo hace dudar, pues, de la existencia de anticuerpos naturales del tipo de los que se obtendrían después de la inoculación de ciertos gérmenes (GLASER en 1918 (4), ZERNOFF en 1931 (9), STEINHAUS en 1949 (5) ). La hemaglutinina por nosotros encontrada en *P. megistus*, bien podría ser de naturaleza semejante a las aglutininas presentes en algunas semillas vegetales.

Lo anteriormente expuesto nos lleva a pensar que valdría la pena revisar las experiencias entre garrapatas de caballos (*A. cajennense*) y *T. equinum*,

presentando más atención a la posibilidad de desarrollo del tripanosoma en el artrópodo, ya que éste llena bastante bien las exigencias epidemiológicas de un invertebrado trasmisor del mal de caderas de los équidos.

### AGRADECIMIENTO

Queremos agradecer a los doctores Herman Lent y Julio Muniz las facilidades que nos brindaron en la realización de este trabajo.

### RESUMEN

Se demuestra la alta resistencia por parte de algunos triatóminos (*P. megistus*, *T. infestans*, *R. prolixus*) al *T. equinum* Vogues, 1901 cuando inoculado en su cavidad general y cuando ingerido por los hematófagos, quedando así descartada la posibilidad de evolución de este tripanosoma en los insectos estudiados.

Se reporta la manutención, por lo menos por una semana, del *T. equinum* en el hemocele de garrapatas del género *Amblyomma* y se juzga de interés el hacer nuevas tentativas con estos artrópodos, a fin de responsabilizar definitivamente a un invertebrado como transmisor natural del mal de caderas.

### SUMMARY

The high resistance is shown of some Triatominae (*P. megistus*, *T. infestans*, *R. prolixus*) to *Trypanosoma equinum* inoculated into the general cavity or ingested by the insects. The possibility of evolution of this organism in the insects studied is thus eliminated.

*Trypanosoma equinum* was maintained alive for at least one week in the hemocele of ticks of the genus *Amblyomma*; the importance of further experimentation with these arthropods is stressed, in order to locate finally the natural invertebrate transmitter of "mal de caderas" — equine trypanosomiasis.

The possibility is pointed out of using ticks of this genus as a means of sending *T. equinum* strains from one place to another, which at present is only done by means of infected susceptible mammals.

### BIBLIOGRAFIA

1. DÍAS, E.  
1932. O *Trypanosoma cruzi* pôde evoluir na cavidade geral do *Triatoma megista*. (Nota previa). *Mem. Inst. Osw. Cruz* 26(1):83-84.
2. DÍAS, E. & C. A. CAMPOS SEABRA  
1943. Sobre o *Trypanosoma conorrhini* hemoparasito do rato transmitido pelo *Triatoma rubrofasciata*. Presença do vector infestado na cidade do Rio de Janeiro. *Mem. Inst. Osw. Cruz* 39(3):301-329.

3. DEL PONTE, E.  
1921. Contribución al estudio del gén. *Triatoma* Lap. *Rev. Inst. Bact. B. Aires* 3(1):133-196.
4. GLASER, R. W.  
1918. On the existence of immunity principles in insects. *Psyche* 25 (3):39-46.
5. NEIVA, A.  
1913. Multiplicação na vinchuca ("*Triatoma infestans* Klug") do trypanosoma do mal de cadeiras. Separata *Brasil méd.* N° 34-3 pp.
6. STEINHAUS, E. A.  
1949. *Principles of Insect Pathology*. XI + 757 pp., 1° ed., McGraw Hill Book Co. New York.
7. TOUMANOFF, C.  
1949. Les maladies microbiennes et l'immunité naturelle chez les insectes. *Rev. Canad. Biol.* 8 (4):343-69.
8. ZELEDÓN, R.  
1954. Tripanosomiasis rangeli. *Rev. Biol. Trop.* 2(2):231-268.
9. ZERNOFF, V.  
1931. Les bactériolysines chez les insectes. *Ann. Inst. Past.* 46 (5):565-578.