

MICROSCOPIA ELECTRONICA DE BARRIDO EN EPIMASTIGOTAS DE CULTIVO DE TRYPANOSOMA CRUZI .*

Thais Flores de Durán**
Douglas Morales***

INTRODUCCION

La fina estructura del *Trypanosoma cruzi*, Chagas 1909, en varios estadios de desarrollo ha sido ampliamente investigada al microscopio electrónico de transmisión por diversos autores, entre los cuales podemos citar: Meyer y Poster (4), Meyer y col (5), Meyer y Queiroga (6), Sanabria (10-11-12-13), Milder y Deane (8), Inoki y col (1), Seed y col (14), Meyer y Souza (7); lo que ha permitido identificar en este parásito, una unidad de membrana de unos 80 a 100 Å de espesor, cubierta por una capa "peluda". Debajo de esta unidad de membrana se encuentra el periplasto con estriaciones longitudinales que corresponden a los microtúbulos, y el citoplasma contiene: el núcleo rodeado de una membrana (con poros), posee nucleolo y acúmulos de cromatina; mitocondrias,

* Trabajo realizado en la Unidad de Investigaciones Biológicas de la Facultad de Medicina de la Universidad del Zulia.

** Médico-Cirujano. Profesor Asistente de la Cátedra de Parasitología. Facultad de Medicina. Universidad del Zulia.

*** Lic. en Bioanálisis. Unidad de Investigaciones Biológicas. Facultad de Medicina. L.U.Z.

ribosoma, aparato de Golgi, vacuolas, retículo endoplásmico rugoso, cinetoplasto, cuerpo basal y el flagelo formado por 9 pares de fibras periféricas y un par central. El flagelo está adherido al cuerpo del parásito por medio de la membrana ondulante.

Estudios realizados al microscopio electrónico de transmisión por Milder y Deane (8), Sanabria (12), han logrado observar en las formas epimastigotas del *Trypanosoma cruzi* y *Trypanosoma conorhini* un citostoma, el cual se inicia como una prolongación del bolsillo flagelar en forma de embudo alargado, terminando en fondo de saco en el cuerpo del flagelado. Así mismo Preston (9), describe también un citostoma en las formas de cultivo del *Trypanosoma raiae*, el cual designó con el nombre de complejo citostoma - citofaringe.

Sin embargo, la técnica de secciones ultrafinas limita información detallada sobre la morfología externa de la membrana.

Investigaciones realizadas por Seed y col (14) en cultivo de *Trypanosoma cruzi*, examinados al microscopio electrónico de scanning o barrido y al microscopio electrónico de transmisión, utilizaron las técnicas Freeze etching y réplica de carbón. Con la técnica de Freeze etching observaron formas epimastigotas de superficie irregular, con depresiones que varían en tamaño y profundidad. Por debajo de la membrana limitante encontraron estriaciones microtubulares, el citoplasma contiene organelos e inclusiones de varios tipos tales como: el núcleo, cuya membrana nuclear presenta poros prominentes y su cromatina no se distingue; mitocondrias, cinetoplasto y el flagelo, el cual se encuentra unido al cuerpo del parásito por la membrana ondulante que se muestra estrecha. Porciones del paquete flagelar forman varillas y tienen la apariencia de un collar de varillas. La fractura de la unidad de membrana flagelar se observó más lisa, debido a la falta de 7 nM de partículas, en relación a la fractura de la membrana citoplasmática que se vio rugosa por la presencia de dichas partículas.

La técnica de réplica de carbón utilizada en ese estudio revela la forma trypomastigota y epimastigota con superficie irregular, especialmente la epimastigota la cual muestra además numerosas depresiones pronunciadas y algunas áreas elevadas en su superficie. Observaron además flagelo libre y membrana ondulante más extendida en la célula trypomastigota.

En secciones finas transversales de formas epimastigotas, observaron la unidad de membrana protruidas por los microtúbulos subpeliculares y de este modo causan las estriaciones visibles. En el citoplasma se observó:

núcleo con poros nucleares, mitocondrias, cinetoplasto, cuerpo basal y flagelo libre.

Las imágenes al microscopio electrónico de scanning o de barrido, muestran las formas trypomastigotas frecuentemente en forma de "C", aplanadas con superficie irregular y el flagelo unido al cuerpo del parásito por una ancha membrana ondulante; además se observó el cinetoplasto como una protuberancia prominente en la región posterior, el cuerpo basal más pequeño anterior al cinetoplasto y el núcleo en el tercio medio del cuerpo.

En cuanto a la forma epimastigota se describe redondeada y no se visualizan estructuras internas, la parte anterior delgada con flagelo libre corto y la parte posterior más redonda. Se encontraron formas epimastigotas en proceso de división binaria.

Kongtong e Inoki (3) observaron al microscopio electrónico de scanning, formas epimastigotas obtenidas de cultivo difásico y trypomastigotas de la sangre y del fluido peritoneal de ratones infectados, así como también de cultivo de células HELA infectadas; estos autores clasificaron las células epimastigotas en formas delgadas y anchas.

La forma delgada con extremo posterior fino, membrana ondulante corta y flagelos libres, microtúbulos subpeliculares, cinetoplasto poco prominente y anterior al núcleo; la forma ancha se presentó corta con extremo posterior más obtuso. También se describen formas en división.

En trypomastigota también distinguieron formas: delgadas y anchas, éstas últimas de unas 15 micras de longitud encurvadas, con un cinetoplasto prominente cerca del extremo posterior, microtúbulos subpeliculares, membrana ondulante en espiral a lo largo del cuerpo y un largo flagelo libre.

Las formas delgadas presentaron características similares a las formas anchas, excepto en el tamaño (20 micras de longitud) y su cuerpo que es más delgado.

Todas estas técnicas aportan información adicional para evaluar la ultraestructura de la superficie del parásito.

El presente trabajo tiene por objeto realizar un estudio al microscopio electrónico de barrido de la morfología superficial en formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* en medio de cultivo difásico.

MATERIAL Y METODO

La cepa de *Trypanosoma cruzi* utilizada en este estudio fue suministrada por la Cátedra de Parasitología de la Facultad de Medicina de la Universidad Centro Occidental, Barquisimeto-Venezuela, aislada en medio de cultivo difásico N.N.N. (Novy, Neal y Nicole) de 45 días de sembrado.

El sobrenadante del cultivo se centrifugó a 2.400 r.p.m., durante 15 minutos a 4°C. El sedimento obtenido se lavó tres veces con buffer fosfato glucosalino, centrifugado a 2.000 r.p.m., durante 5 minutos a la misma temperatura y fijado en una solución de glutaraldehído al 4% en buffer cacodilato 0.1 molar, pH 7.4 a 4°C durante 17 horas. Posteriormente se centrifugó a 3.000 r.p.m., por 10 minutos a igual temperatura, se descartó el sobrenadante, y gotas del sedimento resuspendido se montaron en membranas Millipore tipo G.S., con poros de 0.22 micras de diámetros, las cuales se introdujeron en aparato para filtración Millipore, donde se lavaron varias veces con buffer cacodilato 0.1 molar, pH 7.4; deshidratadas en concentraciones crecientes de etanol, secadas con el método de secado de punto crítico con CO₂ líquido. Finalmente las membranas se montaron en portaobjetos de cobre con pasta electroconductora, se cubrieron con un baño metálico de oro-paladium en máquina evaporadora de alto vacío y se observaron al microscopio electrónico Jeol 100B con aditamento para microscopio electrónico de barrido E.M-ASID a 20 Kv., obteniéndose las micrografías electrónicas para su estudio.

RESULTADOS

Las imágenes al microscopio electrónico de barrido del *Trypanosoma cruzi* en medio de cultivo difásico, muestran un predominio de formas epimastigotas, las cuales exhibieron un cuerpo fusiforme, existiendo dos tipos: uno delgado y otro más ensanchado, encontrándose predominio de éstas últimas. (Figs. 1 y 2). El tamaño de estas formas epimastigotas osciló entre 9-18 micras.

Las formas epimastigotas presentaron el extremo posterior afilado y el extremo anterior redondeado, el cual se adelgaza en el sitio de emergencia del flagelo libre. (Fig. 1). Este flagelo se observó relativamente largo y presentó una hendidura a lo largo de su eje longitudinal. (Figs. 1-3-8).

El flagelado presentó aspecto arrollado sobre su eje longitudinal, mostrando el relieve correspondiente de los microtúbulos subpeliculares que

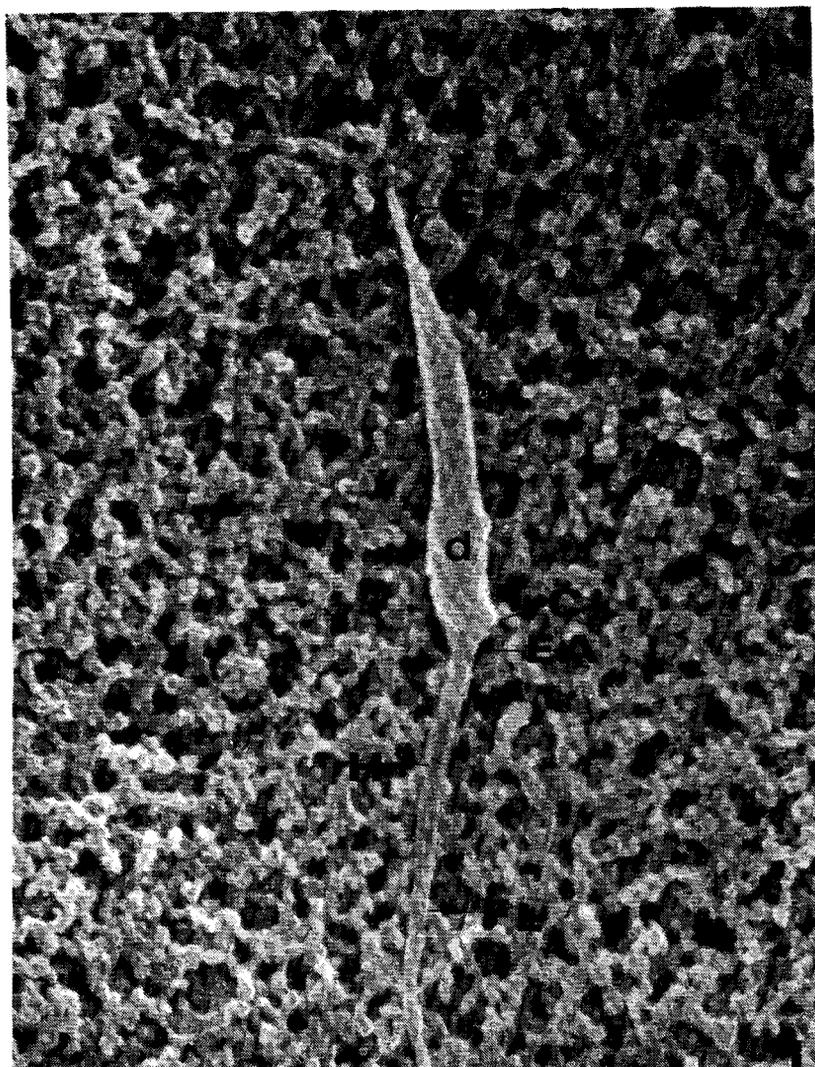


Fig. 1. Epimastigota. Forma delgada (d) con cuerpo fusiforme. Extremo anterior (E.A.), con flagelo libre (F.L) donde se observa una hendidura a lo largo de su eje longitudinal (H) Cinetoplasto poco prominente (Ci). Extremo posterior afilado (E.P). x 3.750.

corren paralelos. (Fig.2), adquiriendo la forma epimastigota un aspecto helicoidal.

En la superficie de aspecto irregular se visualizaron una serie de depresiones profundas, variando en forma y tamaño que semejan orificios. (Fig. 3), igualmente a mayor magnificación en algunas formas se observó una abertura ovalada de 0.2 a 0.3 micras, que presumiblemente corresponda al citostoma. (Fig. 4).

El cinetoplasto se aprecia como una estructura poco prominente situada cerca de la unión cuerpo-flagelo libre. (Figs. 1-2-5). La membrana ondulante se observó ocasionalmente, presentándose como una estructura laminar corta y retraída sobre si misma. (Fig. 6).

Se observaron algunas formas parasitarias en proceso de división binaria. (Figs. 7-8-9). El primer paso lo constituye la aparición de un nuevo flagelo libre desarrollado paralelamente al flagelo original, ambos se arrollan en espiral. (Fig. 7). Posteriormente se inicia la división del cuerpo celular a partir del extremo anterior, notándose una separación gradual de los cuerpos celulares. (Figs. 7-8), hasta culminar en el extremo posterior en dos células hijas. (Fig. 9). El flagelo de estas células hijas también muestran la hendidura extendida a lo largo de su eje longitudinal. (Figs. 7-8).

DISCUSION

En la literatura a nuestro alcance, son pocas las investigaciones realizadas al microscopio electrónico de barrido sobre la naturaleza de la superficie del *Trypanosoma cruzi* y de sus formas evolutivas.

No ha sido mostrada en forma clara la estructura externa de este flagelado, probablemente debido a las dificultades técnicas en el procesamiento de la muestra.

Kongtong e Inoki (2-3) y Seed y col (14) en sus cultivos mostraron que el 99% aproximadamente de los parásitos correspondían a formas epimastigotas y su transición a trypomastigotas fue rara. También observaron formas epimastigotas anchas y delgadas, predominando éstas últimas.

En nuestra experiencia en cultivo, se observó que hay predominio de las formas epimastigotas e igualmente apreciamos diferencias en el grosor, pero con ligero predominio en las formas anchas.

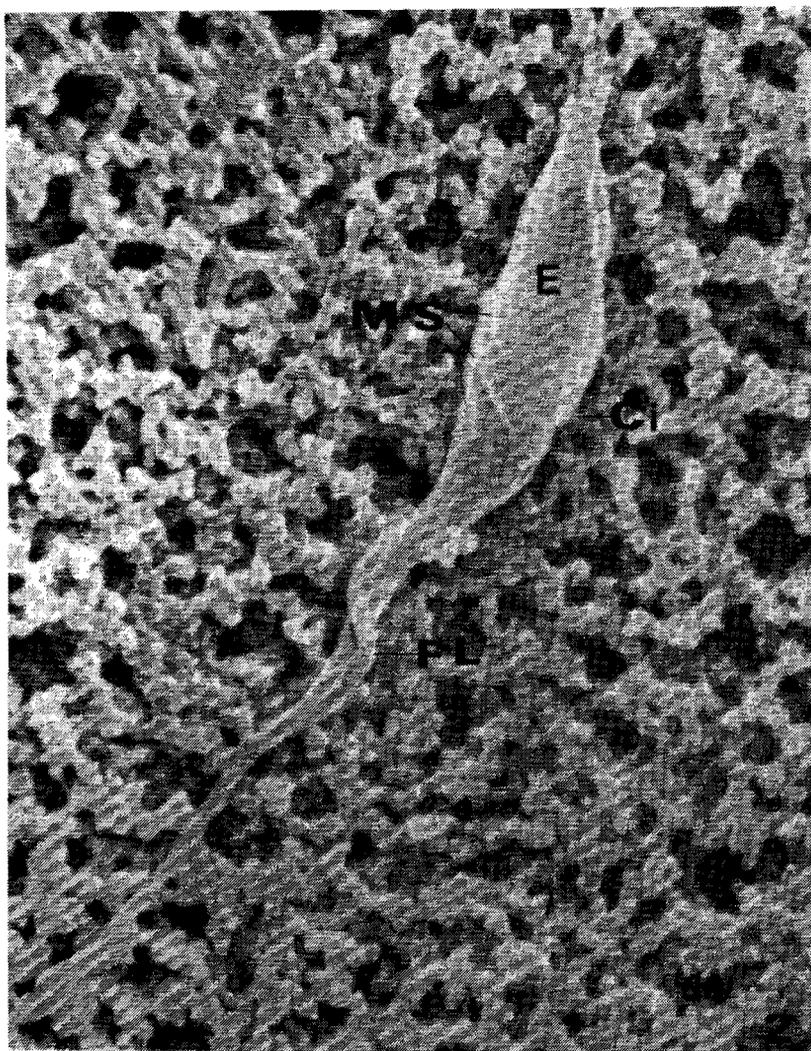


Fig. 2. Epimastigota. Forma ensanchada (E), se observa arrollada sobre su eje longitudinal mostrando el relieve correspondiente de los microtúbulos subpelliculares (M.S.). El cinetoplasto se aprecia poco prominente (Ci). Nótese los flagelos fibres arrollados en espiral (F.L.). x 6.250.

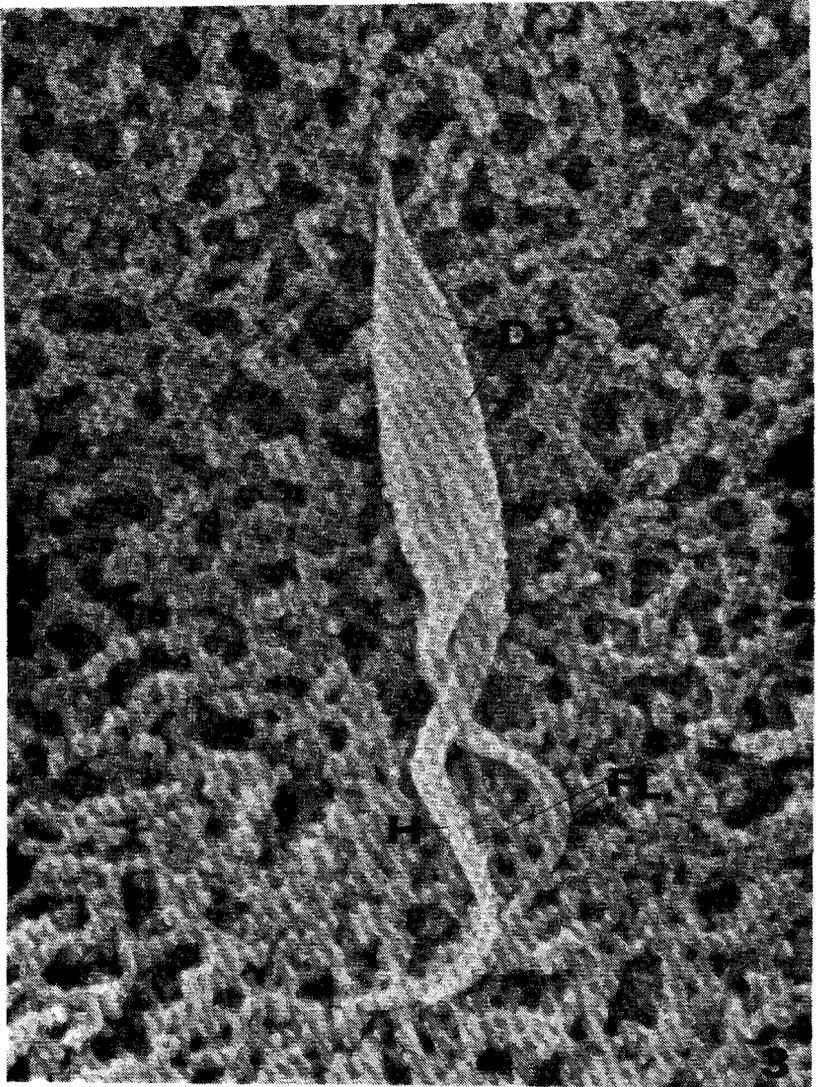


Fig. 3. Epimastigota con superficie irregular, se observan en su superficie depresiones profundas (D.P) y el doble flagelo libre (F.L), con una hendidura a lo largo de su eje longitudinal. (H). x 5.000.

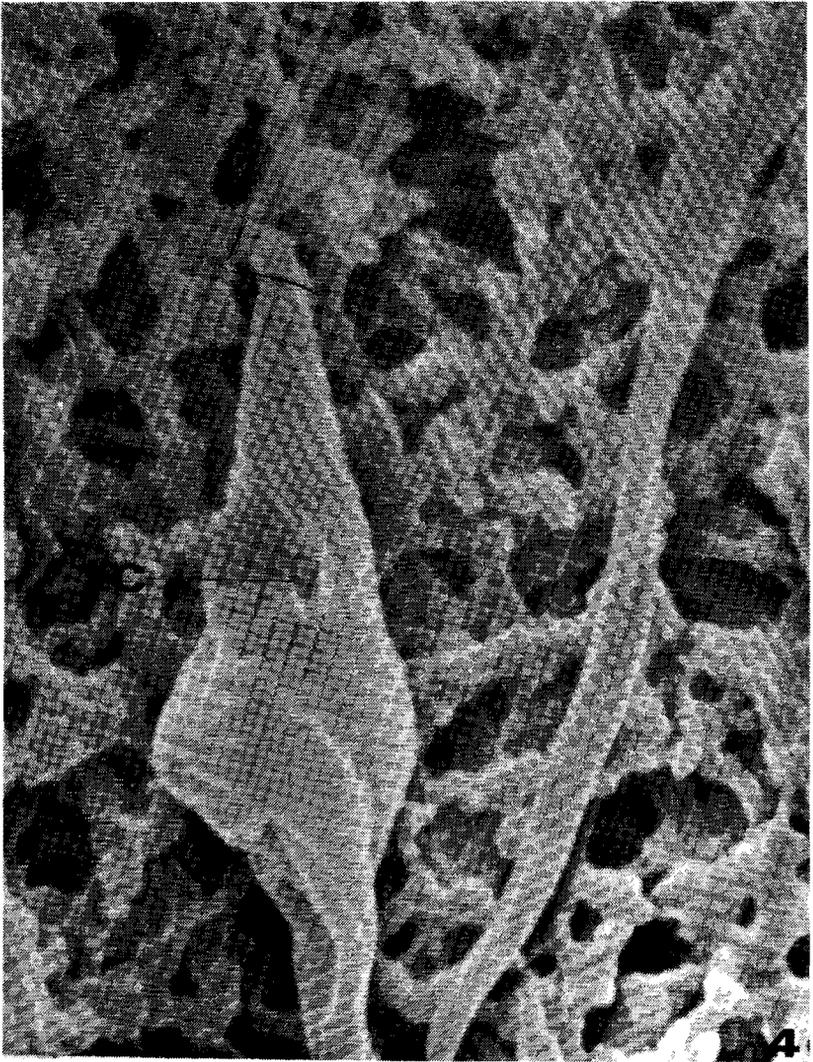


Fig. 4. Epimastigota. Se observa una depresión ovalada en el cuerpo celular que probablemente corresponde al citostoma (C) x 12.500.

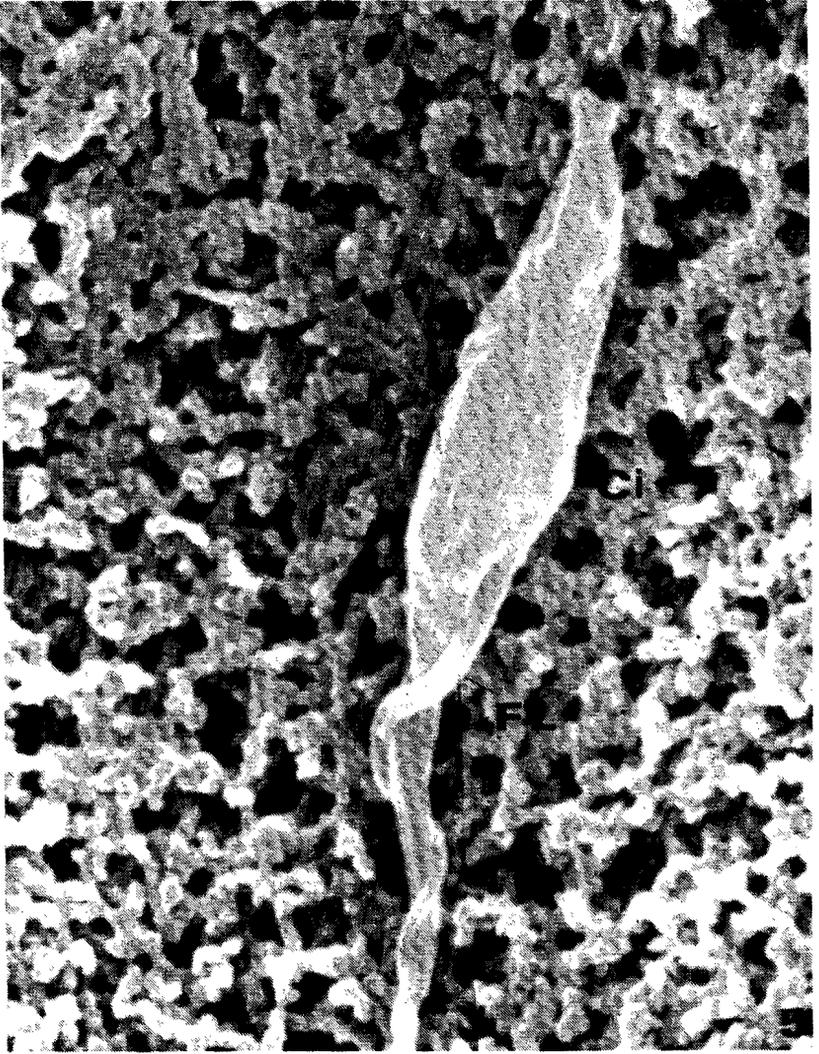
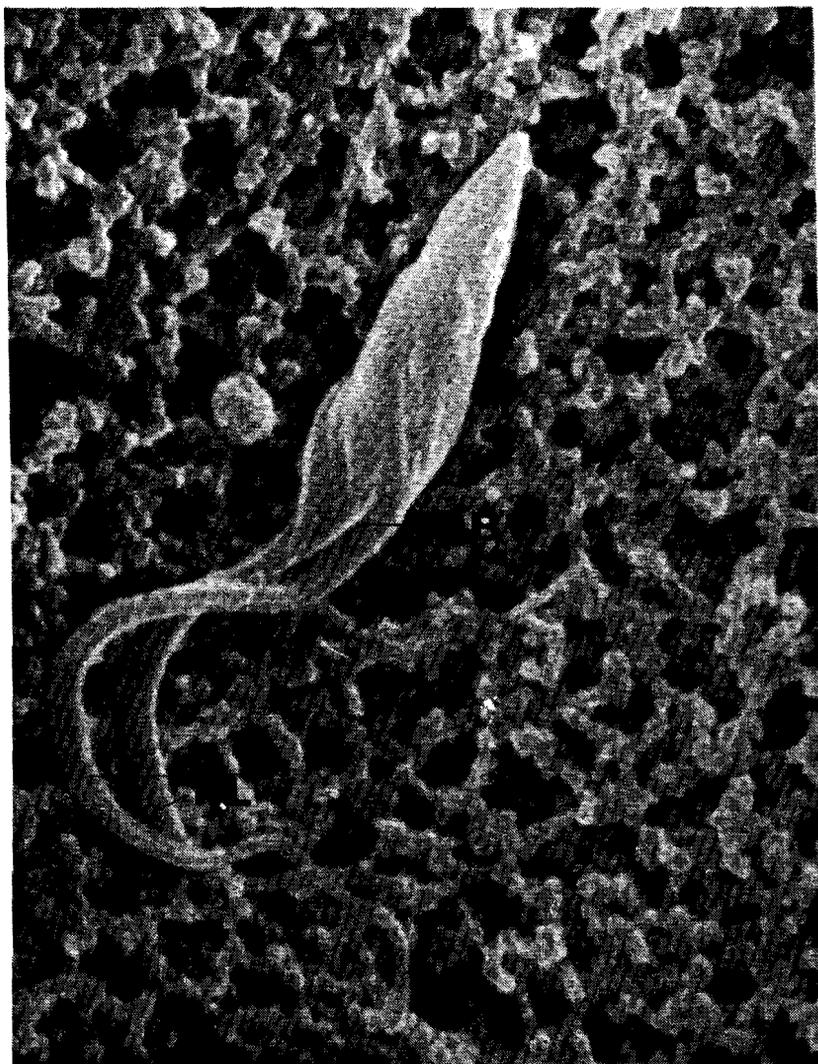


Fig. 5. Epimastigota. Se observa el cinetoplasto poco prominente (Ci). Flagelos libres arrollados en espiral (F.L.) x 6.250.



Fig. 6. Epimastigota. Mostrando la membrana ondulante laminar, corta (M.O). Se observa doble flagelo libre (F.L.) x 6.250



Figs. 7-8-9. Epimastigotas. En proceso de división binaria. En la Fig. 7 nótese la aparición de un nuevo flagelo libre (F.L.) y el inicio de la fisión del cuerpo celular (D.B), la cual continúa progresando en sentido anteroposterior (D.B) Fig. 8, hasta culminar en el extremo posterior (T.D.B.) en dos células hijas (C.H.). Fig. 9 En la Figs. 7-8 se observa una hendidura (H) a lo largo del eje longitudinal del flagelo libre. Figs. 7-8 x 6.250 Fig. 9 x 3.750.

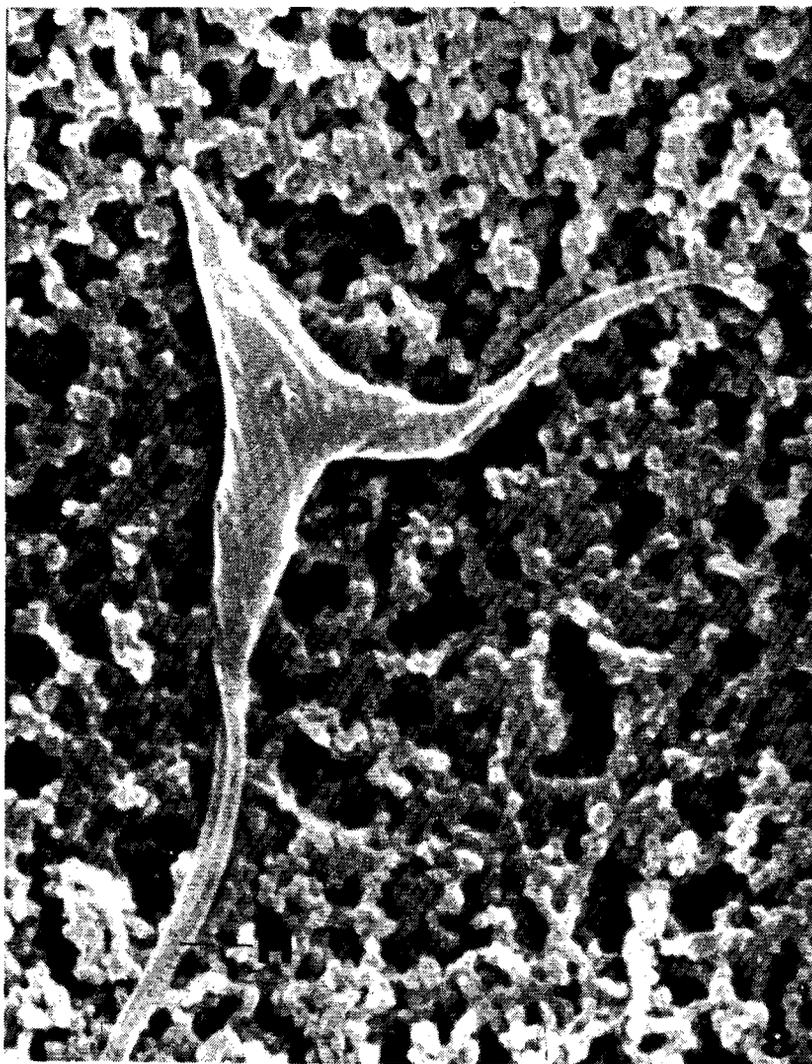


Fig. 8

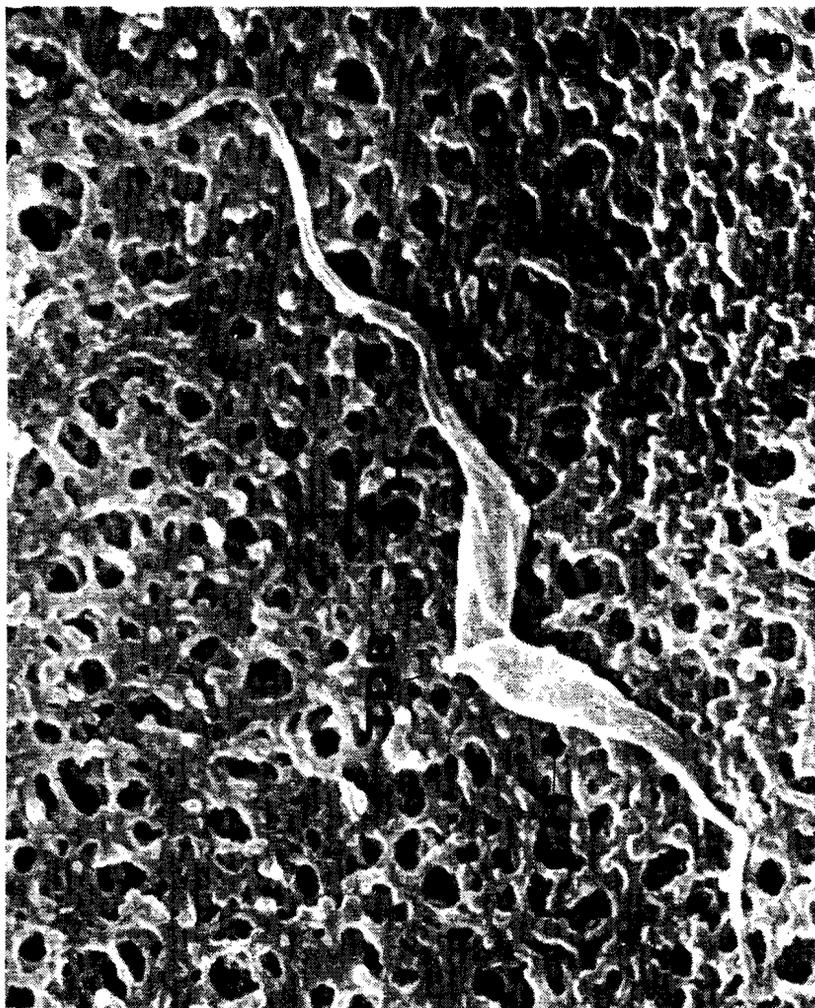


Fig. 9

En nuestras observaciones se encontraron formas epimastigotas fusiformes con el extremo posterior afilado y el anterior redondeado, adelgazándose en el sitio de emergencia del flagelo libre. Similares observaciones han hecho Kongtong e Inoki (3) y Seed y col (14) en sus estudios al microscopio electrónico scanning.

El aspecto general de la célula epimastigota del *Trypanosoma cruzi* en nuestro estudio, se encontró arrollada sobre su eje longitudinal, mostrando el relieve de los microtúbulos subpeliculares, los cuales presentaron una disposición paralela con un arreglo helicoidal; esta disposición de los microtúbulos también fue descrita por Kongtong e Inoki (3).

Con la técnica de fractura por congelación (Freeze-etching) y en secciones finas (14), se han reportado también estriaciones microtubulares paralelas localizadas en la superficie interna, de la membrana limitante de la célula epimastigota que protruyen en la membrana y de este modo causan las estriaciones visibles.

Investigaciones realizadas al microscopio electrónico de transmisión por Meyer y Postel (4), Meyer y col (5), Sanabria (12), Meyer y Souza (7), han reportado en las formas evolutivas del *Trypanosoma cruzi*, microtúbulos subpeliculares como estriaciones finas situadas por debajo de la membrana celular.

Milder y Deane (8), en sus hallazgos en cultivo de formas epimastigotas del *Trypanosoma cruzi*, describen microtúbulos subpeliculares por debajo de la membrana celular y rodeando paralelamente todo el trayecto del tubo citostomal, mientras que Inoki y col (1), encontraron microtúbulos conectando el flagelo y el cinetoplasto.

Un aspecto importante que pudimos notar fue, que la forma epimastigota presentó una superficie irregular, con depresiones profundas que varían en tamaño y profundidad las cuales semejan orificios. Estos hallazgos también fueron descritos por Seed y col (14) al microscopio electrónico de scanning y con las técnicas de réplica de carbón y fractura por congelación.

En nuestra investigación se observó en algunas imágenes, una abertura ovalada en el cuerpo del flagelado que nos hace suponer se trate de un citostoma, ampliamente descrito al microscopio electrónico de transmisión por Milder y Deane (8) y Sanabria (12), para las células epimastigotas del

Trypanosoma cruzi. Así también Preston (9), estudiando formas de cultivo de *Trypanosoma raiae*, describe un citostoma a nivel del bolsillo flagelar y que designa con el nombre de complejo citostoma-citofaringe.

En relación al cinetoplasto, se observó situado cerca de la unión cuerpo-flagelo libre, como una estructura poco prominente, lo cual es análogo a la descripción de Kongtong e Inoki (3), para las formas epimastigotas del *Trypanosoma cruzi*. Para Seed y col (14), su poca visualización se debe a la forma redondeada de ese flagelado.

Notamos que la membrana ondulante se observó de forma laminar, corta y poco visible en la mayoría de las micrografías, similar a lo reportado por otros autores (3-14). En preparaciones para fractura por congelación y réplica de carbón (14), también se ha descrito la membrana ondulante como una estructura estrecha y corta para la forma epimastigota.

Se ha demostrado que con el microscopio de luz se aprecia la forma epimastigota del *Trypanosoma cruzi*, con el cuerpo alargado, cinetoplasto o blefaroplasto anterior al núcleo, membrana ondulante corta y flagelo libre; pero no es posible observar otras características morfológicas, así como tampoco la separación del corpúsculo basal y el blefaroplasto.

Nosotros logramos observar la secuencia en el proceso de la división binaria, la cual involucra el crecimiento de un nuevo flagelo libre, que corre en la misma dirección del flagelo original, encontrándose en casi todas las micrografías arrollados en espiral. Posteriormente sigue la fisión binaria anteroposterior del cuerpo celular, finalizando en dos células hijas. Este proceso de división también fue señalado en algunas de sus fases por Kongtong e Inoki (3) y Seed y col (14) en sus investigaciones al microscopio electrónico de scanning.

En nuestro estudio observamos en el flagelo de estas células epimastigotas la presencia de una hendidura extendida a lo largo de su eje longitudinal, no descrita por otros autores y cuya naturaleza no sabemos precisar.

CONCLUSIONES

1.- El microscopio electrónico de barrido es de gran utilidad para conseguir información acerca de la morfología superficial de las formas epimastigotas del *Trypanosoma cruzi*.

2.- Esta técnica le permite al investigador observar toda la superficie del *Trypanosoma cruzi*.

3.- El microscopio electrónico de barrido permite observar la secuencia del proceso de la división binaria de dicha forma evolutiva.

4.- Es recomendable la combinación de varias técnicas de estudio, para obtener una mayor información sobre la organización y estructuras de las membranas celulares, así como también de sus componentes celulares.

5.- Para una mejor comprensión de la relación huésped-parásito de la enfermedad de Chagas, se recomienda el estudio detallado de la membrana externa de *Trypanosoma cruzi*.

6.- El microscopio electrónico de barrido tiene el inconveniente de que necesita personal especializado para la utilización del mismo.

RESUMEN

Se describe la morfología superficial de formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*, cultivado en medio difásico N.N.N. (Novy, Neal y Nicole), utilizando el microscopio electrónico de barrido.

Se observaron formas epimastigotas con cuerpo fusiforme de 9- 18 micras de longitud, con el extremo posterior afilado y el extremo anterior redondeado, adelgazándose en el sitio de emergencia del flagelo libre, el cual presentó una hendidura a lo largo de su eje longitudinal.

La superficie del cuerpo, de aspecto irregular presentó una serie de depresiones profundas, así como también una abertura ovalada de 0.2 a 0.3 micras la cual probablemente se trate de un citostoma. Se encontraron formas epimastigotas arrolladas sobre su eje longitudinal, mostrando el relieve correspondiente de los microtúbulos subpeliculares.

El cinetoplasto se observó poco prominente, la membrana ondulada se aprecia como una estructura laminar y corta. En relación al proceso de división binaria, observamos la aparición de un nuevo flagelo que se arrolla en espiral con el ya existente; posteriormente se aprecia la fisión binaria anteroposterior del cuerpo celular de la forma epimastigota, dando origen a dos células hijas. El flagelo de estas células hijas muestra una hendidura extendida a lo largo de su eje longitudinal.

AGRADECIMIENTO

Deseo expresar mi agradecimiento al doctor Orlando Castejón, Director de la Unidad de Investigaciones Biológicas, al personal de investigadores y técnicos de dicha Unidad, por la amplia colaboración prestada en la realización de este trabajo.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. INOKI, S; Ozeki, Y; and Kambara, H. Ultrastructural changes in the kinetoplast of *Trypanosoma cruzi* during transition of form in vitro. *Biken Journal*, vol 14, 37-50, 1971.
2. KONGTONG, P.; and Inoki, S. Scanning electron microscopic studies on penetration of *Trypanosoma cruzi* into fibroblast cells. *Jap. J. Parasit*, vol. 24, No. 5, 284-293, 1975.
3. KONGTONG, P. and Inoki, S. Epimastigotes and Trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* revealed by scanning electron microscopy. *Biken Journal*, vol 18. 163-169, 1975.
4. MEYER, H; Poster, K. A study of *Trypanosoma cruzi* with the electron microscope. *Parasit* 44, 16-23, 1954.
5. MEYER, H; Oliveira, M; & Mendonca, I. Electron microscopic study of *Trypanosoma cruzi* in thin sections of infected tissue cultures and of blood-agar forms. *Parasitology* 48 (1-2). 1-8, 1958.
6. MEYER, H and Queiroga L.T. Submicroscopical aspects of *Schizotrypanum cruzi* in thin sections of tissue culture forms. *J. Protozool.* 7: 124-127, 1960.
7. MEYER, H, and De Souza, W. Electron microscopic study of *Trypanosoma cruzi* periplast in tissue cultures. I. Number and arrangement of the peripheral microtubules in the various forms of the parasites life cycle. *J. Protozool* 23 (3): 385-390, 1976.
8. MILDNER, R. and Deane, M. The cytostome of *Trypanosoma cruzi* and *T. canabrensi*. *J. Protozool.* 16 (4): 730-737, 1969.
9. PRESTON, T.M. The form and function of the cytostome-cytopharynx of the culture forms of the Elasmobranch haemoflagellate *Trypanosoma raiae* Loveran & Mesnil. *J. Protozool.* 16: 320-333, 1969.
10. SANABRIA, A. Ultraestructura del *Trypanosoma cruzi* en el miocardio del ratón. Parte I: Estadio *Trypanosoma*. *Acta científ. venezolana.* 16 (5): 163-173, 1965.
11. SANABRIA, A. y Aristimuño, J. Nuevas investigaciones acerca de la ultraestructura e histoquímica del *Trypanosoma cruzi* en el cerebro del ratón. *Acta Cient. Venezolana* 20: 32-39, 1969.
12. SANABRIA, A. Nuevos estudios acerca de la ultraestructura del *Trypanosoma cruzi* en el miocardio del ratón. *Acta cient. Venezolana* 21: 107-118, 1970.

13. SANABRIA, A. Ultrastructure of *Trypanosoma cruzi* in mouse liver. *Experimental Parasitology*. 30, 187-198, 1971.
14. SEED, T.M.; Kreier, J.P.; Al-Abbassy, S.N.; Pfister, R.M. *Trypanosoma cruzi*: The ultrastructure of culture forms as examined by carbon replication, Freeze-etching and scanning electron microscopy *Z. Tropenmed. Parasit.* 24:146-160, 1973.