

# Pleomorfismos en cepas de *Trypanosoma rangeli* aisladas de *Rhodnius colombiensis* y *R. pallelescens*

SUÁREZ Q., YAZMÍN<sup>1</sup>, CARRANZA, JULIO C.<sup>1</sup>, CLAVIJO, JAIRO A.<sup>2</sup>,  
 TRIANA, OMAR<sup>3</sup> y VALLEJO, GUSTAVO A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratorio de Investigaciones en Parasitología Tropical, Facultad de Ciencias, Universidad del Tolima, Ibagué, Tolima.

<sup>2</sup> Departamento de Matemáticas y Estadística, Facultad de Ciencias, Universidad del Tolima, Ibagué, Tolima.

<sup>3</sup> Grupo de Chagas, Instituto de Biología, Universidad de Antioquia.

## Resumen

*Trypanosoma rangeli* infecta gran variedad de mamíferos silvestres y domésticos, incluyendo al hombre. En varios países latinoamericanos se han descrito recientemente dos subpoblaciones denominadas KP1(+) y KP1(-), cuya caracterización biológica y molecular es objeto de investigación. Para evaluar la variabilidad biológica en la subpoblación KP1(-) se inocularon ratones ICR con epimastigotes de cultivo de cuatro cepas aisladas de *Rhodnius pallelescens* y *R. colombiensis*. Se prepararon extendidos de sangre, se colorearon con Giemsa al tercer, quinto y séptimo día pos-inoculación, a partir de los cuales se dibujaron en cámara clara 29 parásitos de cada cepa y para cada día; de esa manera se efectuaron mediciones de los siguientes parámetros morfológicos: longitud total (L), longitud del flagelo libre (F), distancia del extremo posterior al cinetoplasto (PK), distancia del núcleo al cinetoplasto (KN), distancia del extremo posterior al núcleo (PN), distancia del extremo anterior al núcleo (NA), índice nuclear (IN) e índice del cinetoplasto (IK). El análisis de las cepas aisladas de los vectores mostró dos grupos morfológicamente diferentes: un grupo conformado por las cepas aisladas de *R. pallelescens* y otro conformado por las cepas aisladas de *R. colombiensis*. La evaluación de la longitud total y la longitud del flagelo durante los días 3, 5 y 7 pos-inoculación constituye una evidencia más de la alta variabilidad existente entre las cepas de *T. rangeli* aisladas de *R. pallelescens* y *R. colombiensis*, pues se demostró que los perfiles de estas variables no son paralelos ni coincidentes. Estos estudios de variabilidad morfológica tienen importancia para el diagnóstico y la determinación taxonómica de las poblaciones de *T. rangeli*.

**Palabras clave:** *Trypanosoma rangeli*, pleomorfismo, variabilidad intraespecífica, vectores.

## Abstract

*Trypanosoma rangeli* infects a variety of sylvatic and domestic mammals including man. In several Latin-American countries, two populations denoted as KP1(+) and KP1(-) have been described recently, and their biological and molecular characterization is being investigated. To evaluate the biological variability of KP1(-) subpopulation, ICR mice were

Correos electrónicos: suarezquevedojazmin@gmail.com - gvallejo@ut.edu.co

inoculated with cultured epimastigotes from 4 strains isolated from *Rhodnius pallelescens* and *R. colombiensis*. Blood smears were prepared and stained with Giemsa in the third, fifth and seventh days post-inoculation, and 29 parasites of each strain were drawing with a lucid chamber to obtain measures of the following morphological parameters: total length (L), free flagella length (F), distance from posterior end to kinetoplast (PK), distance from nucleus to kinetoplast (KN), distance from anterior end to nucleus (NA), nuclear index (IN) and kinetoplast index (IK). The analysis of the strains isolated from the vectors show two different morphometric groups: a group conformed by the strains isolated from *R. pallelescens* and another group conformed by strains isolated from *R. colombiensis*. The evaluation of the total length and the free flagella length during 3, 5 and 7 post-inoculation days is a evidence of the high variability between strains of *T. rangeli* isolated from *R. pallelescens* and *R. colombiensis*, because it was demonstrated that the profiles of these variables were no parallel and no coincident. The studies on morphologic variability are important in the diagnostic and taxonomic determination of populations of *T. rangeli*.

**Keywords:** *Trypanosoma rangeli*, pleomorphism, intraspecific variability, vectors.

## 1. INTRODUCCIÓN

*Trypanosoma rangeli* es la segunda especie de tripanosoma que con frecuencia infecta al hombre en Colombia y en varios países latinoamericanos (Vallejo *et al.*, 1988). La forma sanguínea de *T. rangeli* es delgada y mide de 26 a 34  $\mu$ m de longitud, posee un cinetoplasto pequeño redondo y subterminal, el núcleo se ubica en la mitad del cuerpo y la membrana ondulante está bien desarrollada (Hoare, 1972). Varios estudios utilizando parámetros biológicos, bioquímicos y moleculares han demostrado polimorfismos entre cepas de *T. rangeli* aisladas a partir de diferentes vectores triatomínicos y hospederos vertebrados en distintas regiones geográficas (D'Alessandro, 1976; Macedo *et al.*, 1993; Steindel *et al.*, 1994; Grisard *et al.*, 1999).

Aunque las especies de género *Rhodnius* son consideradas como los principales vectores biológicos de *T. rangeli*, el ciclo extraintestinal del parásito representa un fenómeno inconsistente. La invasión de la hemolinfa y las glándulas salivares acompañada de la producción de metatripomastigotes se presenta solamente en cepas que tienen una estrecha relación con su vector local (D'Alessandro, 1976; Machado *et al.*, 2001).

Los marcadores mitocondriales y nucleares muestran una clara división de *T. rangeli* en dos grandes grupos filogenéticos (KP1+ y KP1-), asociados con vectores específicos en Colombia y otros países de Latinoamérica (Vallejo *et al.*, 2002, 2004). Estudios morfológicos de tripomastigotes sanguíneos de *T. rangeli* han sido realizados durante el curso de infecciones naturales en humanos y en animales domésticos. De igual manera, las infecciones experimentales también han sido estudiadas (Grewal, 1969; Añez, 1981) y se han reportado cambios morfológicos progresivos en los parásitos durante la infección.

Urdaneta y Tejero (1992), al estudiar la influencia de la edad del hospedero y la ruta de inoculación sobre el curso del pleomorfismo en *T. rangeli*, encontraron cuatro tipos de

tripomastigotes sanguíneos morfológica y biométricamente diferenciables. El estudio del desarrollo de *T. rangeli*, tanto en su hospedero invertebrado como vertebrado, constituye una herramienta eficaz en el esclarecimiento de diversos aspectos relacionados con la dinámica epidemiológica en su medio natural, lo cual contribuye a aclarar la posición taxonómica de las diferentes subpoblaciones del parásito. Esta investigación tiene como propósito evaluar la morfología y el desarrollo de la subpoblación KPI (-) de *T. rangeli* en el hospedero vertebrado (*Mus musculus*) a partir de cepas aisladas de los vectores *R. colombiensis* y *R. pallescens*.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 Parásitos

Las cepas de *T. rangeli*, los vectores de los cuales fueron aisladas y el origen geográfico aparecen en la tabla 1. Los epimastigotes de cultivo fueron mantenidos a 28 °C en medio bifásico conformado por NNN (Novy, Mac Neal, Nicolle) en la fase sólida y LIT (Liver Infusion Triptose) enriquecido con el 10% de suero fetal bovino como fase líquida. Los parásitos se repicaron cada 8 días.

**Tabla 1.** Cepas de *T. rangeli* utilizadas en el presente estudio.

| Cepa   | Vector                       | Origen Geográfico/Ecotopo |
|--------|------------------------------|---------------------------|
| P53    | <i>Rhodnius colombiensis</i> | Tolima-Colombia/Silvestre |
| 2715   | <i>Rhodnius colombiensis</i> | Tolima-Colombia/Silvestre |
| GAL 47 | <i>Rhodnius pallescens</i>   | Sucre-Colombia/Silvestre  |
| GMLLC  | <i>Rhodnius pallescens</i>   | Sucre-Colombia/Silvestre  |

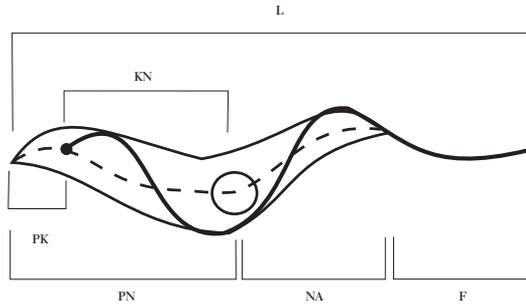
### 2.2 Inoculación de ratones ICR

Los parásitos en fase logarítmica de crecimiento se lavaron por centrifugación y se contaron en cámara de Neubauer. Ratones machos de  $20 \pm 3$  gramos fueron inoculados intraperitonealmente con  $200 \times 10^6$  parásitos de cada una de las cepas. A partir del tercero, quinto y séptimo día pos-inoculación se prepararon placas coloreadas con Giemsa.

### 2.3 Análisis morfológico

Los tripomastigotes detectados en las placas coloreadas se dibujaron con la ayuda de una cámara lúcida. Se seleccionó un total de 29 parásitos por placa y por día, con extremos anterior y posterior bien definidos, núcleos, cinetoplastos y flagelos claramente diferenciables. Se aplicó la metodología propuesta por Hoare (1972), para lo cual los parásitos dibujados con cámara lúcida se ampliaron a través de un proyector de acetatos y se

midieron utilizando un curvímeter. Se utilizó un micrómetro de platina como referencia para efectuar las mediciones. Para llevar a cabo la medición de cada tripanosoma, se trazó una línea a través de la mitad del cuerpo, desde la punta del flagelo hasta el extremo anterior. Esta línea fue recorrida por el curvímeter, y su medición indicó la longitud total de parásito que posteriormente se expresó en micrómetros. La longitud del flagelo y las distancias entre los organelos y los extremos posterior y anterior se calcularon de la misma manera. Para cada tripanosoma se establecieron las mediciones señaladas en la figura 1.



**Figura 1.** Parámetros morfométricos empleados en la diferenciación de formas sanguíneas de *T. rangeli* KP1 (-). L: Longitud total; PK: Distancia del extremo posterior al cinetoplasto; KN: Distancia entre el cinetoplasto y el núcleo; PN: Distancia del extremo posterior al núcleo; NA: Distancia del núcleo al extremo anterior; F: Longitud del flagelo; IN: Índice nuclear (PN/NA); IK: Índice del cinetoplasto (PN/KN).

## 2.4 Análisis estadístico

Se efectuó análisis de varianza multivariado Anova/Manova para estimar las diferencias en las medias de los parámetros morfométricos de cada una de las cepas estudiadas. También se realizó un análisis de perfiles para evaluar la tendencia de los parámetros a lo largo del tiempo.

## 3. RESULTADOS

### 3.1 Comparación de parámetros morfométricos de los tripomastigotes sanguíneos obtenidos al tercer día pos-inoculación

Los valores promedio para cada una de las variables evaluadas en los tripomastigotes sanguíneos obtenidos al tercer día pos-inoculación en ratones ICR aparecen registrados en la tabla 2.

Las longitudes promedio de las cepas aisladas revelaron una alta heterogeneidad, ya que se encontró un amplio rango de variación entre las mismas, con valores que van desde 30,94  $\mu\text{m}$  hasta 43,65  $\mu\text{m}$ . Los tamaños del flagelo de las cepas pertenecientes a este

grupo fueron variables, y en algunos casos guardan relación con la longitud del cuerpo del parásito.

**Tabla 2.** Valores promedio de diferentes parámetros morfométricos evaluados a los tripomastigotes sanguíneos de las cepas GAL 47, GMLLC, 2715 y P53 al tercer día pos-inoculación ( $n=29$ ).

| Cepa   |    | PK    | KN   | PN    | NA    | F     | L     | IN   | IK   |
|--------|----|-------|------|-------|-------|-------|-------|------|------|
| GAL 47 | X  | 9,75  | 6,21 | 15,96 | 13,40 | 13,84 | 43,20 | 1,22 | 2,70 |
|        | SD | 2,20  | 1,39 | 2,26  | 2,37  | 3,93  | 5,75  | 0,25 | 0,78 |
| GMLLC  | X  | 12,61 | 4,93 | 18,03 | 14,19 | 10,99 | 43,65 | 1,32 | 3,82 |
|        | SD | 3,24  | 1,12 | 2,94  | 2,67  | 3,62  | 4,03  | 0,37 | 1,04 |
| 2715   | X  | 7,73  | 5,22 | 12,96 | 8,23  | 9,66  | 30,94 | 1,70 | 2,54 |
|        | SD | 2,34  | 0,88 | 2,32  | 2,28  | 3,39  | 3,42  | 0,59 | 0,60 |
| P53    | X  | 11,63 | 4,48 | 16,11 | 9,41  | 11,33 | 36,85 | 1,80 | 3,72 |
|        | SD | 2,12  | 0,99 | 2,38  | 2,00  | 3,03  | 3,65  | 0,49 | 0,77 |

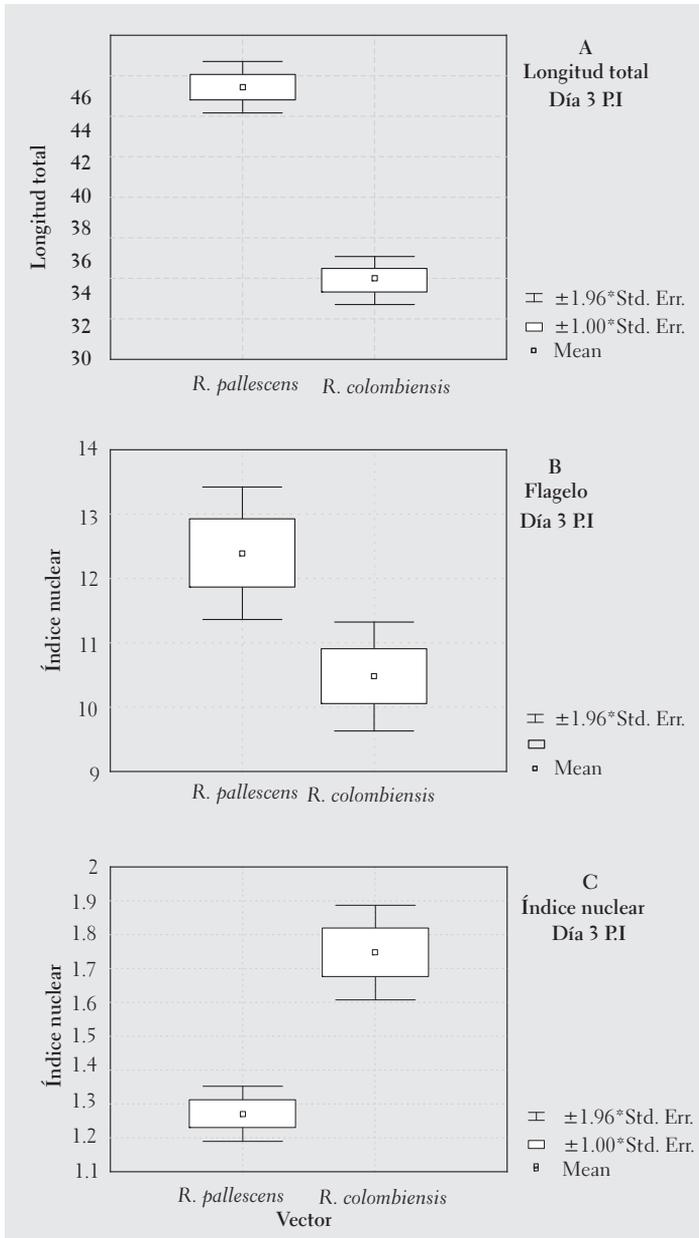
X: Promedio; SD: Desviación estándar.

Mediante el análisis multivariado se encontró que al tercer día pos-inoculación existen diferencias significativas en la longitud total de las cepas aisladas de los vectores *R. pallescens* y *R. colombiensis* ( $p= 0,000000$ ), por lo cual podría decirse que a partir de este parámetro se generan dos agrupaciones independientes concernientes a cada uno de estos vectores (figura 2A). Las cepas aisladas de *R. pallescens* presentaron valores superiores, con un rango de variación que oscila entre 42 y 45  $\mu\text{m}$ , aproximadamente, mientras que las cepas obtenidas a partir de *R. colombiensis* mostraron tamaños que varían alrededor de 32,5  $\mu\text{m}$  y 35,5  $\mu\text{m}$  (figura 2A). Los resultados arrojados por las pruebas de comparación múltiple (test de Scheffe, Tukey y LSD) coinciden en que existen diferencias entre las cepas aisladas de cada uno de estos vectores.

La evaluación de la longitud del flagelo al tercer día pos-inoculación a través del análisis multivariado ( $p=0,00571676$ ) permitió establecer que esta variable es diferente para las cepas aisladas de *R. pallescens* y para las obtenidas a partir de *R. colombiensis*, por lo que podría considerarse que estas se comportan de forma distinta e integran dos grupos diferentes según el vector al cual pertenecen (figura 2B).

Las distancias entre el núcleo y el extremo anterior son menores que las distancias entre el núcleo y el extremo posterior en todas las cepas; esto ratifica una vez más la tendencia de este organelo a ubicarse hacia el extremo anterior. Al realizar el análisis multivariado se encontró que el índice nuclear de los tripomastigotes sanguíneos de las cepas aisladas de *R. pallescens* es diferente al hallado para las cepas obtenidas de *R. colombiensis* al

tercer día pos-inoculación, por lo que estas cepas podrían ubicarse en grupos independientes según el vector de origen (figura 2C).



**Figura 2.** Parámetros morfométricos de cepas de *T. rangeli* KPl (-) agrupadas por su vector de origen. Datos obtenidos al tercer día pos-inoculación mediante la infección de ratones con epimastigotes de cultivo (A: Longitud total; B: Longitud del flagelo; C: Índice nuclear).

**3.2 Comparación de parámetros morfométricos de los tripomastigotes sanguíneos obtenidos al quinto día pos-inoculación**

Los promedios de longitud total obtenidos para las cepas de *T. rangeli* al quinto día pos-inoculación mostraron valores que varían entre 32,96 µm y 40,20 µm. Las longitudes del flagelo para las mismas cepas mostraron valores más homogéneos con un rango de variación comprendido entre 8,32 µm y 11,92 µm. Las cepas aisladas de *R. pallescens* presentaron flagelos de menor tamaño, mientras que, las cepas aisladas de *R. colombiensis* exhibieron tamaños mayores (tabla 3).

**Tabla 3.** Valores promedio de parámetros morfométricos evaluados a los tripomastigotes sanguíneos de las cepas GAL 47, GMLLC, 2715 y P53 al quinto día pos-inoculación. (n=29).

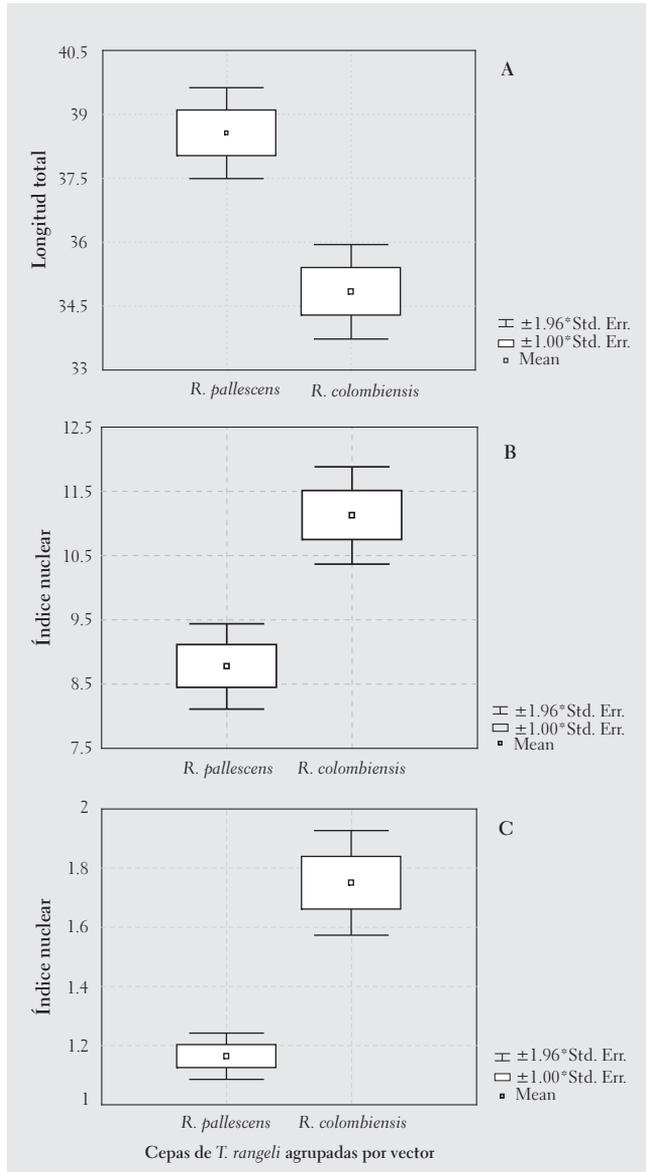
| Cepa   |    | PK   | KN   | PN    | NA    | F     | L     | IN   | IK   |
|--------|----|------|------|-------|-------|-------|-------|------|------|
| GAL 47 | X  | 7,73 | 7,19 | 14,93 | 13,60 | 8,32  | 36,90 | 1,12 | 2,11 |
|        | SD | 1,55 | 1,18 | 1,73  | 1,81  | 1,87  | 3,03  | 0,18 | 0,33 |
| GMLLC  | X  | 9,80 | 6,80 | 16,70 | 14,43 | 9,26  | 40,20 | 1,21 | 2,54 |
|        | SD | 2,82 | 1,12 | 2,65  | 2,92  | 3,07  | 4,46  | 0,39 | 0,71 |
| 2715   | X  | 6,60 | 7,64 | 14,29 | 7,93  | 10,79 | 32,96 | 2,00 | 1,92 |
|        | SD | 1,59 | 1,49 | 1,95  | 2,46  | 3,16  | 3,28  | 0,76 | 0,35 |
| P53    | X  | 8,18 | 6,50 | 14,68 | 10,54 | 11,48 | 36,70 | 1,50 | 2,29 |
|        | SD | 2,41 | 0,98 | 2,47  | 2,84  | 2,69  | 4,42  | 0,50 | 0,46 |

X: Promedio; SD: Desviación estándar.

En todas las cepas se encontraron valores de índice nuclear mayores a 1; sin embargo la cepa 2715 mostró un índice nuclear de 2, por lo que se asume que para esta cepa al quinto día pos-inoculación el núcleo tiene una mayor tendencia a ubicarse hacia el extremo anterior del cuerpo del parásito. La cepa P53, aislada del mismo vector, arrojó un índice nuclear de 1,5. En todos los casos las distancias comprendidas entre el extremo posterior del cuerpo del parásito y el núcleo son mayores que las comprendidas entre este último y el extremo anterior, lo cual soporta la idea de que el núcleo no es completamente equidistante del extremo anterior y posterior, y por tanto muestra una ligera tendencia a ubicarse más hacia la región anterior (tabla 3).

Los resultados obtenidos mediante el análisis multivariado revelan que al quinto día pos-inoculación existen diferencias entre los promedios de índice nuclear entre las cepas de *R. pallescens* (GAL 47 y GMLLC) y *R. colombiensis* (2715 y P53) (p=0,000). Otra característica compartida por estas cepas aisladas de *R. pallescens* es la homogeneidad de valores obtenidos para esta variable, pues los datos oscilan entre 1,05 y 1,25,

aproximadamente (figura 3C). De otra forma, las cepas aisladas de *R. colombiensis* presentan valores de índice nuclear estadísticamente diferentes (test de Tuckey) a las cepas mencionadas anteriormente, con un valor promedio de 1,75; por esta razón podrían ser consideradas como un grupo independiente.



**Figura 3.** Parámetros morfométricos de cepas de *T. rangeli* KP1 (-) agrupadas por su vector de origen. Datos obtenidos al quinto día post inoculación mediante la infección de ratones con epimastigotes de cultivo (A: Longitud total; B: Longitud del flagelo; C: Índice nuclear).

### 3.3 Comparación de parámetros morfométricos de los tripomastigotes sanguíneos obtenidos al séptimo día pos-inoculación

Al séptimo día pos-inoculación, uno de los parámetros morfométricos que presentó mayor variación para las cepas evaluadas fue la longitud total, puesto que para esta variable se encontraron valores que oscilan entre 33,69  $\mu\text{m}$  y 40,79  $\mu\text{m}$  (tabla 4). Las cepas que presentaron un mayor tamaño durante este día fueron aquellas aisladas de los vectores *R. pallescens*. Cabe destacar que aunque la cepa GAL 47 presentó una de las mayores longitudes, mostró el menor tamaño del flagelo durante este día. El índice nuclear arrojó valores similares y un poco superiores a 1 en la mayoría de las cepas; sin embargo la cepa 2715 presentó un índice nuclear de 2,01, dato que indica, según los valores expuestos por Hoare en 1972, que el núcleo tiene una mayor tendencia a ubicarse hacia la región anterior del cuerpo del parásito (figura 4). Para todas las cepas estudiadas, las distancias comprendidas entre el núcleo y el extremo anterior del cuerpo del parásito fueron menores que aquellas establecidas entre el extremo posterior y dicho organelo, ratificando, por tanto, que existe una ligera tendencia de ubicación de este hacia el extremo anterior. El índice del cinetoplasto fue cercano a 2 para las cepas GAL 47 y 2715, y mayor a este valor para resto de las cepas, lo cual sugiere que para las primeras este organelo está más alejado del núcleo (tabla 4).

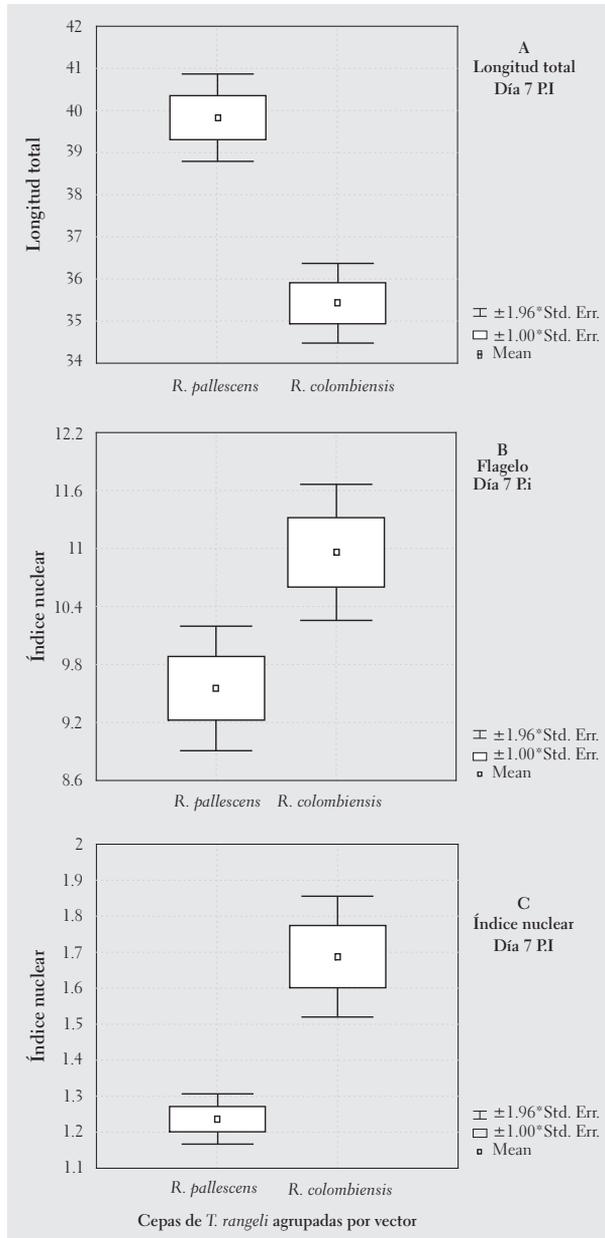
**Tabla 4.** Valores promedio de diferentes parámetros morfométricos evaluados a los tripomastigotes sanguíneos de las cepas GAL 47, GMLLC, 2715 y TrS P53 al séptimo día pos-inoculación (n=29).

| Cepa   |    | PK   | KN   | PN    | NA    | F     | L     | IN   | IK   |
|--------|----|------|------|-------|-------|-------|-------|------|------|
| GAL 47 | X  | 7,34 | 8,97 | 16,31 | 14,09 | 8,37  | 38,87 | 1,20 | 1,84 |
|        | SD | 1,19 | 1,52 | 2,00  | 2,50  | 1,19  | 3,40  | 0,27 | 0,20 |
| GMLLC  | X  | 9,95 | 6,65 | 16,60 | 13,45 | 10,74 | 40,79 | 1,27 | 2,57 |
|        | SD | 2,66 | 1,28 | 2,60  | 2,66  | 2,90  | 4,40  | 0,28 | 0,55 |
| 2715   | X  | 6,21 | 8,62 | 14,83 | 7,93  | 10,94 | 33,69 | 2,01 | 1,74 |
|        | SD | 2,24 | 1,29 | 2,46  | 1,69  | 3,06  | 3,61  | 0,77 | 0,32 |
| P53    | X  | 8,08 | 7,00 | 15,12 | 11,28 | 10,99 | 37,19 | 1,37 | 2,21 |
|        | SD | 1,80 | 1,10 | 1,77  | 1,54  | 2,42  | 2,82  | 0,26 | 0,38 |

X: Promedio; SD: Desviación estándar.

Al séptimo día pos-inoculación se encontró que el promedio de longitud total de las cepas aisladas de *R. pallescens* fue diferente al de aquellas aisladas de *R. colombiensis*, pues mientras que estas últimas presentaron valores inferiores a 36,5  $\mu\text{m}$ , las cepas provenientes de *R. pallescens* midieron más de 38,5  $\mu\text{m}$ , hasta alcanzar casi 41  $\mu\text{m}$  durante

este día; este resultado fue obtenido mediante el análisis multivariado con un valor  $p=0,000$  (figura 4A).

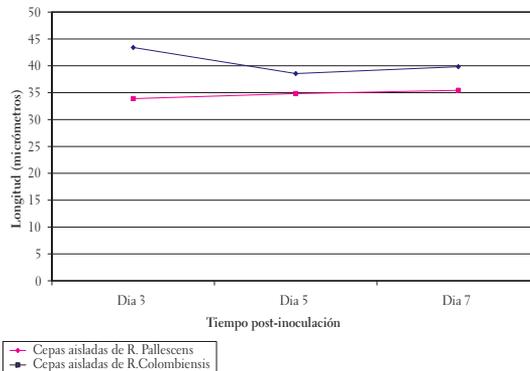


**Figura 4.** Parámetros morfométricos de cepas de *T. rangeli* KP1 (-) agrupadas por su vector de origen. Datos obtenidos al séptimo día pos-inoculación mediante la infección de ratones con epimastigotes de cultivo (A: Longitud total; B: Longitud del flagelo; C: Índice nuclear).

Los resultados obtenidos mediante el análisis multivariado de la longitud del flagelo al séptimo día pos-inoculación mostraron que las cepas aisladas de *R. pallescens* y *R. colombiensis* difieren en los valores obtenidos para esta variable, por lo que es preciso anotar que las medias son completamente diferentes ( $p=0,00463635$ ) y que las cepas no comparten intervalos de confianza entre sí (figura 4B). Este resultado ratifica una vez más la variabilidad que existe entre cepas de *Trypanosoma rangeli* que provienen de diferentes vectores y pertenecen a la misma subpoblación. A diferencia de las cepas aisladas de *R. pallescens*, en las cuales los valores del índice nuclear son similares, las cepas aisladas de *R. colombiensis* se diferencian notablemente (figura 4C) no solo en cuanto los valores obtenidos, sino también en los rangos de variación de los mismos. En consecuencia, es posible establecer dos agrupaciones claramente definidas según el vector de origen.

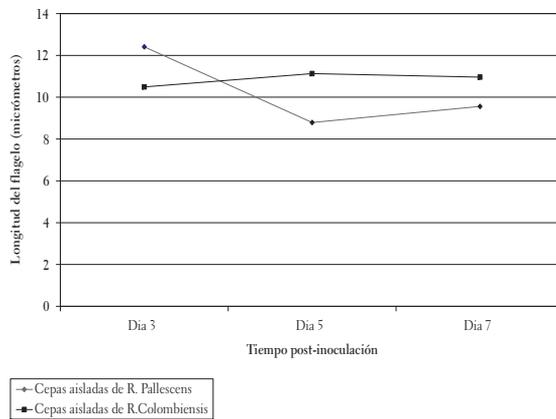
### 3.4 Evaluación del comportamiento de algunos parámetros morfométricos de los tripomastigotes sanguíneos pertenecientes a las cepas GAL 47, GMLLC, 2715 y P53 a lo largo del tiempo (día 3, 5 y 7 pos-inoculación) mediante análisis de perfiles

La evaluación de la longitud total a lo largo del día 3, 5 y 7 pos-inoculación constituye una evidencia de la variabilidad existente entre las cepas de *T. rangeli* aisladas de *R. pallescens* y *R. colombiensis*, pues se demostró que los perfiles de esta variable no son paralelos, ya que presentan comportamientos diferentes, y tampoco son coincidentes pues existen diferencias significativas en los tamaños de las cepas provenientes de cada vector al tercer, quinto y séptimo día pos-inoculación. Aunque las cepas aisladas de *R. pallescens* presentaron tamaños superiores a las provenientes de *R. colombiensis*, estas exhibieron un comportamiento más variable a lo largo del tiempo pos-inoculación. Para las cepas aisladas de *R. pallescens* se hace evidente al quinto día pos-inoculación una disminución en el tamaño con un ligero incremento al día 7, hasta alcanzar una longitud aproximada de 40  $\mu\text{m}$  (figura 5).



**Figura 5.** Longitud promedio de las cepas de *Trypanosoma rangeli* agrupadas por su vector de origen (*R. pallescens* y *R. colombiensis*) durante el tercer, quinto y séptimo día pos-inoculación.

La amplia variabilidad de *T. rangeli* KP1(-) también puede apreciarse a partir del análisis de la longitud del flagelo de las cepas aisladas de *R. colombiensis* y *R. pallezens*. Según las pruebas T2 de Hotelling y t Student, se encontró que los perfiles para esta variable no son paralelos ni coincidentes, por lo que se deduce que a lo largo del tercer, quinto y séptimo día pos-inoculación las cepas aisladas de estos vectores presentan tamaños y comportamientos estadísticamente diferentes. Las cepas aisladas de *R. colombiensis* presentan un comportamiento muy uniforme, casi constante a lo largo del tiempo pos-inoculación, dado que se notó un ligero incremento en los valores para esta variable en el día 5 y una pequeña disminución durante el día 7. En el caso de las cepas aisladas de *R. pallezens* se observó una tendencia completamente antagónica (figura 6).



**Figura 6.** Longitud del flagelo de las cepas de *Trypanosoma rangeli* agrupadas por su vector de origen (*R. pallezens* y *R. colombiensis*) durante el tercer, quinto y séptimo día pos-inoculación.

El índice nuclear para las cepas de *R. pallezens* y *R. colombiensis* a lo largo del tiempo pos-inoculación presentó valores uniformes al aplicar la prueba T2 de Hotelling. Al evaluar el paralelismo de los perfiles se encontró un comportamiento similar para las cepas aisladas de ambos vectores. De otro lado, la prueba t Student reveló la no coincidencia de los perfiles para estas cepas, y por ello es posible afirmar que los valores de índice nuclear son estadísticamente diferentes y que existe una alta variabilidad en las cepas aisladas de estos vectores. Es necesario destacar que las cepas aisladas de *R. colombiensis*, a diferencia de lo que ocurre con las cepas originarias de *R. pallezens*, presentaron los mayores valores de índice nuclear, y por tanto en ellas está más acentuada la tendencia de ubicación del núcleo hacia la región anterior del cuerpo del parásito, siendo esta una característica que permanece a lo largo del tercer, quinto y séptimo día pos-inoculación (figura 7).

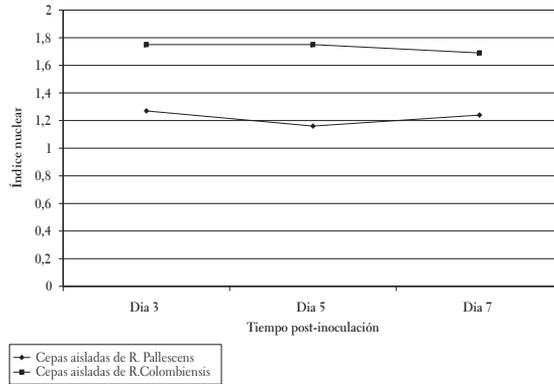


Figura 7. Índice nuclear de las cepas de *Trypanosoma rangeli* agrupadas por su vector de origen (*R. pallescens* y *R. colombiensis*) durante el tercer, quinto y séptimo día pos-inoculación.

#### 4. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos revelan que existe una amplia variabilidad morfológica en las cepas de *T. rangeli* aisladas de diferentes vectores. A pesar de que las cepas GAL 47, GMLLC, 2715 y TrSP53 pertenecen a la misma subpoblación KP1 (-), exhiben variaciones morfométricas acentuadas entre sí. Con un valor  $p > 0,000$ , para todas las variables evaluadas (L, F, IN, IK PN, NA, KN, PK), se demostró que todas las medias son diferentes al tercer, quinto y séptimo día pos-inoculación. Cabe destacar que cuando se efectuó el análisis de varianza no tomando las cepas independientemente sino a partir del vector de origen a lo largo del tercer, quinto y séptimo día pos-inoculación, utilizando las variables longitud total, longitud del flagelo e índice nuclear se establecieron en todos los casos dos agrupaciones biométricamente diferentes, una correspondiente a las cepas aisladas de *R. pallescens* y otra formada a partir de las cepas aisladas de *R. colombiensis*.

El fenómeno del pleomorfismo ha sido reportado en diversas especies de tripanosomátidos. En condiciones controladas, Davis (1952) encontró un amplio grado de variación en el tamaño de las poblaciones de especies pertenecientes al subgénero *Herpetosoma*. Ormerod (1979) observó en las infecciones con *Trypanosoma brucei* una marcada variabilidad en el tamaño y la forma de tripomastigotes circulantes en la sangre. Formas similares también fueron observadas en *T. evansi*, aunque en esta especie la variabilidad se caracterizó por ser menos extrema. Mientras que los tripomastigotes de otras especies como *T. vivax* o *T. congolense* presentaron una amplia variación en la longitud, generalmente no exhibieron diferencias importantes en la forma. Según el autor, aunque *T. brucei* no presenta muchas diferencias de tamaño, exhibe una amplia variación en la forma de los tripomastigotes sanguíneos.

Maia da Silva et ál. (2004) afirman que *T. rangeli* es un complejo de aislados representado por características particulares que permiten distribuirlos en al menos cuatro grupos filogenéticos. Por otro lado, los agrupamientos definidos por marcadores moleculares

diferentes e independientes sugieren una evolución clonal o especiación de las poblaciones de *T. rangeli* (Vallejo et ál., 2003).

Urdaneta-Morales y F. Tejero (1992), al evaluar la influencia de la respuesta inmune sobre el pleomorfismo de las formas sanguíneas de la cepa Dog 82 de *T. rangeli*, indujeron infecciones experimentales a partir de inoculación intraperitoneal y subcutánea en ratones de diferentes edades. Posteriormente encontraron que, conforme la infección progresaba, aparecía una secuencia de cuatro tipos de tripomastigotes sanguíneos (tipos pleomórficos) morfológicamente diferenciables.

Villa (2006) agrega, con base en los resultados obtenidos en infecciones experimentales logradas a partir de formas metacíclicas, que *T. rangeli* es una especie que presenta variaciones morfológicas intraespecíficas o pleomorfismos, y sugiere al menos dos agrupaciones morfométricas de las cepas de *T. rangeli*, las cuales probablemente presentan una relación directa con el vector que las transmite. Otro caso de polimorfismo de *T. rangeli* fue reportado por Marín (2005), pues observó que la cepa P53 presentó variaciones morfológicas (pleomorfismos) en las formas sanguíneas dependiendo de la especie de mamífero infectada con la misma cepa del parásito. Los tripomastigotes sanguíneos de *T. rangeli* de la cepa P53 fueron más cortos en ratón que los observados en sangre de *Didelphys* spp., y aún más cortos que los observados en sangre de perro. Este resultado es muy similar al encontrado por Ziccardi y De Oliveira en 1999 para *T. minasense*, pues al séptimo día pos-inoculación, los tripomastigotes sanguíneos de esta especie tuvieron una longitud total, amplitud y distancia PK mucho más pequeñas cuando se obtuvieron a partir del mono ardilla que cuando se extrajeron de una marmosa infectada.

Las características fenotípicas que Ormerod (1979) señala como manifestaciones del pleomorfismo en tripanosomas corresponden a cambios en la longitud total, la amplitud en el número y tamaño de las ondulaciones de la membrana, en la posición del núcleo y el cinetoplasto, y en la longitud del flagelo libre. En nuestro estudio fueron perceptibles cambios en la mayoría de estas variables, generando durante los días 3, 5 y 7 una agrupación para las cepas aisladas de *R. colombiensis* y otra para aquellas obtenidas a partir de *R. pallezensis*. Este resultado concuerda con lo expuesto por Villa (2006), quien obtuvo infecciones experimentales en sangre de ratón a partir de formas metacíclicas provenientes de vectores del grupo *Pallezensis* y *Prolixus*. Según Villa los grupos morfológicos encontrados presentan una relación estrecha con el vector del cual fueron aisladas. De esta forma las cepas pertenecientes a la subpoblación KP1 (-), que fueron aisladas a partir de la infección en las glándulas salivales de *R. colombiensis*, muestran los menores tamaños, mientras que aquellas aisladas de las glándulas salivales de *R. pallezensis* exhibieron valores de longitud superiores.

Es necesario destacar que en el presente estudio las infecciones experimentales de diferentes cepas de *T. rangeli* en ratones se efectuaron a partir de epimastigotes de cultivo mantenidos *in vitro*. Es probable que las variaciones fenotípicas de las cepas aisladas de diferentes vectores del grupo *Pallezensis* se hayan conservado incluso a lo largo del periodo de mantenimiento *in vitro*, y una vez se inocularon en ratón se hicieron notorias las variaciones fenotípicas en los tripomastigotes sanguíneos de las cepas aisladas de *R. colombiensis* que forman un grupo independiente y aquellas provenientes de *R. pallezensis*, las

cuales se ubican en una agrupación diferente. Este hecho permite suponer que existe una estrecha relación entre la cepa del parásito y el vector que la transmite. Es probable que el ambiente interno del hospedero invertebrado seleccione algunos fenotipos de los flagelados, cuyas manifestaciones externas pueden notarse, como ocurre en este caso, en los tripomastigotes desarrollados en sangre de ratones experimentalmente infectados.

Según Overath et ál. (1983), el fenómeno de la variabilidad celular por el cual un simple genotipo puede originar diferentes fenotipos es frecuentemente una consecuencia de las condiciones ambientales que influyen la diferenciación celular. *T. rangeli* invade el hemoceloma del insecto, se multiplica libremente en la hemolinfa y también intracelularmente en los diversos tipos de hemocitos, y luego es capaz de invadir las glándulas salivares. En todos estos compartimentos, micro-hábitat con metabolismo diferente, *T. rangeli* logra diferenciarse y sufrir sorprendentes mudanzas morfogenéticas. Es, pues, la gran plasticidad en su morfogénesis la que hace de esta especie un modelo único en biología y fisiología celular (Cuba Cuba, 1998).

Estudios recientes muestran que existe una estrecha relación entre algunas especies semejantes a *T. rangeli* y algunas cepas de *T. rangeli sensu stricto*. Los resultados obtenidos por Maia da Silva y colaboradores en 2004 revelan que el comportamiento y las características morfológicas de parásitos aislados a partir de monos neotropicales, osos hormigueros y perezosos, y zarigüeyas de la Amazonia de Brasil, fueron compatibles con *T. rangeli*. Según estos resultados, aquellos aislados a partir de monos y zarigüeyas y los tradicionalmente conocidos como *T. saimiri*, *T. preguici* y *T. legeri* podrían ser clasificados como *T. rangeli*.

Ortiz (2005) encontró que *T. leeuwenhoekii* presentó un perfil molecular idéntico al exhibido por las cepas de *T. rangeli* pertenecientes a la subpoblación KP1(-), por lo que el perfil para esta especie mostró un complejo de bandas de 300 a 450 pb y una banda de 760 pb mediante el empleo de los iniciadores S35/S36/KP1L. Otros iniciadores como TrINT 1 y TrINT 2, MEL/TrINT 2 corroboraron la alta similaridad molecular de *T. rangeli* y *T. leeuwenhoekii*.

Marín (2005) al estudiar la influencia del hospedero vertebrado sobre el pleomorfismo encontró que *T. rangeli* presentó variaciones morfométricas estadísticamente significativas, cuando se desarrolló en sangre de ratón, perro y zarigüeya, demostrando así que el tamaño de tripomastigotes puede estar sujeto a un componente pleomórfico, influenciado por los componentes del sistema inmune del hospedero.

Es de destacar que todos los parámetros morfológicos de las cepas aisladas del vector *R. pallescens* evaluados en este estudio no presentaron diferencias significativas con los mismos parámetros estudiados por Marín (2005) para *T. leeuwenhoekii* durante los primeros siete días pos-infección. Por tanto, además de las evidencias moleculares expuestas anteriormente, se sugiere que *T. leeuwenhoekii* no solo presenta una estrecha relación con *T. rangeli* bajo parámetros moleculares y morfológicos, sino que debe tratarse de la misma especie de tripanosomátido.

Cabe resaltar que la variabilidad intraespecífica de *T. rangeli* constituye un excelente modelo para el estudio de los fenómenos pleomórficos en tripanosomátidos. Este

enfoque es útil en la dilucidación de la compleja relación parásito hospedero y, por tanto, en el entendimiento de la dinámica epidemiológica de la tripanosomiasis, así como para el diagnóstico y la determinación taxonómica de las poblaciones de este parásito, problemas que deben abordarse de manera integrada con otras áreas del conocimiento como la genética y la biología molecular.

## AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo recibió financiación del Instituto Colombiano Francisco José de Caldas (Colciencias), proyecto 1105-05-16919 y el Fondo de Investigaciones de la Universidad del Tolima. Los autores agradecen las valiosas observaciones aportadas por dos evaluadores anónimos, las cuales contribuyeron a mejorar la calidad y presentación del artículo.

## BIBLIOGRAFÍA

- AÑEZ, N. (1981). Studies on *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920. Deposition migration and growth of *T. rangeli* in two mammals. *Parasitological Topics*, spec. publ. 1, 19-25.
- CUBA CUBA, C. A. (1998). Revisión de los aspectos biológicos y diagnósticos de *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 3, 207-220.
- D'ALESSANDRO, A. (1976). Biology of *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli* Tejera, 1920. En W. H. R. LUMSDEN, & D. A. EVANS (Eds.). *Biology of Kinetoplastida*, London: Academic Press. 1, 327-493.
- DAVIS, B. (1952). Studies on the trypanosomes of California mammals. *University of California Publications in Zoology*, 57, 145-250.
- GREWAL, M. S. (1969). Studies on *Trypanosoma rangeli* a South American Human Trypanosome. *Res. Bull. Panjab Univ.*, 20, 486-499.
- GRISARD, E. C., CAMPBELL, D. A. & ROMANHA, A. J. (1999). Miniexon gene sequence polymorphism among *Trypanosoma rangeli* strains isolated from distinct geographical regions. *Parasitology*, 118, 375-382.
- HOARE, C. A. (1972). The Trypanosomes of mammals. A zoological Monograph (pp 57-59). Great Britain.
- MACEDO, A. M., VALLEJO, G. A., CHIARI, E. & PENA, S. D. (1993). DNA fingerprinting reveals relationships between strains of *Trypanosoma rangeli* and *Trypanosoma cruzi*. En S. D. I. PENA, R. CHAKRABORTY, J. T. EPPLEN & A. I. JEFFREYS (Eds.), *DNA fingerprinting: state of the science* (pp. 321-329). Switzerland: Birkhauser Verlag, Basel.
- MACHADO, P. E., EGER MANGRICH, I., ROSA, G., KOERICH, L. B., GRISARD, E. C. & STEINDEL, M. (2001). Differential Susceptibility of triatominae of the genus *Rhodnius* to *Trypanosoma rangeli* strains from different geographical origins. *Parasitology*, 31, 631-633.

- MAIA DA SILVA F., RODRIGUES, A. C., CAMPANER, M., TAKATA C. S. A., BRIGIDO, M. C., JUNQUEIRA, A. C. V., COURA, J. R., TAKEDA, G. F., SHAW, J. J. & TEXEIRA, M. M. G. (2004). Randomly amplified polymorphic DNA analysis of *Trypanosoma rangeli* and allied species from human, monkeys and other sylvatic mammals of the Brazilian Amazon disclosed a new group and a species-specific marker. *Parasitology*, 128, 283-294.
- MARÍN, D. H. (2005). *Comparación de los pleomorfismos de tripomastigotes de Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli* (Tejera, 1920) y *Trypanosoma (Herpetosoma) leewenhoeki* (Shaw, 1969) en sangre de diferentes mamíferos domésticos y silvestres experimentalmente infectados (pp. 72-143). Trabajo de grado para optar el título de biólogo. Universidad del Tolima. Facultad de Ciencias. Laboratorio de Investigaciones en Parasitología Tropical.
- ORMEROD, W. E. (1979). Development of *Trypanosoma brucei* in the Mammalian Host. En W. H. R. Lumsden & D. A. Evans (Eds.), *Biology of the Kinetoplastida*, New York: Academic Press, 2, 339-393.
- ORTIZ, P. A. (2005). Caracterización morfológica, biológica y molecular de cepas de *T. rangeli-like* aisladas de reservorios silvestres del Pacífico colombiano. Trabajo de grado para optar el título de biólogo. Universidad del Tolima. Facultad de Ciencias. Laboratorio de Investigaciones en Parasitología Tropical.
- OVERATH, P., CZICHOS, J., STOCK, V. & NONNEN-GAESSER, C. (1983). Repression of glycoprotein synthesis and release of surface coat during transformation of *Trypanosoma brucei*. *Embo. J.*, 2, 1721-1728.
- STEINDEL, M., DÍAZ NETO, E., RIBEIRO-RODRÍGUEZ, R., CARVALHO-PINTO, C. J. GRISARD, E., MENEZES, C., MURTA, S. M. F. & SIMPSON, A. J. (1994). Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPDs) and Isoenzyme Analysis of *Trypanosoma rangeli* strains. *J. Eukaryot. Microbiol.*, 41, 261-267.
- URDANETA-MORALES, S. & TEJERO, F. (1992). *Trypanosoma rangeli* (Tejera, 1920): Observations upon pleomorphism. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. Río de Janeiro, 87, 511-516.
- VALLEJO, G. A., MARINKELLE, C. J., GUHL, F. & DE SÁNCHEZ, N. (1988). Comportamiento de la infección y diferenciación morfológica entre *Trypanosoma cruzi* y *Trypanosoma rangeli* en el intestino del vector *Rhodnius prolixus*. *Rev. Brasil. Biol.*, 48, 577-587.
- VALLEJO, G. A., GUHL, F., CARRANZA, J. C., LOZANO, L. E. & MARINKELLE, C. I. (2002). Evolución clonal o especiación en *Trypanosoma rangeli* (pp. 79-89). Memorias Curso Taller Internacional - Cimpat.
- VALLEJO, G. A., GUHL, F., CARRANZA, J. C., MORENO, J., TRIANA, O. & GRISARD, E. (2003). Parity between kinetoplast DNA and minixion gene sequences supports either clonal evolution or speciation in *Trypanosoma rangeli* strains isolated from *Rhodnius colombiensis*, *R. pallescens* and *R. prolixus* in Colombia. *Infection, Genetics and Evolution*, 3(1), 39-45.
- VALLEJO, G. A.; GUHL, F.; CARRANZA, J. C., CUBA CUBA, C. A., SCHOFIELD, C. S. & TRIANA, O. (2004). Interaction between *Trypanosoma rangeli* and *Rhodnius spp.*: a model for molecular epidemiology in American trypanosomiasis. *Medimond Monduzzi Intl. Proc.* Bologna, Italy. 1, 121-128.

VILLA, L. M. (2006). *Análisis morfométrico de tripomastigotes metacíclicos y sanguíneos de las subpoblaciones KP1 (+) y KP1 (-) de Trypanosoma rangeli aislados de R. prolixus, R. colombiensis y R. pallascens* (pp. 177-199). Trabajo de grado para optar el título de biólogo. Universidad del Tolima. Facultad de Ciencias. Laboratorio de Investigaciones en Parasitología Tropical.

ZICCARDI, M. & DE OLIVEIRA, R. L. (1998). Morphological Features of Trypanosomes from Squirrel Monkeys from the Brazilian Amazon. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Río de Janeiro, 93, 45-55. 

| Referencia   | Recepción                 | Aprobación                |
|--|---------------------------|---------------------------|
| SUÁREZ Q., Y., CARRANZA, J. C., CLAVIJO, J.A., TRIANA, O. y VALLEJO, G. A. Pleomorfismos en cepas de <i>Trypanosoma rangeli</i> aisladas de <i>Rhodnius colombiensis</i> y <i>R. pallascens</i> . <i>Revista Tumbaga</i> (2008), 3, 63-80. | Día/mes/año<br>07/08/2008 | Día/mes/año<br>02/10/2008 |