

ARTÍCULO ORIGINAL

Interacción tripanosoma-vector-vertebrado y su relación con la sistemática y la epidemiología de la tripanosomiasis americana

Gustavo Adolfo Vallejo ¹, Felipe Guhl ², Julio César Carranza ¹, Omar Triana ³, Gerardo Pérez ⁴, Paola Andrea Ortiz ¹, Dairo Humberto Marín ¹, Lina Marcela Villa ¹, Jazmín Suárez ¹, Isaura Pilar Sánchez ¹, Ximena Pulido ¹, Ingrid Bibiana Rodríguez ¹, Leyder Elena Lozano ¹, Daniel Alfonso Urrea ¹, Fredy Arvey Rivera ¹, César Cuba-Cuba ⁵, Jairo Alfonso Clavijo ⁶

¹ Laboratorio de Investigaciones en Parasitología Tropical, Facultad de Ciencias, Universidad del Tolima, Ibagué, Colombia.

² Centro de Investigaciones en Microbiología y Parasitología Tropical (CIMPAT), Universidad de los Andes, Bogotá D.C., Colombia.

³ Laboratorio de Chagas, Instituto de Biología, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

⁴ Grupo de Investigación en Química de Proteínas, Departamento de Química, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá D.C., Colombia.

⁵ Unidade de Parasitologia Médica e Biología de Vetores, Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brasil.

⁶ Departamento de Matemáticas y Estadística, Facultad de Ciencias, Universidad del Tolima, Ibagué, Colombia.

Introducción. *Trypanosoma rangeli* es la segunda especie de tripanosoma que infecta al hombre en América Latina. Se ha observado variabilidad en las características biológicas, bioquímicas y moleculares en diferentes aislamientos de este parásito.

Objetivo. Estudiar las características morfológicas y moleculares de cepas de *T. rangeli* aisladas de diferentes especies de *Rhodnius* e inoculadas en diferentes especies de vertebrados.

Materiales y métodos. Se utilizaron 19 cepas de *T. rangeli* aisladas de *R. prolixus*, *R. pallescens* y *R. colombiensis* en Colombia, *R. ecuadoriensis* en Perú y *R. pallescens* en Panamá. Se evaluó el polimorfismo de los tripomastigotes sanguíneos en ratones ICR y se estudió el pleomorfismo de la cepa P53 de *T. rangeli* KP1(-) inoculada en ratón, marsupial y canino. Se efectuó análisis de ADN polimorfo amplificado aleatorio en 12 cepas aisladas de cuatro especies de *Rhodnius*.

Resultados. Se observaron tres grupos discretos en la longitud total de los tripomastigotes sanguíneos y la cepa P53 presentó diferencias significativas en el tamaño de los tripomastigotes sanguíneos en ratón, marsupial y canino. El análisis de ADN polimorfo amplificado aleatorio mostró segregación de las cepas en dos ramas correspondientes a las cepas de *T. rangeli* KP1(+) y *T. rangeli* KP1(-). De otra parte todos las cepas de *T. rangeli* KP1(-) se agruparon de acuerdo con las especies de *Rhodnius* de las cuales fueron aisladas.

Conclusión. Este es el primer estudio que revela una estrecha asociación entre cepas de *T. rangeli* y las especies de *Rhodnius*, confirmando que cada especie de *Rhodnius* transmite al hospedero vertebrado poblaciones del parásito con claras diferencias fenotípicas y genotípicas, lo cual soporta la evolución clonal de estas poblaciones.

Palabras clave: *Trypanosoma*, *Rhodnius*, tripanosomiasis/epidemiología, técnica del ADN polimorfo amplificado aleatorio (RAPD), enfermedad de Chagas.

***Trypanosoma rangeli* parasite-vector-vertebrate interactions and their relationship to the systematics and epidemiology of American trypanosomiasis**

Introduction. *Trypanosoma rangeli* is a species of trypanosome second to *T. cruzi*, that is infective to humans in Latin America. Variability in the biological, biochemical and molecular characteristics between different isolates of this parasite have been recorded.

Objective. Morphological and molecular characteristics were recorded from strains of *T. rangeli*

that were isolated from different species of *Rhodnius* and maintained in different vertebrate species.

Materials and methods. Nineteen strains of *T. rangeli* were isolated from *R. prolixus*, *R. pallescens* and *R. colombiensis* in Colombia, *R. ecuadoriensis* in Peru and *R. pallescens* in Panama. Polymorphism of blood trypomastigotes in ICR mice was evaluated and pleomorphism of P53 strain of *T. rangeli* KP1(-) inoculated in mouse, marsupial and canine was studied. RAPD analysis (randomly amplified polymorphic DNA analysis) of 12 strains isolated from four species of *Rhodnius* was performed.

Result. Based on the total length of blood trypomastigotes, three discrete groups were observed. The P53 strain showed significant differences in the size of blood trypomastigotes in mouse, marsupial and canine. RAPD analysis showed that the strains segregated into two branches corresponding to strains of *T. rangeli* KP1(+) and *T. rangeli* KP1(-). All strains of *T. rangeli* KP1(-) clustered according to the species of *Rhodnius* from which they were isolated.

Conclusion. These data reveal, for the first time, a close association amongst *T. rangeli* strains and *Rhodnius* species, confirming that each species of *Rhodnius* transmits to vertebrate hosts a parasite population with clear phenotypic and genotypic differences. This is further evidence that supports the concept of clonal evolution of these parasites.

Key words: *Trypanosoma*, *Rhodnius*, trypanosomiasis/epidemiology, random amplified polymorphic DNA technique, Chagas disease.

Trypanosoma rangeli es un interesante parásito no patógeno para el hombre, que exhibe particulares características biológicas, entre las cuales se destacan la patogenicidad del parásito para el vector (1-3), la susceptibilidad de las especies de *Rhodnius* a cepas de *T. rangeli* del mismo origen geográfico (4,5), la reacción serológica cruzada de *T. rangeli* con *T. cruzi* (6,7) y la resistencia de los flagelados a la lisis mediada por el complemento (8), entre otras. Por ello, durante las últimas décadas, *T. rangeli* ha sido objeto de estudio por parte de varios grupos de investigación que han encontrado en este parásito un importante modelo para conocer los procesos coevolutivos entre parásito-vector y para estudiar la dinámica de la transmisión de subpoblaciones de *T. rangeli* al hospedero vertebrado (9). De otra parte, existe interés en desarrollar métodos para diferenciar *T. cruzi* de *T. rangeli*, debido a que en la mayoría de los países de América Latina estas dos especies se encuentran infectando los mismos vertebrados y vectores, generando dificultades en el diagnóstico morfológico de las

dos especies (10) o en el diagnóstico serológico de la infección en los vertebrados (6,7,11).

La variabilidad de las poblaciones de *T. rangeli* se ha demostrado en las últimas décadas mediante estudios de minisatélites de ADN, los cuales mostraron diferencias genéticas entre las cepas de Santa Catarina y las aisladas en Honduras, Colombia y Venezuela (12). El análisis de polimorfismos del ADN mitocondrial mostró que el minicírculo de kDNA denominado KP1 se encontró asociado con las cepas de *T. rangeli* aisladas en Colombia, Honduras y Venezuela, pero no en las cepas aisladas en Santa Catarina al sureste de Brasil (13). Una divergencia genética similar entre estos dos grupos se demostró usando electroforesis de isoenzimas y AP-PCR (14). Una conclusión similar se obtuvo con el análisis del cariotipo molecular de varias cepas de *T. rangeli*, revelando la existencia de polimorfismo cromosómico (15).

Utilizando amplificación del kDNA, en Colombia y en otros países de América Latina se han detectado dos grupos de *T. rangeli* molecularmente diferentes. Un grupo de cepas aisladas de *Rhodnius prolixus* presentan tres clases de minicírculos de kDNA denominados KP1, KP2 y KP3 (*T. rangeli* KP1+), mientras que las cepas aisladas de *R. colombiensis* presentan solamente dos clases denominadas KP2 y KP3 (*T. rangeli* KP1-) (9,16-18).

Correspondencia:

Gustavo Adolfo Vallejo, Laboratorio de Investigaciones en Parasitología Tropical, Facultad de Ciencias, Universidad del Tolima, Ibagué, Tolima, Colombia. A.A. No. 546. Telfax +(57) 8 2669176.
gvallejo@ut.edu.co

Recibido: 23/06/06; aceptado: 14/07/06

Recientemente se caracterizaron 18 cepas de *T. rangeli* aisladas de glándulas salivares de *R. colombiensis*, *R. pallescens* y *R. prolixus* (18) utilizando dos marcadores independientes: kDNA (17) y el espaciador intergénico del gen mini-exón (19). Los autores observaron que el producto de 380 pb de amplificación del mini-exón siempre se presentó asociado con los productos obtenidos de los minicírculos KP2 Y KP3 de kDNA y el producto de 340 pb del mini-exón siempre se presentó asociado con los productos de los minicírculos KP1, KP2 Y KP3. Existen dos hipótesis alternativas sobre el origen de los dos grupos de *T. rangeli*; por un lado podría tratarse de grupos con evolución clonal, en la cual la reproducción sexual sería rara o inexistente, o se trataría de un proceso de especiación críptica.

Se encontró asociación coevolutiva entre las cepas de *T. rangeli* KP1(-), las cuales circulan en la cordillera de los Andes en los vectores del grupo "pallescens", representados por *R. pallescens*, *R. colombiensis* y *R. ecuadoriensis*, y las cepas de *T. rangeli* KP1(+), las cuales circulan al oriente de la cordillera de los Andes en los vectores del grupo "prolixus", representados por *R. prolixus* y *R. neglectus* (9).

Nuestro interés fue conocer el grado de divergencia genética existente entre los grupos de *T. rangeli* KP1(+) y *T. rangeli* KP1(-). Por esta razón, en el presente trabajo se analizaron las características morfológicas de los tripomastigotes sanguíneos y las características genéticas mediante análisis de RAPD en cepas de *T. rangeli* aisladas de *R. pallescens*, *R. colombiensis*, *R. ecuadoriensis* y *R. prolixus* para verificar si los polimorfismos observados en las poblaciones de este parásito están asociados con los vectores que las transmiten, de manera que estos actuarían como filtros biológicos seleccionando las diferentes poblaciones del parásito.

Materiales y métodos

Aislamiento y cultivo de los parásitos

Se utilizaron 19 cepas de *T. rangeli*. Las cepas Perú 1, Perú 1A y Perú 2A se aislaron de las glándulas salivares naturalmente infectadas de *R.*

ecuadoriensis domiciliado en el departamento de la Libertad en el norte del Perú; las cepas P53, Trs, Rcol, 2715 y 044 se aislaron de *R. colombiensis* silvestre en el departamento del Tolima, región central de Colombia; las cepas Gal 47, Gal 57, SO28, SO48 se aislaron de *R. pallescens* silvestre en el departamento de Sucre, norte de Colombia; la cepa 0401 se aisló de *R. pallescens* silvestre en el departamento del Tolima, Colombia; la cepa GMLLC se aisló de *R. pallescens* en Panamá; las cepas 444, 1545, 3123 se aislaron de *R. prolixus* domiciliado en el departamento de Boyacá, Colombia, y las cepas P19 y Choachí se aislaron de *R. prolixus* domiciliado en los departamentos de Norte de Santander y Cundinamarca, Colombia. Los tripomastigotes metacíclicos de las glándulas salivares de cada vector se inocularon intraperitonealmente en ratones ICR. Se efectuaron hemocultivos a partir de los ratones positivos en el quinto día posinoculación y las cepas aisladas se mantuvieron a 28°C mediante pasajes semanales en medio NNN con LIT suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado. Todas las cepas aisladas de *R. ecuadoriensis*, *R. colombiensis* y *R. pallescens* se caracterizaron como *T. rangeli* KP1(-), y las cepas aisladas de *R. prolixus* como *T. rangeli* KP1(+) mediante la amplificación de kDNA y del espaciador intergénico del gen mini-exón (17,19).

Estudio morfológico de los tripomastigotes sanguíneos en ratones ICR

Grupos de tres ratones ICR machos de ± 20 gramos se inocularon con 5×10^6 epimastigotes de las cepas de cultivo de *T. rangeli* KP1(-). Otros grupos de tres ratones ICR machos se inocularon con 400.000 tripomastigotes metacíclicos de cada cepa de *T. rangeli* KP1(+). Los ratones se examinaron a partir del tercer día de inoculación, se observó la parasitemia y se dibujaron en cámara lúcida 30 formas sanguíneas circulantes de cada una de las cepas en el quinto día posinoculación. En cada una de las formas dibujadas se midió la longitud total, la longitud del flagelo, las distancias del núcleo al extremo posterior y al extremo anterior, los índices nucleares y los índices del cinetoplasto (20,21). Se realizaron estimaciones de las medias de la longitud total

de los tripomastigotes sanguíneos de las cepas de *T. rangeli* en el quinto día posinfección con los respectivos intervalos de 95% de confianza y se efectuó análisis multivariado de varianza (MANOVA) utilizando el programa STATISTICA V4.5.

Estudio morfológico de *Trypanosoma rangeli* en diferentes hospederos vertebrados

Para evaluar pleomorfismos de las formas sanguíneas se seleccionó la cepa P53 de *T. rangeli* KP1(-) para infectar dos individuos de *Mus musculus*, *Didelphis marsupialis* y *Canis familiaris*, a los que se les inocularon formas de cultivo que contenían 2×10^6 parásitos por gramo de peso corporal. Los tripomastigotes sanguíneos se aislaron de la sangre de cada uno de los mamíferos, concentrándolos por centrifugación en tubo capilar, extendiéndolos y coloreándolos con Giemsa. Se dibujaron 30 tripomastigotes sanguíneos circulantes en ratón, canino y didélfido durante el tercer día posinoculación. A cada una de las formas dibujadas se les efectuó la toma de las medidas morfométricas y se realizaron estimaciones de las medias de la longitud total de los tripomastigotes sanguíneos de la cepa P53 de *T. rangeli* en el tercer día posinfección en cada uno de los mamíferos utilizados con los respectivos intervalos de 95% de confianza; se efectuó análisis multivariado de varianza (MANOVA) utilizando el programa STATISTICA V4.5.

Purificación de ADN y obtención de RAPD

El ADN genómico se extrajo de los cultivos de parásitos mediante el método de fenol-cloroformo seguido de precipitación con etanol y acetato de sodio. La concentración del ADN se determinó por electroforesis mediante comparación con patrones de concentración conocidos. Para la obtención del ADN polimorfo amplificado aleatorio (RAPD) se ensayaron 12 iniciadores a partir de los cuales se seleccionaron OPBG-02 (5'-GGAAAGCCCA-3') y OPBG-013 (5'-GGTTGGGC CA-3') (Operon Technologies, Inc.), los que permitieron obtener los patrones más discriminantes para analizar todas las cepas. Para las amplificaciones se utilizó un volumen final de reacción de 20 μ l que contenía 2 ml de buffer de *Taq* Polimerasa 10X (INVITROGEN), una mezcla

de dNTPs 200 mM dNTPs, $MgCl_2$ 3,5 mM, KCL 25 mM y 25 mM del iniciador, 1 unidad de *Taq* DNA polimerasa (INVITROGEN) y 10 ng de ADN. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se corrió en una termociclador M.J. Research PTC-150-16 y se sometió a 35 ciclos de amplificación. Los perfiles de temperatura para denaturación del ADN, hibridación y extensión del iniciador fueron 95°C por un minuto (con un tiempo inicial de 5 min), 30°C por un minuto y 72°C por un minuto, respectivamente, y una extensión final de 5 minutos. Los productos amplificados fueron separados en geles de poliacrilamida al 6% y coloreados con nitrato de plata (22). Los perfiles de RAPD se usaron para la construcción de una matriz binaria de acuerdo con la presencia (1) o ausencia (0) de las bandas. El análisis se efectuó con el programa RAPDPLOT versión 3.0 y se calculó la matriz de distancias a partir del índice de bandas compartidas (1-MATCH). El índice de bandas compartidas (M) se calculó usando la fórmula: $M = NAB/NT$, donde NAB es el número total de apareamientos entre los individuos A y B y NT es el número total de loci registrados (23). Con base en los resultados de los perfiles de RAPD se construyó un dendrograma por el método UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Means*) utilizando un *bootstrap* con 100 pseudoréplicas. Las distancias entre los grupos de parásitos se obtuvieron con el programa RAPDIST, con el cual se compararon las distancias genéticas de Nei (24), y se comprobó la consistencia de los datos de RAPD que soportan las ramas del dendrograma usando análisis de *bootstrap* con 100 pseudoréplicas.

Resultados

Morfología de los tripomastigotes sanguíneos en ratones ICR

Los resultados del estudio morfológico de 10 cepas de los tripomastigotes sanguíneos de *T. rangeli* en la sangre de ratones infectados experimentalmente mostró un elevado grado de polimorfismo de los parásitos en el quinto día de infección. Se observaron promedios en las longitudes totales de los tripomastigotes desde 32 hasta 39 μ m mostrando diferencias significativas entre las diferentes cepas analizadas (figura 1).

Morfología de *Trypanosoma rangeli* en diferentes hospederos vertebrados

Se observó que la cepa P53 de *T. rangeli* presentó diferencias estadísticamente significativas entre las tres especies de mamíferos. Los tripomastigotes sanguíneos fueron más cortos en ratón que en sangre de *Didelphis* y aun más cortos que los observados en sangre de perro (figura 2).

Obtención y análisis de RAPD

La figura 3 muestra uno de los geles de poliacrilamida al 6% con los productos amplificados y coloreados con nitrato de plata. Con base en los resultados de los perfiles de RAPD se construyó un dendrograma por el método UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Means*) utilizando un *bootstrap* con 100 pseudoréplicas (figura 4). De acuerdo con el

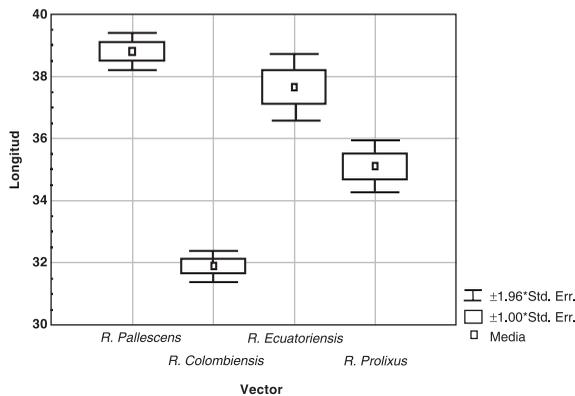


Figura 1. Comparación de las medias de la longitud total de 30 tripomastigotes sanguíneos de cada una de cuatro cepas estudiadas en ratones ICR en el quinto día posinoculación. Se compararon las cepas Gal 57, aislada de *R. pallescens*, P53, aislada de *R. colombiensis*, Perú 1, aislada de *R. ecuadoriensis*, y P19, aislada de *R. prolixus*.

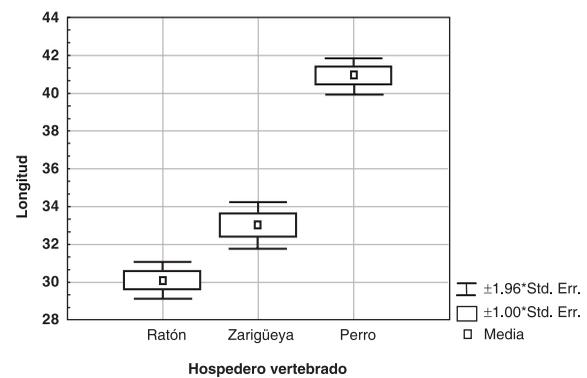


Figura 2. Comparación de las medias de la longitud total de 30 tripomastigotes sanguíneos de la cepa de *T. rangeli* P53 detectada en el tercer día posinoculación en ratón, zarigüeya y perro.

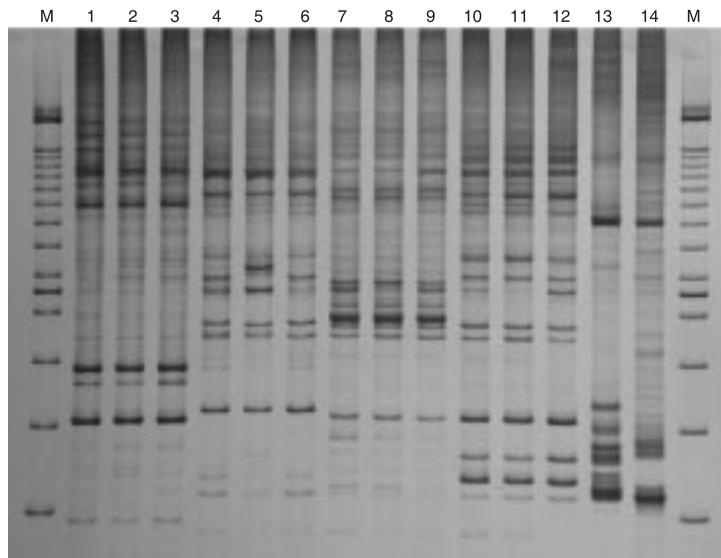


Figura 3. Perfiles de RAPD obtenidos a partir de 12 cepas de *T. rangeli* con el primer OPBG13. M corresponde al marcador de peso molecular. Las canaletas 1, 2 y 3 corresponden a las cepas de *T. rangeli* 444, 1545, 3123, respectivamente, aisladas de *R. prolixus*. Las canaletas 4, 5 y 6, corresponden a las cepas de *T. rangeli* Gal47, SO28 y SO48, respectivamente, aisladas de *R. pallescens*. Las canaletas 7, 8 y 9 corresponden a las cepas de *T. rangeli* Perú1, Perú1A y Perú2A, respectivamente, aisladas de *R. ecuadoriensis*. Las canaletas 10, 11 y 12 corresponden a las cepas de *T. rangeli* P53, TrS y Rcol, respectivamente, aisladas de *R. colombiensis*. La canaleta 13 corresponde a una cepa de *T. cruzi* I y la canaleta 14 corresponde a una cepa de *T. cruzi* II.

dendrograma, las doce cepas de *T. rangeli* se agruparon en dos ramas. Las cepas 3123, 444, y 1545 aisladas de *R. prolixus*, caracterizadas como *T. rangeli* KP1(+), formaron una rama y las otras nueve cepas aisladas de las glándulas salivares del grupo “palleescens”, conformado por *R. palleescens* (SO28, Gal 47, SO48), *R. colombiensis* (Rcol, P53, Trs) y *R. ecuadoriensis* (Perú 2A, Perú 1A, Perú 1), caracterizadas como *T. rangeli* KP1(-), formaron una segunda rama con tres subramas que correspondieron exactamente a cada una a las cepas aisladas de *R. palleescens*, *R. colombiensis* y *R. ecuadoriensis*. La figura 5 muestra las distancias de Nei entre los grupos de parásitos obtenidas con el programa RAPDIST.

Discusión

La interacción entre las subpoblaciones de tripanosomas con diferentes especies de triatomos, así como los mecanismos que regulan la transmisión, son importantes elementos para la documentación de la epidemiología de la tripanosomiasis americana. A partir de este enfoque será posible establecer cuáles subpoblaciones de tripanosomas son transmitidas por los vectores en una determinada área geográfica. De otra parte será igualmente posible conocer si existen diferencias en la susceptibilidad a la infección de los hospederos vertebrados. Adicionalmente, los estudios de la interacción tripanosoma-triatomino permitirán identificar procesos coevolutivos para fortalecer las hipótesis

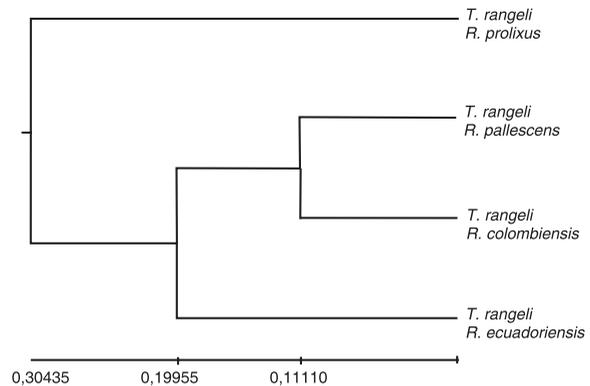


Figura 5. Dendrograma generado por RAPDDIST que muestra las distancias genéticas de Nei entre las cepas de *T. rangeli* aisladas de *R. prolixus*, *R. palleescens*, *R. colombiensis* y *R. ecuadoriensis* usando el algoritmo UPGMA y *bootstrap* de 100 seudoréplicas.

acerca de la filogenia y dispersión de los parásitos y de los vectores, contribuyendo así a aclarar la posición taxonómica de las especies semejantes a *T. cruzi* o a *T. rangeli* en América.

Se ha demostrado que las cepas de *T. rangeli* aisladas de las especies de *Rhodnius* del grupo «palleescens» (*R. palleescens*, *R. colombiensis* y *R. ecuadoriensis*) denominadas (KP1-) son genéticamente divergentes de las cepas aisladas del grupo «prolixus» (*prolixus*, *neglectus*) denominadas (KP1+) (9,17,18), lo que indica una posible asociación evolutiva entre las subpoblaciones de *T. rangeli* y los grupos de especies de *Rhodnius*.

La relación entre la diversidad genética del parásito y su transmisibilidad vectorial no está completamente entendida, pues se ha mostrado que las poblaciones de *T. cruzi* y *T. rangeli* difieren en su habilidad para sobrevivir, multiplicarse y diferenciarse en el insecto vector. También se ha mostrado que en una misma área geográfica existen diferencias significativas entre la proporción de genotipos de *T. cruzi* y *T. rangeli* detectados en los vectores y en los mamíferos. Estas diferencias podrían explicarse por la transmisión selectiva de algunos genotipos por parte de los vectores locales, que actuarían como filtros biológicos del parásito. Se ha demostrado que en Colombia *R. colombiensis*

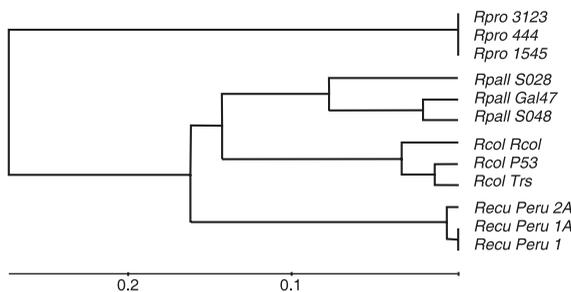


Figura 4. Fenograma generado por UPGMA basado en los perfiles de RAPD de 12 cepas de *Trypanosoma rangeli* aisladas de *Rhodnius prolixus* (Rpro), *R. palleescens* (Rpall), *R. colombiensis* (Rcol) y *R. ecuadoriensis* (Recu). Los números de la escala horizontal fueron derivados de la distancia calculada con el programa RAPDPLOT.

puede infectarse con *T. rangeli* KP1(-) y KP1(+), pero sólo transmite a KP1(-) a través de la picadura y que *R. prolixus* se infecta con *T. rangeli* KP1(-) y KP1(+), pero solo transmite por picadura a la subpoblación KP1(+) (17,18). Estos resultados demuestran que *R. prolixus* es susceptible a la infección de *T. rangeli* KP1(+), pero presenta una respuesta refractaria a la invasión de cepas de *T. rangeli* KP1(-) aisladas de *R. pallescens*, *R. colombiensis* y *R. ecuadoriensis*. El comportamiento diferencial en la transmisión de estas dos subpoblaciones se relaciona con la activación de la respuesta inmune del vector, en la que factores intrínsecos como la producción de hemocitos, nódulos y factores tripanolíticos limitan la infección parasitaria (25). Recientemente se detectó en la hemolinfa de *R. prolixus* un factor tripanolítico contra las cepas de *T. rangeli* KP1(-) que corresponde a una proteína termolábil, la cual sería un factor inmunológico para que *R. prolixus* actúe como filtro biológico de subpoblaciones de *T. rangeli* KP1(-) (datos no publicados).

En el presente trabajo se detectó un elevado polimorfismo de los tripomastigotes sanguíneos medidos en el quinto día posinoculación. El tamaño promedio de las cepas varió entre 32 y 39 μm , mostrando en general la existencia de grupos discretos (figura 1). Es interesante el hecho de que tres cepas aisladas de *R. pallescens* mostraron siempre tamaños promedios muy cercanos a los 40 μm (datos no mostrados), mientras que las cepas aisladas de *R. colombiensis*, *R. ecuadoriensis* y *R. prolixus* mostraron tamaños variables entre 32 y 39 μm . Esta observación sugiere la existencia de por lo menos dos grupos morfológicos de *T. rangeli*. Por otro lado, estos polimorfismos podrían ser el resultado de la transmisión selectiva de subpoblaciones del parásito, de manera que en las glándulas salivares del vector se desarrollaría cada vez una subpoblación con características morfológicas diferentes.

Dentro de una misma especie de tripanosoma pueden encontrarse variaciones morfológicas significativas que pueden conducir a la separación de una misma especie en dos o más especies diferentes (21). Varios autores han señalado polimorfismos o variaciones morfológicas de *T.*

rangeli cuando se infectan diferentes vertebrados con un mismo aislamiento. El pleomorfismo de los tripomastigotes sanguíneos detectado en el presente trabajo en ratón, *Didelphis* y perro al tercer día posinoculación revela que la longitud total de estas formas de *T. rangeli* sería dependiente del vertebrado en el cual se examina (figura 2). Estos resultados preliminares indican que probablemente el vertebrado también selecciona diferentes subpoblaciones del parásito, o que la morfología de *T. rangeli* sería dependiente de la respuesta inmune del hospedero vertebrado. El hallazgo de este carácter pleomórfico en *T. rangeli* podría contribuir a aclarar la posición taxonómica de los tripanosomas semejantes a *T. rangeli*, tales como *T. (H.) mesnilbrimontí*, *T. (H.) preguici*, *T. (H.) myrmecophage*, *T. (H.) mycetae*, *T. (H.) diasi*, *T. (H.) cebus*, *T. (H.) saimiri*, y *T. (H.) advieri*, entre otros, pues como se sabe, estos parásitos fueron clasificados como especies diferentes con base en diferencias de tamaño al ser comparados con cepas de *T. rangeli* aisladas de *R. prolixus*.

Los resultados de la caracterización molecular preliminar mediante RAPD de las cepas de *T. rangeli* (figura 4) muestran una clara divergencia entre el grupo de cepas KP1(+) y KP1(-), indicando la existencia de cuatro grupos de *T. rangeli* genéticamente divergentes y asociados con *R. prolixus*, *R. pallescens*, *R. colombiensis* y *R. ecuadoriensis*. Estos grupos difieren de los cuatro grupos de *T. rangeli* previamente detectados por Maia da Silva *et al.* (26), quienes utilizando análisis de RAPD encontraron un grupo formado por cepas de *T. rangeli* de Colombia, Venezuela, Honduras, la Isla de Marajó, Pará y Rondonia en Brasil, un segundo grupo formado por las cepas aisladas en Acre y Pará (Brasil), un tercer grupo formado por cepas aisladas en Panamá y el Salvador y un cuarto grupo formado por la cepa SC58 aislada en Santa Catarina (Brasil). Los resultados del presente trabajo, en conjunto con los de otros autores (26), indican que *T. rangeli* está formado por varios grupos genéticamente divergentes, probablemente asociados a diferentes especies de *Rhodnius*. Posteriores estudios filogenéticos en el grupo de cepas KP1(-), utilizando otros marcadores moleculares, podrían indicar si estas

cepas evolucionaron de norte a sur en el mismo sentido que se propone la evolución del cline conformado por las especies de vectores del grupo "pallenscens". Por otro lado, los estudios filogenéticos en el grupo de *T. rangeli* KP1(+) podrían arrojar información sobre la evolución de los parásitos y sus vectores.

Las distancias genéticas de Nei observadas por medio del análisis de isoenzimas en especies diferentes de un mismo género varían entre 0,162 y 0,3 en la mayoría de las especies (27). Las distancias obtenidas entre las subpoblaciones de *T. rangeli* en el presente trabajo (figura 5) indicaron que los grupos más próximos constituidos por las cepas aisladas de *R. pallenscens* y *R. colombiensis* presentaron una distancia genética de Nei de 0,11110; sin embargo, las cepas aisladas de *R. ecuadoriensis* presentaron una distancia genética de 0,19955 con relación al grupo *R. pallenscens*-*R. colombiensis*; por otro lado, el cálculo de la distancia genética de Nei entre poblaciones de *T. rangeli* con el empleo de RAPDIST mostró que las distancias entre *T. rangeli* KP1(-) y *T. rangeli* KP1(+) fueron de 0,30435, lo cual indica una gran divergencia genética entre estos dos grupos, semejante a la observada en especies diferentes de otros organismos (27).

Los resultados de la presente investigación señalan que la interacción *T. rangeli*-vector es un importante modelo, en el cual cada vector del género *Rhodnius* transmite subpoblaciones del parásito fenotípica y genotípicamente divergentes y que, por lo tanto, los vectores actuarían como filtros biológicos de dichas subpoblaciones. Es posible que ocurran fenómenos semejantes en la transmisión del agente causal de la enfermedad de Chagas, pues recientemente se han descrito seis subpoblaciones de *T. cruzi* (*T. cruzi* I, *T. cruzi* IIa, IIb, IIc, II d y II e) (28,29), que interactúan con más de 100 especies de triatomíneos en diferentes regiones de América Latina.

Conflicto de intereses

Los autores del presente artículo declaramos que no tenemos conflictos de intereses de orden académico, institucional u operacional en el momento de realización de la investigación.

Financiación

El presente trabajo recibió financiación de las siguientes instituciones: Instituto Colombiano "Francisco José de Caldas" (Colciencias), proyecto 1105-05-16919; Chagas Disease Intervention Activities-European Community (CDIA-EC), contrato No. ICA4-CT-2003-10049; SSA-EC: Trypanosomiasis Update y Fondo de Investigaciones de la Universidad del Tolima.

Referencias

1. **Marinkelle CJ.** Pathogenicity of *Trypanosoma rangeli* for *Rhodnius prolixus* Stal in nature. *J Med Entomol* 1968;5:497-9.
2. **Watkins R.** *Trypanosoma rangeli*: effect on excretion in *Rhodnius prolixus*. *J Invertebr Pathol* 1971;17:67-71.
3. **Watkins R.** Histology of *Rhodnius prolixus* infected with *Trypanosoma rangeli*. *J Invertebr Pathol* 1971;17:59-66.
4. **D'Alessandro-Bacigalupo A, Gore-Saravia N.** *Trypanosoma rangeli*. En: Kreier JP, editor. Parasitic protozoa. London: Academic Press; 1992.p.1-54.
5. **D'Alessandro-Bacigalupo A, Gore-Saravia N.** *Trypanosoma rangeli*. En: Gilles HM, editor. Protozoal diseases. Oxford: Oxford University Press; 1999. p.398-412.
6. **Guhl F, Hudson L, Marinkelle CJ, Morgan S, Jaramillo C.** Antibody response to experimental *Trypanosoma rangeli* infection and its implications for immunodiagnosis of South American trypanosomiasis. *Acta Trop* 1985;42:311-8.
7. **Guhl F, Hudson L, Marinkelle CJ, Jaramillo CA, Bridge D.** Clinical *Trypanosoma rangeli* infection as a complication of Chagas' disease. *Parasitology* 1987;94:475-84.
8. **Guhl F, Vallejo GA.** *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli* Tejera, 1920: an updated review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2003;98:435-42.
9. **Urrea DA, Carranza JC, Cuba CA, Gurgel-Gonçalves R, Guhl F, Schofield CJ, et al.** Molecular characterisation of *Trypanosoma rangeli* strains isolated from *Rhodnius ecuadoriensis* in Peru, *R. colombiensis* in Colombia and *R. pallenscens* in Panama, supports a co-evolutionary association between parasites and vectors. *Infect Genet Evol* 2005;5:123-9.
10. **Vallejo GA, Marinkelle CJ, Guhl F, De Sánchez N.** Comportamiento de la infección y diferenciación morfológica entre *Trypanosoma cruzi* y *T. rangeli* en el intestino del vector *Rhodnius prolixus*. *Rev Bras Biol* 1988;48:577-87.

11. **Guhl F, Jaramillo C, Carranza JC, Vallejo GA.** Molecular characterization and diagnosis of *Trypanosoma cruzi* and *T. rangeli*. Arch Med Res 2002;33:362-70.
12. **Macedo AM, Vallejo GA, Chiari E, Pena SD.** DNA fingerprinting reveals relationships between strains of *Trypanosoma rangeli* and *Trypanosoma cruzi*. En: Pena SD, Chakraborty R, Epplen JT, Jeffreys AJ, editors. DNA fingerprinting: state of the Science. Basel, Switzerland: Birkhauser Verlag; 1993. p.321-9.
13. **Vallejo GA, Macedo AM, Chiari E, Pena SD.** Kinetoplast DNA from *Trypanosoma rangeli* contains two distinct classes of minicircle with different size and molecular organization. Mol Biochem Parasitol 1994;67:245-53.
14. **Steindel M, Dias-Neto E, Pinto CJ, Grisard E, Menezes C, Murta SM, et al.** Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) and isoenzyme analysis of *Trypanosoma rangeli* strains. J Eukaryot Microbiol 1994;41:261-7.
15. **Toaldo CB, Steindel M, Sousa MA, Tavares CC.** Molecular karyotype and chromosomal localization of genes encoding 0-tubulina, cisteina proteinase, HSP 70 and actin in *Trypanosoma rangeli*. Mem Inst Oswaldo Cruz 2001;96:113-21.
16. **Vallejo GA, Guhl F, Chiari E, Macedo AM.** Specie specific detection of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* in vector and mammalian hosts by polymerase chain reaction amplification of kinetoplast minicircle DNA. Acta Trop 1999;72:203-12.
17. **Vallejo GA, Guhl F, Carranza JC, Lozano LE, Sánchez JL, Jaramillo JC, et al.** kDNA markers define two major *Trypanosoma rangeli* lineages in Latin America. Acta Trop 2002;81:77-82.
18. **Vallejo GA, Guhl F, Carranza JC, Moreno J, Triana O, Grisard EC.** Parity between kinetoplast DNA and minicircle gene sequences supports either clonal evolution or speciation in *Trypanosoma rangeli* strains isolated from *Rhodnius colombiensis*, *R. pallescens* and *R. prolixus* in Colombia. Infect Genet Evol 2003;3:39-45.
19. **Grisard EC, Campbell DA, Romanha AJ.** Mini-exon gene sequence polymorphism among *Trypanosoma rangeli* strains isolated from distinct geographical regions. Parasitology 1999;118:375-82.
20. **Hoare CA.** Herpetosoma from man and other mammals. En: The trypanosomes of mammals: a zoological monograph. Oxford: Blackwell Scientific Publications; 1972.p.288-314
21. **Ziccardi M, Lourenco-de-Oliveira R.** Polymorphism in trypomastigotes of *Trypanosoma (Megatrypanum) minasense* in the blood of experimentally infected squirrel monkey and marmosets. Mem Inst Oswaldo Cruz 1999;94:649-53.
22. **Sanguinetti CJ, Dias-Neto E, Simpson AJ.** Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. Biotechniques 1994;17:914-21.
23. **Black WC.** Statistical analysis of arbitrarily primed PCR patterns in molecular taxonomic studies. En: Clap CL, editor. Methods in molecular biology. Species diagnostics protocols: PCR and other nucleic acid methods. Vol. 50. Totowa, NJ: Humana Press; 1995. p.39-55.
24. **Nei M.** Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. Genetics 1978;89:583-90.
25. **Sánchez IP, Pulido XC, Carranza JC, Triana O, Vallejo GA.** Inmunidad natural de *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) frente a la infección con *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli* KP1(-) aislados de *Rhodnius pallescens*, *R. colombiensis* y *R. ecuadoriensis*. Revista de la Asociación Colombiana de Ciencias Biológicas 2005;17:108-18.
26. **Maia da Silva F, Rodrigues AC, Campaner M, Takata CS, Brigido MC, Junqueira AC, et al.** 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 2004;128:283-94.
27. **Thorpe JP, Solé-Cava AM.** The use of allozyme electrophoresis in invertebrate systematics. Zool Scr 1994;23:3-18
28. **Brisse S, Barnabé C, Tibayrenc M.** Identification of six *Trypanosoma cruzi* phylogenetic lineages by random amplified polymorphic DNA and multilocus enzyme electrophoresis. Int J Parasitol 2000;30:35-44.
29. **Brisse S, Verhoef J, Tibayrenc M.** Characterization of large and small subunit rRNA and mini-exon genes further supports the distinction of six *Trypanosoma cruzi* lineages. Int J Parasitol 2001;31:1218-26.