

## **Análisis cuantitativo del crecimiento y cambio morfométrico en poblaciones de *Leishmania chagasi* y *Trypanosoma cruzi* mantenidos en cultivos axénicos puros y mixtos**

**Carmen Duran<sup>1</sup>, Dubrasyka Rodríguez-Bolívar<sup>2</sup>, Antonio Roschman-Gonzalez<sup>3</sup>, Mirian Strauss<sup>4</sup> & Felix Tejero<sup>2</sup>**

Las relaciones que se establecen entre géneros de la familia Trypanosomatidae en condiciones de coexistencia en el mismo medioambiente pueden estar vinculadas a respuestas compensatorias inter-poblacionales que incluyen cambios morfológicos (diferentes estadios) y morfométricos (diferencias mensurables). El análisis cuantitativo de tales respuestas en cultivos axénicos puros de *Leishmania chagasi* y *Trypanosoma cruzi*, así como en isomezclas axénicas de *L. chagasi*-*T. cruzi* mantenidas *in vitro*, no ha sido abordado, desconociéndose por lo tanto, particularidades biológicas. Muestras interdiarias de cultivo se fijaron, colorearon, observaron, digitalizaron y procesaron cuantitativamente. Además de cuantificar las densidades poblacionales, se registraron las magnitudes numéricas de variables morfométricas que, posteriormente, se analizaron con herramientas estadísticas. Los resultados indicaron cambios específicos en las variables investigadas, así como heterogeneidad morfométrica entre los mismos morfotipos de los mismos géneros al ser mantenidos en cultivos puros o mixtos. Los modelos de cambio morfométrico de *L. chagasi* y *T. cruzi* en cultivos puros difieren de los modelos de cambio morfométrico en los cultivos mixtos (*L. chagasi*-*T. cruzi*). Las metodologías biométricas discriminan, en términos morfométricos, poblaciones del mismo estadio (morfotipo) en ambientes diferentes.

**Palabras clave:** *Leishmania chagasi*, *Trypanosoma cruzi*, morfometría, *in vitro*.

### INTRODUCCIÓN

*Leishmania chagasi* y *Trypanosoma cruzi* son los agentes etiológicos de importantes y heterogéneas patologías humanas (WHO, 1990; WHO, 1991) que, además, pueden establecer infecciones simultáneas en mamíferos (incluyendo humanos) de la misma área geográfica (Travi *et al.*, 1994; Corredor-Arjona *et al.*, 1999; Bastrenta *et al.*, 2003; Mendes *et al.*, 2007).

La diversidad de la severidad de la Enfermedad de Chagas y otras infecciones por tripanosomas, entre

otras cualidades, ha sido atribuida al pleomorfismo (Andrade, 1985; Brener, 1985; Guzmán-Marín *et al.*, 1999; Ziccardi & Lourenço-de-Oliveira, 1999; Karbowiak & Wita, 2004; Davies *et al.*, 2005), fenómeno que corresponde a la variabilidad celular que expresa un genotipo originando diferentes fenotipos como respuesta acomodaticia a las condiciones ambientales (Overath *et al.*, 1983). Es más, en el torrente circulatorio de los mamíferos pueden coexistir tripanosomas del mismo estadio, reconocibles morfológica y morfométricamente (Urdaneta-Morales, 1983; Tyler *et al.*, 1997; Urdaneta-Morales & Tejero, 1992). En el género *Leishmania* la situación es un tanto controversial. Urdaneta & Scorza (1982), describieron especies venezolanas de *Leishmania* con criterios morfométricos, y está bien documentada la heterogeneidad morfológica de los promastigotes en el tubo digestivo de los Phlebotominae (Walters *et al.*, 1989; Killick-Kendrick & Rioux, 1991; Walters *et al.*, 1993; Gossage *et al.*, 2003; Bates & Rogers, 2004), a pesar de lo cual Lukes *et al.* (2007) establecieron que

<sup>1</sup> Escuela de Medicina "Luis Razetti". Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela. Caracas.

<sup>2</sup> Instituto de Zoología y Ecología Tropical, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela. Caracas.

<sup>3</sup> Centro de Microscopía Electrónica. Escuela de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela. Caracas.

<sup>4</sup> Instituto de Medicina Tropical, Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela. Caracas.

\*Autor de correspondencia: felixtejero@gmail.com

las leishmanias del grupo donovani son indistinguibles en términos clínicos y morfológicos.

En este contexto de diversidad morfológica, Rohlf & Marcus (1993) y Adams & Funk (1997) establecieron que, al margen de expresar las características genéticas de los organismos, podría indicar multiplicidad de estadios de desarrollo, diversidad de orígenes geográficos e, incluso, resultaría de la acción de efectos ambientales sobre los organismos. Si bien la heterogeneidad genómica de los Kinetoplastida se ha revisado (Simpson *et al.*, 2006), la diversidad morfológica ha sido poco considerada.

El estudio de la dimensionalidad de los Trypanosomatidae, incluyendo *L. chagasi* y *T. cruzi*, históricamente se ha restringido al registro puntual del tamaño en un momento particular del ciclo de vida (Vickerman, 1976; Vickerman & Preston, 1976; Lom, 1979; Molyneux y Ashford, 1983; Gardiner, 1989; Ashford y Crewe, 2003; Tayler & Engman, 2001; Kochhar, 2004). No obstante, Urdaneta-Morales & Tejero (1992), caracterizaron morfológicamente secuencias pleomórficas en los tripomastigotes hematozoicos de *T. rangeli*, un parásito que según Guhl *et al.* (1987), complica las infecciones humanas por *T. cruzi*.

A pesar de estos antecedentes, el análisis cuantitativo del cambio morfológico como función del tiempo que se presenta en cultivos puros de *L. chagasi* y *T. cruzi*, así como en cultivos mixtos (*L. chagasi-T. cruzi*) es un tema no investigado que merece atención por cuanto Durán *et al.* (2009), demostraron que *L. chagasi*, *T. cruzi* e isomezclas de *L. chagasi* y *T. cruzi* mantenidas *in vitro* utilizan diferencialmente los sustratos tróficos del medio de cultivo. Así, la caracterización cuantitativa del cambio morfológico pudiera ser útil en el diseño de estrategias de control de estos importantes parásitos humanos.

Mediante la estimación del crecimiento de las poblaciones y del registro numérico de variables morfológicas indicadas por Hoare (1972), en este trabajo se investigaron las características cuantitativas del cambio morfológico a lo largo del desarrollo de poblaciones de *L. chagasi* y *T. cruzi* mantenidas en cultivos axénicos puros, así como de isomezclas axénicas *L. chagasi-T. cruzi*.

## MATERIALES Y METODOS

Se emplearon las cepas MHOM/BR/74/PP75 de *L. chagasi* e Y de *T. cruzi*. Los parásitos se mantuvieron en medio bifásico "Brain Heart Infusion" (BHI) con fase líquida de NaCl 0,85% y glucosa 1% a la que se añadieron 0,1 mg/mL de gentamicina, 100 IU/mL de penicilina, 0,1 mg/mL de estreptomina y 250 µg/mL de anfotericina B, todo a pH final  $7,4 \pm 0,2$ . Los experimentos consistieron en tres grupos: cultivos axénicos puros de *L. chagasi*, cultivos axénicos puros de *T. cruzi* y cultivos axénicos mixtos *L. chagasi-T. cruzi* (1:1).

En la fase líquida del medio BHI se sembraron  $0,2 \times 10^6$  flagelados/mL provenientes de cultivos que se encontraban en el punto medio de la fase de crecimiento exponencial. Los cultivos se realizaron en matraces Erlenmeyer de 500 mL con tapa de rosca no apretada provistos de medio bifásico BHI, mantenidos a 26°C en reposo (sólo se agitaron con movimientos elípticos al momento de tomar las muestras) y sin mezcla particular de gases.

Interdiariamente durante 35 días, de la fase líquida de cada grupo experimental (*L. chagasi*, *T. cruzi* y *L. chagasi-T. cruzi*) se tomaron 10 µL; con 5 µL se cuantificó el crecimiento de las formas viables (Freshney, 1987) en cámara de Neubauer (400x) y con los 5 µL restantes se hicieron extendidos sobre portaobjetos que se fijaron (glutaraldehído 0,25% en amortiguador fosfato salino glucosado) y colorearon (Giemsa 10%).

Los extendidos fueron observados en microscopio óptico (1000X) provisto de cámara digital. Siguiendo un patrón de avance sistemático (Gundersen, 1978; Miles, 1978), se registraron 60 promastigotes/extendido en el cultivo puro de *L. chagasi*, 60 epimastigotes/extendido en el cultivo puro de *T. cruzi*, así como 30 epimastigotes/extendido y 30 promastigotes/extendido en el cultivo mixto (*L. chagasi-T. cruzi*). Los argumentos establecidos por Fernández (1996) garantizaron la pertinencia del tamaño muestral y la robustez del análisis estadístico realizado. En cada uno de los parásitos se determinó la magnitud numérica de la longitud total (LT), la longitud corporal sin incluir el largo del flagelo libre (LC), el ancho máximo a nivel del núcleo (A), la distancia que separa el extremo anterior del centro del núcleo (AN), la distancia que se encuentra entre el extremo

posterior y el centro del núcleo (PN), la distancia que hay del centro del núcleo al centro del cinetoplasto (CN), la distancia que se encuentra entre el extremo anterior y el centro del cinetoplasto (AC), la distancia que se encuentra entre el extremo posterior y el centro del cinetoplasto (PC) y la longitud del flagelo libre (F), tal cual lo estableció Hoare (1972). Además, se calculó la superficie del núcleo (SN), la superficie del cinetoplasto (SC) y la superficie total sin incluir el flagelo libre (ST).

Si bien los conteos del número de organismos viables por mililitro de sobrenadante se realizaron con todos los estadios observados, el registro dimensional y el cálculo de las superficies sólo se hizo con promastigotes (*L. chagasi*) y epimastigotes (*T. cruzi*), ya que la metodología empleada no permite diferenciar interespecíficamente los otros estadios observados (amastigotes, esferoastigotes y formas aberrantes). Los registros numéricos y los cálculos de las superficies se hicieron sobre imágenes digitales empleando el programa de dominio público "Image Processing and Analysis in Java" (ImageJ).

El tratamiento cuantitativo se emprendió con Análisis de la Varianza (ANOVA) (Sokal & Rohlf, 1995), Análisis de Residuos en Tablas de Contingencia (ARTC) (Bulla, 1981; Bulla, 1995), Ajuste Local Ponderado por el método de los Mínimos Cuadrados (LOWESS) (Cleveland, 1979; Cleveland & Devlin, 1988) y Análisis de Componentes Principales (ACP) (Jolliffe, 1986). Las pruebas estadísticas se realizaron con los programas Statistica 7.0 y MVSP 3.1.

Los experimentos por triplicado se repitieron tres veces con lotes diferentes de parásitos y medio de cultivo.

## RESULTADOS

La cinética de cambio en la densidad de las poblaciones muestra los picos máximos y mínimos del número de organismos viables/ml, así como el tiempo requerido para alcanzarlos; los resultados sugieren diferencias entre los tres grupos experimentales. Nótese además que la curva correspondiente al cultivo mixto (*L. chagasi-T. cruzi*) pareciera diferir de sus contrapartes puras. No obstante los rangos de error estándar insinúan similitudes consistentes, al menos en porciones particulares de las curvas (Fig. 1).

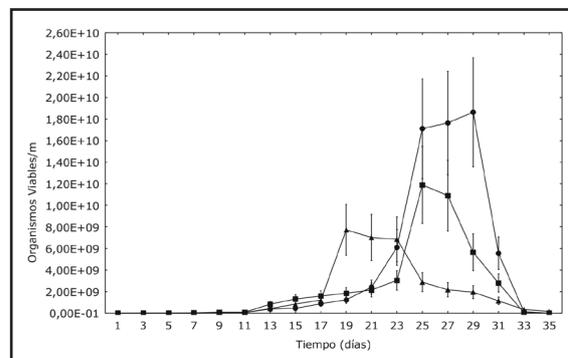
El análisis de los puntos que configuran la Fig. 1 se acometió mediante un ANOVA de una vía, prueba que con base en la varianza global observada, compara la significancia de las semejanzas o diferencias de las medias de más de dos conjuntos de datos (Sokal & Rohlf, 1995); los resultados obtenidos indican claramente que al menos dos de las medias representadas en la Fig. 1, son diferentes (Tabla I).

Los resultados de la Tabla I, si bien indica diferencias significativas en las medias, no aporta información referente a la dinámica del cambio en sí. En consecuencia, se procedió con un ARTC, ensayo que, mediante el estadístico  $\chi^2$ , estudia la diferencia entre valores observados y esperados (residuos) evaluando la desviación de la hipótesis de independencia u homogeneidad (Bulla, 1981; Bulla, 1995); el ARTC compara cuantitativamente los perfiles de las curvas de la Fig. 1. En el ARTC (Fig. 2) las barras representan los perfiles de las curvas examinadas (*L. chagasi*, *T. cruzi* y *L. chagasi-T. cruzi*). Si el residuo de

**Tabla I. Resumen del Análisis de la Varianza sobre los datos de cambio temporal del número de organismos viables por mililitro de sobrenadante de medio "Brain Heart Infusion". F: F de Fischer; P: probabilidad asociada; significancia  $P < 0,05$ .**

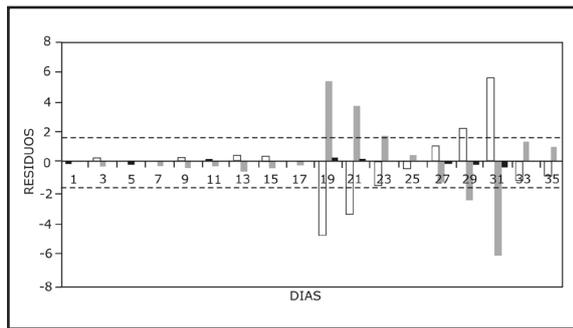
	F	P
<i>Leishmania chagasi</i> (cultivo puro)	8,133	0,000
<i>Trypanosoma cruzi</i> (cultivo puro)	7,488	0,000
<i>L. chagasi-T. cruzi</i> (cultivo mixto)	10,507	0,000

**Fig. 1. Número de organismos viables por mililitro de sobrenadante de medio Brain Heart Infusion. *Leishmania chagasi*: ●; *Trypanosoma cruzi*: ■; y *Leishmania chagasi-Trypanosoma cruzi*: ▲. Los intervalos corresponden a los errores estándar.**



una barra es 0, la barra no aparece representada. Por su parte, si una barra sobrepasa la línea punteada, implica que existe diferencia significativa en el residual. En la figura también se demuestra que los perfiles de las curvas de la Fig. 1, son diferentes en función del tiempo. La probabilidad asociada al  $\chi^2$  ( $P = 0,0003$ ) avala la robustez del análisis.

**Fig. 2. Representación gráfica del Análisis de Residuos sobre las curvas de cambio de número de organismos viables por mililitro de sobrenadante de medio Brain Heart Infusion en los cultivos puros de *Leishmania chagasi* (columnas blancas), *Trypanosoma cruzi* (columnas grises) y *Leishmania chagasi* - *Trypanosoma cruzi* (columnas negras). La línea punteada corresponde al intervalo de significancia para  $P < 0,05$ .**



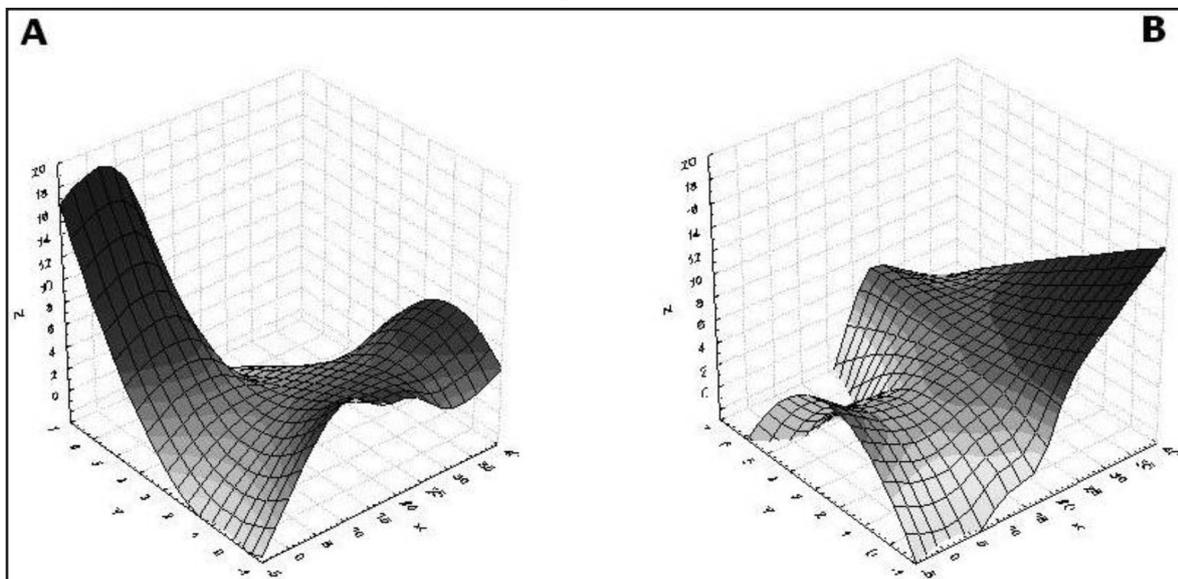
Con base en la reducción dimensional experimentada, en criterios de significancia estadística (datos no mostrados) y de la preeminencia morfológica que características como longitud total, ancho máximo y distancia núcleo-cinetoplasto tienen sobre la forma de los promastigotes y los epimastigotes, las magnitudes numéricas de las variables LT, A y CN se utilizaron en ensayos biométricos exploratorios como primera aproximación cuantitativa al entendimiento del cambio morfométrico en promastigotes de *L. chagasi* y epimastigotes de *T. cruzi* bajo estrés selectivo *in vitro*.

La Tabla II presenta las medias y el error estándar que las variables LT, A, CN de *L. chagasi* y *T. cruzi* alcanzaron en cultivos puros y mixtos.

Resalta la continua y drástica reducción registrada en las magnitudes numéricas de las variables LT, A y CN. Es más, a modo de ejemplo arquetípico de la relación forma-función cabe añadir que partir del día 17 no fue posible iniciar nuevos cultivos utilizando este material como siembra para establecer nuevos cultivos (datos no mostrados).

Ciertamente que los números presentados en la Tabla II son diferentes, pero carecen de significancia estadística. El ANOVA (Sokal & Rohlf, 1995) realizado

**Fig. 3. Representación gráfica del Ajuste Localmente Ponderado por el método de los Mínimos Cuadrados sobre las variables Longitud Total, Ancho Máximo y Distancia Núcleo-Cinetoplasto en promastigotes de *Leishmania chagasi* mantenidos en cultivo puro (A) y cultivo mixto (B). X: Longitud Total ( $\mu\text{m}$ ); Y: Ancho Máximo ( $\mu\text{m}$ ); Z: Distancia Cinetoplasto-Núcleo ( $\mu\text{m}$ ).**



**Tabla II. Magnitudes numéricas y errores estándar de las variables LT, A y CN registradas sobre promastigotes de *Leishmania chagasi* en cultivo puro y mixto, y epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* en cultivo puro y mixto.**

Día	Cultivos Puros ( <i>Leishmania</i> )			Cultivos Puros ( <i>Trypanosoma</i> )		
	Promastigotes			Epimastigotes		
	LT	A	CN	LT	A	CN
1	20,77 ± 1,45	1,22 ± 0,10	4,34 ± 0,29	18,31 ± 0,69	2,24 ± 0,15	3,52 ± 0,23
3	20,25 ± 1,09	1,36 ± 0,10	4,05 ± 0,22	18,32 ± 0,60	2,25 ± 0,16	3,53 ± 0,19
5	20,42 ± 1,04	1,50 ± 0,07	4,05 ± 0,26	19,49 ± 0,94	2,40 ± 0,16	3,68 ± 0,23
7	19,64 ± 0,97	1,57 ± 0,09	3,54 ± 0,24	20,65 ± 0,81	2,68 ± 0,18	3,63 ± 0,16
9	20,20 ± 0,94	1,71 ± 0,07	3,57 ± 0,23	20,84 ± 0,82	2,42 ± 0,10	3,85 ± 0,22
11	19,65 ± 0,87	1,80 ± 0,09	3,21 ± 0,27	21,80 ± 0,92	2,86 ± 0,16	3,70 ± 0,17
13	19,11 ± 1,19	1,66 ± 0,12	3,30 ± 0,24	20,79 ± 1,17	2,87 ± 0,19	3,41 ± 0,27
15	15,68 ± 1,47	1,55 ± 0,14	2,79 ± 0,27	19,73 ± 1,61	2,53 ± 0,24	3,52 ± 0,32
17	15,19 ± 1,81	1,62 ± 0,19	2,28 ± 0,30	18,50 ± 2,04	2,37 ± 0,31	3,13 ± 0,39
19	12,94 ± 1,86	1,40 ± 0,19	1,71 ± 0,26	16,06 ± 2,17	2,37 ± 0,33	2,52 ± 0,40
21	11,19 ± 1,83	1,25 ± 0,20	1,49 ± 0,28	15,92 ± 2,52	1,93 ± 0,33	2,28 ± 0,46
23	10,38 ± 2,04	1,06 ± 0,21	1,54 ± 0,32	12,79 ± 2,44	1,82 ± 0,38	1,87 ± 0,42
25	9,45 ± 2,20	0,88 ± 0,20	0,97 ± 0,25	11,73 ± 2,53	1,60 ± 0,40	1,51 ± 0,38
27	7,89 ± 2,09	0,79 ± 0,21	1,00 ± 0,29	8,92 ± 2,27	1,33 ± 0,37	1,38 ± 0,42
29	6,21 ± 1,61	0,59 ± 0,19	0,56 ± 0,20	7,04 ± 2,15	0,97 ± 0,31	1,31 ± 0,43
31	5,15 ± 1,80	0,55 ± 0,20	0,63 ± 0,26	5,23 ± 2,06	0,74 ± 0,29	0,68 ± 0,29
33	4,54 ± 0,73	0,38 ± 0,18	0,38 ± 0,19	5,10 ± 1,65	0,55 ± 0,28	0,43 ± 0,23
35	4,67 ± 1,16	0,20 ± 0,15	0,11 ± 0,08	4,91 ± 1,37	0,31 ± 0,24	0,40 ± 0,28
Día	Cultivos Mixtos ( <i>Leishmania</i> + <i>Trypanosoma</i> )					
	Promastigotes			Epimastigotes		
	LT	A	CN	LT	A	CN
1	13,79 ± 0,74	2,00 ± 0,11	2,69 ± 0,29	14,55 ± 0,74	2,83 ± 0,76	3,12 ± 0,17
3	14,33 ± 0,49	1,97 ± 0,11	2,91 ± 0,27	15,16 ± 0,75	2,97 ± 0,80	2,98 ± 0,17
5	16,18 ± 0,50	2,00 ± 0,08	3,31 ± 0,27	15,44 ± 0,61	2,61 ± 0,57	3,27 ± 0,11
7	15,45 ± 0,49	2,12 ± 0,09	3,66 ± 0,22	15,91 ± 0,65	1,84 ± 0,11	3,04 ± 0,14
9	16,32 ± 0,48	1,95 ± 0,09	3,66 ± 0,26	14,85 ± 0,45	1,89 ± 0,10	3,20 ± 0,13
11	16,71 ± 0,52	2,18 ± 0,08	3,64 ± 0,27	15,82 ± 0,54	2,17 ± 0,10	3,25 ± 0,14
13	16,66 ± 0,84	1,84 ± 0,10	3,62 ± 0,26	13,92 ± 0,89	1,77 ± 0,12	2,83 ± 0,17
15	13,55 ± 1,22	1,72 ± 0,15	3,28 ± 0,31	13,54 ± 1,23	1,75 ± 0,16	2,77 ± 0,25
17	11,79 ± 1,48	1,63 ± 0,19	3,03 ± 0,37	12,16 ± 1,36	1,84 ± 0,20	2,37 ± 0,28
19	11,46 ± 1,77	1,41 ± 0,19	2,83 ± 0,39	11,05 ± 1,47	1,45 ± 0,20	2,27 ± 0,34
21	9,72 ± 1,69	1,37 ± 0,22	2,29 ± 0,39	9,63 ± 1,54	1,11 ± 0,19	1,57 ± 0,31
23	8,78 ± 1,84	1,23 ± 0,23	2,20 ± 0,41	8,48 ± 1,63	1,13 ± 0,22	1,59 ± 0,36
25	7,27 ± 1,80	0,92 ± 0,21	1,82 ± 0,43	6,82 ± 1,54	0,85 ± 0,21	1,24 ± 0,34
27	6,94 ± 1,88	0,81 ± 0,22	1,65 ± 0,44	6,37 ± 1,69	0,72 ± 0,20	1,03 ± 0,32
29	6,91 ± 1,85	0,64 ± 0,21	1,35 ± 0,43	6,80 ± 1,49	0,60 ± 0,19	0,76 ± 0,29
31	5,19 ± 1,68	0,48 ± 0,18	1,19 ± 0,45	5,25 ± 1,61	0,59 ± 0,22	0,48 ± 0,24
33	4,85 ± 1,34	0,23 ± 0,13	0,44 ± 0,24	4,98 ± 1,03	0,27 ± 0,13	0,25 ± 0,17
35	4,79 ± 1,24	0,12 ± 0,12	0,45 ± 0,31	4,89 ± 0,75	0,22 ± 0,15	0,20 ± 0,19

sobre las medias de las variables LT, A y CN registradas durante 35 días en promastigotes de *L. chagasi* mantenidos en cultivo puro y mixto, así como en los epimastigotes de *T. cruzi* presentes en cultivo puro y mixto (Tabla I), demostró diferencias significativas (Tabla III).

El ANOVA probó inequívocamente que existen diferencias entre las medias de las variables LT, A y CN de promastigotes y epimastigotes, pero no aportó información acerca del proceso de cambio que esas variables experimentan a lo largo de los 35 días de cultivo. Es evidente que esta heterogeneidad dimensional resume un proceso natural más complejo enmarcado en el contexto de la historia del decrecimiento de las variables LT, A y CN *in vitro*, que se debe abordar en un contexto dinámico capaz de explorar y relacionar los patrones de cambio registrados en las variables seleccionadas.

**Tabla III. Resumen del Análisis de la Varianza sobre las magnitudes numéricas de los registros de Longitud Total (LT), Ancho Máximo (A) y distancia Núcleo-Cinetoplasto (CN) de promastigotes de *Leishmania chagasi* y epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* mantenidos en cultivo puro o mixto. F: F de Fischer; P: probabilidad asociada; significancia  $P < 0,05$ .**

	F	P
Longitud Total (LT) de promastigotes (cultivo puro)	20,46	0,000
Ancho Máximo (A) de promastigotes (cultivo puro)	9,66	0,000
Distancia Cinetoplasto-Núcleo (CN) de promastigotes (cultivo puro)	31,99	0,000
Longitud Total (LT) de promastigotes (cultivo mixto)	13,90	0,000
Ancho Máximo (A) de promastigotes (cultivo mixto)	18,01	0,000
Distancia Cinetoplasto-Núcleo (CN) de promastigotes (cultivo mixto)	9,95	0,000
Longitud Total (LT) de epimastigotes (cultivo puro)	14,57	0,000
Ancho Máximo (A) de epimastigotes (cultivo puro)	8,89	0,000
Distancia Cinetoplasto-Núcleo (CN) de epimastigotes (cultivo puro)	15,30	0,000
Longitud Total (LT) de epimastigotes (cultivo mixto)	18,15	0,000
Ancho Máximo (A) de epimastigotes (cultivo mixto)	6,55	0,000
Distancia CinetoplastoNúcleo (CN) de epimastigotes (cultivo mixto)	21,49	0,000

El LOWESS es un modelo estadístico generador de una función de superficie que evidencia gráficamente asociaciones entre variables continuas (Cleveland, 1979; Cleveland & Devlin, 1988). En este caso particular presenta en planos tridimensionales (3D) las pautas de cambio en las relaciones que se establecen entre las variables LT, A y CN de promastigotes y epimastigotes mantenidos en cultivos puros y mixtos en medio BHI.

Mediante planos (3D), la Fig. 3 muestra diferencias en las relaciones dinámicas que se establecen entre las variables LT, A y CN de promastigotes de *L. chagasi* a lo largo de los 35 días de cultivo; el plano de la Figura 3A corresponde a las relaciones en el cultivo puro y el de la Figura 3B en el cultivo mixto.

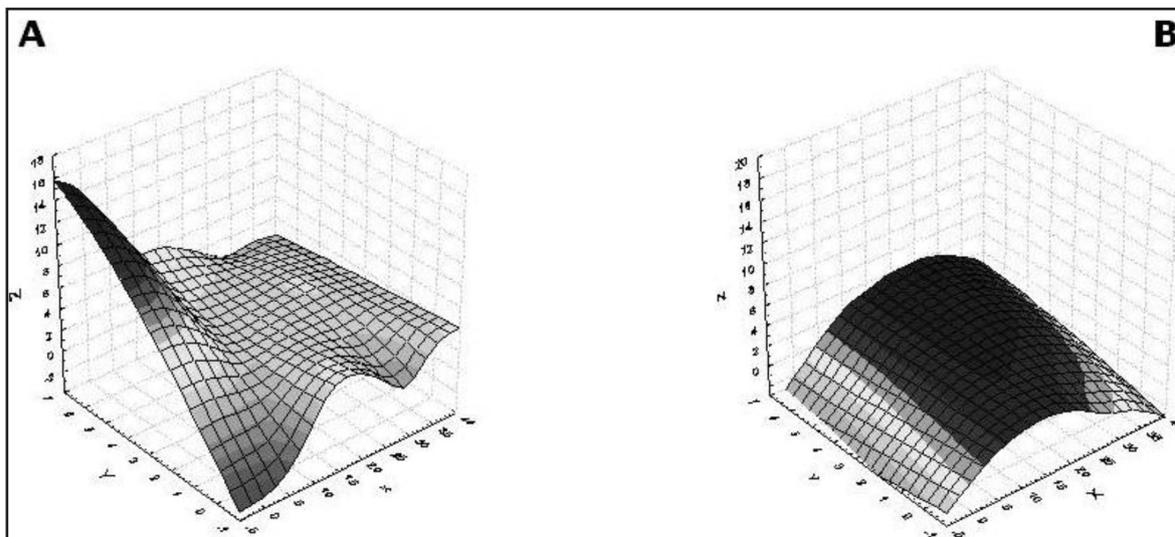
Los planos 3D que se presentan en la Fig. 4 evidencian las relaciones que aparecen entre las variables LT, A y CN de los epimastigotes de *T. cruzi* presentes en cultivos puros y en cultivos mixtos en medio BHI; el plano de la Fig. 4A corresponde a las relaciones en el cultivo puro y el de la Figura 4B en el cultivo mixto.

Las Fig. 3 y 4 presentan planos 3D de geometría variable, cuyos cambios demuestran que las relaciones establecidas entre las variables LT, A y CN cuando los parásitos se mantienen en cultivos puros y mixtos, no son iguales.

El estudio exploratorio de las variables LT, A y CN es acotado, por cuanto sólo considera 3 de las 12 variables morfométricas investigadas, restringiendo en consecuencia, la percepción de la heterogeneidad del proceso de cambio. La realidad experimental es más amplia y requiere, por lo tanto, un enfoque integrador de naturaleza multivariante.

El ACP es una técnica multivariante descriptiva que, con mínima pérdida de información, presenta las medidas numéricas de múltiples variables en un espacio 2D o 3D donde se aprecian relaciones que, de otra manera, permanecerían encubiertas (Jolliffe, 1986). El ACP permite visualizar en un espacio 3D nubes de puntos ubicados en un hiperespacio original n-dimensional. La bondad del modelo reside en la distorsión mínima que ejerce sobre las variables al ubicarlas en un espacio comprensible. La capacidad de compresión de variables del modelo redujo las variables analizadas de un hiperespacio de

**Fig. 4.** Representación gráfica del Ajuste Localmente Ponderado por el método de los Mínimos Cuadrados sobre las variables Longitud Total, Ancho Máximo y Distancia Núcleo-Cinetoplasto en epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* mantenidos en cultivo puro (A) y cultivo mixto (B). X: Longitud Total ( $\mu\text{m}$ ); Y: Ancho Máximo ( $\mu\text{m}$ ); Z: Distancia Cinetoplasto-Núcleo ( $\mu\text{m}$ ).



doce dimensional (12 ejes) a un nuevo espacio 3D que explica el 70,727% de la varianza total del sistema. Los autovalores (varianza) expresan la longitud de cada uno de los ejes (componentes) y no son crecientes; como era de esperarse la máxima varianza corresponde al primer componente (38,496%). La Tabla IV resume los resultados del ACP.

La Fig. 5 corresponde a la representación 3D de los resultados proporcionados por el ACP.

La Fig. 5 muestra cuatro nubes de puntos representadas en un espacio 3D que corresponden a las magnitudes numéricas de las variables morfométricas registradas en los promastigotes de *L. chagasi* en cultivo puro (nube 1) y mixto (nube 2), así como

**Tabla IV. Cuadro resumen del Análisis de Componentes Principales sobre las variables morfométricas registradas y calculadas en los cultivos puros de *Leishmania chagasi*, *Trypanosoma cruzi* y en los cultivos mixtos de *Leishmania chagasi-Trypanosoma cruzi*.**

	Eje 1	Eje 2	Eje 3
Autovalor	6,159	3,398	1,759
Porcentaje de varianza	38,496	21,24	10,992
Porcentaje acumulado de varianza	38,496	59,735	70,727

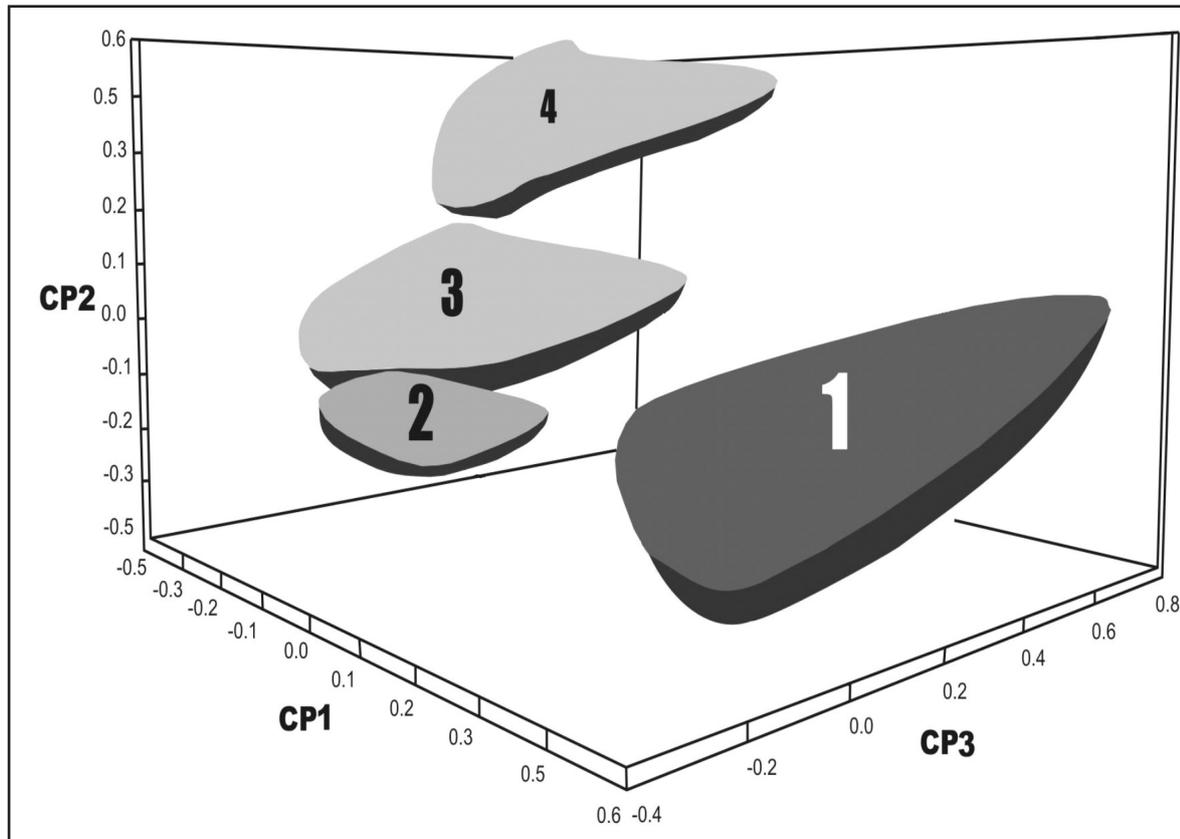
de los epimastigotes de *T. cruzi* en cultivo mixto (nube 3) y puro (nube 4). Los conjuntos numéricos están representados en un espacio reducido 3D en el que destaca la segregación de las nubes, llamando particularmente la atención las correspondientes al mismo estadio en condiciones de cultivo diferente (puro o mixto). También se aprecia mayor separación entre las nubes de *L. chagasi* (promastigotes en cultivo puro y mixto) que en las de *T. cruzi* (epimastigotes en cultivo puro y mixto).

## DISCUSIÓN

Las variaciones observadas en la densidad de las poblaciones de *L. chagasi* y *T. cruzi* en cultivos puros, así como de las isomezclas (*L. chagasi-T. cruzi*), mostraron patrones gráficos, a primera vista disímiles (Fig. 1), caracterizados por picos poblacionales máximos desiguales que aparecen a tiempos diferentes, son particularidades que en el ARTC se representan como barras positivas y negativas que, con significancia estadística, demuestran gráficamente la disparidad de las curvas de variación de la densidad poblacional en la fase líquida del medio BHI (Fig. 2).

La presencia de curvas con picos de densidades poblacionales particulares indicaría la expresión de propiedades morfo-funcionales

**Fig. 5.** Análisis de Componentes Principales sobre las dimensiones de promastigotes de *Leishmania chagasi* y epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* en cultivos puros y mixtos (*Leishmania chagasi*-*Trypanosoma cruzi*). Las nubes corresponden a condiciones particulares: 1, promastigotes de *Leishmania chagasi* en cultivo puro; 2, promastigotes de *Leishmania chagasi* en cultivo mixto; 3, epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* en cultivo mixto; y 4, epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* en cultivo puro. CP1: Componente Principal 1; CP2: Componente Principal 2 y CP3: Componente Principal 3.



específicas en los cultivos puros de *L. chagasi* y *T. cruzi*, así como en las isomezclas *L. chagasi*-*T. cruzi* que gestionarían condiciones fisicoquímicas propias de períodos particulares en un medio ambiente que se modifica en forma continua, deletérea e irreversible por merma de substratos tróficos, modificación del pH (Duran *et al.*, 2009) y acumulación de metabolitos tóxicos o potencialmente tóxicos (Mauel, 1984; Schuster & Sullina, 2002). En consecuencia, los cambios observados en este trabajo confirmarían lo indicado por Tejero *et al.* (2004), por cuanto resultarían de la expresión de mecanismos moduladores de la forma y la función. Según Tejero *et al.* (1984), estos comportamientos corresponden a características definidas que, junto a otras propiedades, son específicas de las especies leishmánicas mantenidas *in vitro*. En este sentido, y conforme a lo demostrado por Duran

*et al.* (2009), las poblaciones de *L. chagasi* y *T. cruzi* presentes en cultivos mixtos, utilizan los recursos disponibles en el sobrenadante del medio BHI de forma diferente a como lo hacen al ser mantenidos en cultivos puros en condiciones idénticas.

Las magnitudes numéricas de las variables morfométricas registradas en *L. chagasi* y *T. cruzi*, pudiera asociarse con aspectos numerarios meramente taxonómicos de comparación inter-específica que, además, estarían poco relacionados con la dinámica multivariante de su biología. No obstante, el estudio de la variación dimensional, por ser expresión cuantitativa de la ontogenia de los tripanosomas (Tejero *et al.*, 2008), enriquece la perspectiva, por cuanto permite investigar el dinamismo de las relaciones que se establecen entre las variables morfométricas

que, en el transcurso del tiempo, se traduce en la expresión secuencial de fenómenos no excluyentes como aparición de estadios diferentes o de variantes fenotípicas de un estadio particular (pleomorfismo).

Los análisis exploratorios adelantados reflejaron diferencias de magnitud numérica (Tabla II) y de relaciones dimensionales en términos intra-específicos (promastigotes de *L. chagasi* en cultivo puro y mixto; epimastigotes de *T. cruzi* en cultivo puro y mixto) e inter-específicos (promastigotes y epimastigotes), pero por no ser pruebas diseñadas para segregar, no suministraron información cuantitativa que permitiera comparar los procesos de cambio morfométrico asociados a promastigotes y epimastigotes sometidos a diferentes fuentes de estrés: competencia intra-específica (cultivo puro) y competencia intra- e inter-específicas (cultivo mixto).

El ACP, además de demostrar discriminación morfométrica inter-específica, una propiedad obvia por cuanto se trata de epimastigotes (*T. cruzi*) y promastigotes (*L. chagasi*), prueba taxativamente discriminación morfométrica intra-específica. En efecto, al comparar la dimensionalidad de los promastigotes (*L. chagasi*) de los cultivos puros con la dimensionalidad de los promastigotes (*L. chagasi*) de los cultivos mixtos, se aprecian dos nubes de puntos diferentes y separadas. Situación análoga se observa al cotejar las características dimensionales de los epimastigotes (*T. cruzi*) de los cultivos puros con las medidas de los epimastigotes (*T. cruzi*) de los cultivos mixtos. Los atributos dimensionales, tanto de promastigotes (*L. chagasi*) como de epimastigotes (*T. cruzi*) en los cultivos puros y mixtos, son significativamente diferentes. Bock y Von Wahlert (1965), establecieron que la capacidad de transformación observada en las especies como respuesta a los cambios medioambientales, es un atributo que evita la extinción.

Es bien conocido que los tripomastigotes hematozoicos de *T. brucei* (Vickerman, 1989), *T. rangeli* (Urdaneta-Morales & Tejero, 1992) y *T. cruzi* (Penin *et al.*, 1996), cambian de aspecto en el transcurso de la infección sin dejar de ser tripomastigotes. Al margen del significado adaptativo de dicha transformación, es menester analizar las propiedades del cambio *per se* desde la óptica de la coexistencia temporal de las formas involucradas. En tal sentido, Reuner *et al.* (1997), expresaron que la

diferenciación de los tripomastigotes delgados de *T. brucei* en tripomastigotes rechonchos, está relacionada con el número de flagelados, por cuanto limita el tamaño de las poblaciones sin depender de la respuesta inmune del hospedador. Los autores al comparar la diferenciación *in vitro* e *in vivo*, concluyen que el cambio *in vitro* refleja lo acontecido en los procesos naturales. Es más, el significado de los resultados obtenidos *in vitro* y su relación con resultados similares derivados de experimentos *in vivo*, ha sido demostrado. Hecker & Brun (1982), establecieron similitudes biológicas entre poblaciones de *T. brucei* mantenidas *in vitro* y sus contrapartes mantenidas *in vivo* y Gamboa *et al.* (2008) indicaron que los patrones de infectividad *in vitro* se corresponden con la estructura geográfica de poblaciones de *Leishmania*.

El éxito evolutivo que han alcanzado los Trypanosomatidae es incuestionable (Vickerman, 1994; Kerr, 2000). En este contexto, la relación forma-función constituye una faceta en la que sería apropiado considerar que la modulación endógena y/o exógena en poblaciones de *L. chagasi* y *T. cruzi* constituiría un elemento que, junto a otras características, avalaría la notoriedad adaptativa que han logrado.

El análisis morfométrico-poblacional de *L. chagasi* y *T. cruzi* con metodologías multivariantes permitió discriminar poblaciones del mismo estadio (promastigotes de *L. chagasi* y epimastigotes de *T. cruzi*) como función del estrés ambiental, por cuanto demuestran propiedades morfométricas y poblacionales disímiles en ambientes diferentes (cultivos axénicos puros y los cultivos axénicos mixtos). El análisis también reveló que tal disparidad es más acentuada en *L. chagasi* que en *T. cruzi*, ya que la segregación de los promastigotes es mayor que la observada entre los epimastigotes, demostrando así la interacción-dependencia de la forma y la función en estos Trypanosomatidae. Este planteamiento permite hipotetizar que las características particulares de la leishmaniasis visceral y de la Enfermedad de Chagas pudieran diferir en condiciones de infección natural concomitante *L. chagasi*-*T. cruzi*.

#### AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan su agradecimiento al Proyecto LOCTI-UCV 2007 N° P0934020 (Laboratorios ELMOR, S.A.) por el apoyo económico recibido.

## Quantitative approach to the analysis of the growth and morphometric change in populations of *Leishmania chagasi* and *Trypanosoma cruzi* maintained in pure and mixed axenic cultures

### SUMMARY

The relations established among genera of the Trypanosomatidae family in coexisting conditions in the same environment may be linked to inter-population compensatory answers that include morphological (differences among stages) and morphometrical (measurable difference) changes. The quantitative analysis of these answers in *Leishmania chagasi* and *Trypanosoma cruzi* pure axenic cultures, as well as in *L. chagasi* - *T. cruzi* axenic iso-mixtures *in vitro* maintained has not been approached, and consequently, potentially useful biological particularities in the control of these important human parasites are unknown. Every other day culture samples were fixed, stained, observed, digitalized and quantitatively processed. In addition to quantify, the population densities and the appearance-disappearance stage (morphotypes) dynamics, the numeric magnitudes of the morphometric variables were recorded and later analyzed with multivariate statistical techniques. The results indicate specific changes in the investigated variables, as well as morphometric heterogeneity between the same morphotypes of the same genera when maintained in pure or mixed cultivation. The morphometric change models for *L. chagasi* and *T. cruzi* in pure culture differ from the models of morphometric change in mixed cultivation (*L. chagasi*-*T. cruzi*). The biometric methodologies discriminate in morphometric terms populations of the same stage (morphotype) in different environments.

**Key words:** *Leishmania chagasi*, *Trypanosoma cruzi*, morphometry.

### REFERENCIAS

Adams D. C. & Funk D. (1997). Morphometric inferences on sibling species and sexual dimorphism in *Neoclamisus bebianae* leaf beetles: multivariate applications of the thin-plate spline. *Systematic Biol.* **46**: 108-194.

Andrade S. G. (1985). Morphological and behavioural characterization of *Trypanosoma cruzi* strains. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **18(Suppl)**: 39-46.

Ashford C.W. & Crewe W. (2003). *The Parasites of Homo sapiens*. Taylor & Francis. London, U.K.

Bates P. D. & Rogers M. E. (2004). New insights into the developmental biology and transmission mechanisms of *Leishmania*. *Curr. Mol. Med.* **4**: 601-609.

Bastrenta B., Mita N., Buitrago R., Vargas F., Flores M., Machane M., *et al.* (2003). Human mixed infections of *Leishmania* spp. and *Leishmania-Trypanosoma cruzi* in a sub Andean Bolivian area: identification by polymerase chain reaction/hybridization and isoenzyme. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **98**: 255-264.

Brener Z. (1985). General review on *Trypanosoma cruzi* classification and taxonomy. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **18(Suppl)**: 1-8.

Bock W. & Von Wahlert G. (1965). Adaptation and the form-function complex. *Evolution.* **19**: 296-299.

Bulla L. A. (1981). *La vegetación del módulo experimental de Mantecal*. Trabajo de Ascenso en el Escalafón Universitario. Facultad de Ciencias. Universidad Central de Venezuela.

Bulla L. A. (1995). *El análisis de componentes principales en ecología*. Trabajo de Ascenso en el Escalafón Universitario. Facultad de Ciencias. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.

Cleveland W. S. (1979). Locally weighted regression and smoothing scatterplots. *J. Am. Stat. Assoc.* **74**: 829-836.

Cleveland W. S. & Devlin S. J. (1988). Locally weighted regression: an approach to regression analysis by local fitting. *J. Am. Stat. Assoc.* **83**: 596-610.

Corredor-Arjona A., Alvarez-Moreno C. A., Agudelo C. A., Bueno M., Lopez M. C., Caceres E., *et al.* (1999). Prevalence of *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania chagasi* infection and risk factors in a Colombian indigenous population. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.* **41**: 229-234.

Davies A. J., Gibson W., Ferris V., Basson L. & Smit N. J. (2005). Two genotypic groups of

- morphologically similar fish trypanosomes from the Okavango Delta, Botswana. *Dis. Aquat. Organ.* **66**: 215-220.
- Durán C., Quiroga M. F., Díaz-Bello Z., Silva S., Roschman-González A., Strauss M. & Tejero F. (2009). *Leishmania chagasi* y *Trypanosoma cruzi*: Conducta trófica en cultivos axénicos puros y mixtos. *Bol. Mal. Salud Amb.* **49**: 97-106.
- Fernández P. (1996). Determinación del tamaño muestral. Cuad. Gestión Atención Primaria. 3: 138-141.
- Freshney R. (1987). Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique. Alan R. Liss. New York, U.S.A.
- Gamboa D., Torres K., De Doncker S., Zimic M., Arevalo J. & Dujardin J. C. (2008). Evaluation of an *in vitro* model for experimental infection with *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (V.) peruviana*. *Parasitology.* **135**: 319-326.
- Gardiner P. R. (1989). Recent studies of the biology of *Trypanosoma vivax*. *Adv. Parasitol.* **28**: 229-317.
- Godfrey K. (1985). Comparing the means of several groups. *New Engl. J. Med.* **313**: 1450-1456.
- Gossage S. M., Rogers M. E. & Bates P. A. (2003). Two separate growth phases during the development of *Leishmania* in sandflies: implications for understanding the life cycle. *Int. J. Parasitol.* **33**: 1027-1034.
- Guhl F., Hudson L., Marinkelle C. J., Jaramillo C. A. & Bridge D. (1987). Clinical *Trypanosoma rangeli* infection as a complication of Chagas' disease. *Parasitology.* **94**: 475-484.
- Gundersen H. J. G. (1978). Estimators of the number of objects per area unbiased by edge effects. *Microsc. Acta.* **81**: 107-117.
- Guzmán-Marín E. S., Zavala-Castro J. E., Acosta-Viana K. Y. & Rosado-Barrera M. E. (1999). Importancia de la caracterización de cepas de *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Biomed.* **10**: 177-184.
- Hecker H. & Brun R. (1984). Comparative morphometric analysis of bloodstream and lymph forms of *Trypanosoma (T.) brucei brucei* grown *in vitro* and *in vivo*. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* **76**: 692-697.
- Jolliffe I. T. (1986). *Principal Component Analysis*. Springer-Verlag. New York, U.S.A.
- Karbowiak G. & Wita I. (2004). *Trypanosoma (Herpetosoma) grosi* kosewiense subsp. n., the Parasite of the Yellow-Necked Mouse *Apodemus flavicollis* (Melchior, 1834). *Acta Protozool.* **43**: 173-178.
- Kerr S. F. (2000). Palearctic origin of *Leishmania*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **95**: 75-80.
- Killick-Kendrick R. & Rioux J. A. (1991). Intravectorial cycle of *Leishmania* in sandflies. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* **66(Suppl 1)**: 71-74.
- Kochhar S. K. (2004). *A Textbook of Parasitology*. Dominant. New Delhi.
- Lom J. (1979). *Biology of the trypanosomes and trypanoplasms of fish*. pp. 269-338. En: *Biology of the Kinetoplastida*. Vol. 2. Eds. Lumsden W.H.R. & Evans D.A. Academic Press. London, U.K.
- Lukes J., Mauricio I. L., Schöninan G., Dujardin J. C., Soteriadou K., Dedet J. P., *et al.* (2007). Evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani complex* with a revision of current taxonomy. *PNAS.* **104**: 9375-9380.
- Mauel J. (1984). Mechanisms of survival of protozoan parasites in mononuclear phagocytes. *Parasitology.* **88**: 579-592.
- Mendes D. G., Lauria-Pires L., Nitz N., Lozzi S. P., Nascimento R. J., Monteiro P. S., *et al.* (2007). Exposure to mixed asymptomatic infections with *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania braziliensis* and *Leishmania chagasi* in the hunab population of the greater Amazon. *Trop. Med. Int. Health.* **12**: 629-636.
- Miles R. E. (1978). The sampling by quadrants of planar aggregates. *J. Microsc.* **113**: 257-267.
- Molyneux D. H. & Ashford R. W. (1983). The Biology of *Trypanosoma* and *Leishmania*, Parasites of Man

- and Domestic Animals. Eds. Taylor & Francis. London, U.K.
- Overath P., Czichos J., Stock U. & Nonnengaesser C. (1983). Repression of glycoproteins synthesis and release of surface coat during transformation of *Trypanosoma brucei*. *EMBO J.* **2**: 1721-1728.
- Penin P., Gamallo C. & de Diego J. A. (1996). Biological comparison between three clones of *Trypanosoma cruzi* and the strain of origin (Bolivia) with reference to clonal evolution studies. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **91**: 285-291.
- Rohlf F. J. & Marcus L. F. (1993). A revolution in morphometrics. *Trends Ecol. Evol.* **8**: 129-132.
- Reuner B., Vassella E., Yutzy B. & Boshart M. (1997). Cell density triggers slender to stumpy differentiation of *Trypanosoma brucei* bloodstream forms in culture. *Mol. Bioch. Parasitol.* **90**: 269-280.
- Simpson A. G., Stevens J. R. & Lukes J. (2006). The evolution and diversity of kinetoplastid flagellates. *Trends Parasitol.* **22**: 168-174.
- Schuster F. L. & Sullivan J. J. (2002). Cultivation of clinically significant hemoflagellates. *Clin. Microbiol. Rev.* **15**: 374-389.
- Sokal R. R. & Rohlf F. J. (1995). *Biometry: The principles and practice of statistics in biological research*. W. H. Freeman. New York, U.S.A.
- Taylor K. M. & Engman D. M. (1991). The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. *Int. J. Parasitol.* **31**: 472-481.
- Tejero F., Arispe M. & Silva S. (1984). Growth characteristics of *Leishmania* spp. in semi-defined and complex media. *Rev. Bras. Biol.* **44**: 417-423.
- Tejero F., Duran C. & Rodríguez D. (2004). *Morphological Changes in Crithidia. A Density-dependent Model*. Proceedings of the IX European Multicollloquium of Parasitology. pp. 127-135.
- Tejero F., Roschman-González A., Perrone-Carmona T. M. & Aso P. M. (2008). *Trypanosoma evansi*: A quantitative approach to the understanding of the morphometry-hematology relationship throughout experimental murine infections. *J. Protozool. Res.* **18**: 34-47.
- Travi B. L., Jaramillo C., Montoya J., Segura I., Zea A., Goncalves A. & Velez I. D. (1994). *Didelphis marsupialis*, an important reservoir of *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* and *Leishmania (Leishmania) chagasi* in Colombia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **50**: 557-565.
- Tyler K. M., Matthews K. R. & Gull K. (1997). The bloodstream differentiation-division of *Trypanosoma brucei* studied using mitochondrial markers. *Proc. Roy. Soc. London B.* **264**: 1481-1490
- Urdaneta H. & Scorza J. V. (1982). Bases experimentales para la identificación de *Leishmania* spp. de América por morfometría de amastigotos. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **77**: 335-351.
- Urdaneta-Morales, S. (1983). Pleomorphism in trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* from blood and cell culture. *Tropenmed. Parasitol.* **34**: 225-228.
- Urdaneta-Morales S. & Tejero F. (1992). *Trypanosoma rangeli* (Tejera, 1920): Observations upon pleomorphism. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **87**: 511-516.
- Walters L. L., Modi G. B., Chaplin G. L. & Tesh R. B. (1989). Ultrastructural development of *Leishmania chagasi* in its vector, *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **41**: 295-317.
- Walters L. L., Irons K. P., Chaplin G. L. & Tesh R. B. (1993). Life cycle of *Leishmania major* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) in the neotropical sand fly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). *J. Med. Entomol.* **30**: 699-718.
- WHO Expert Committee. (1990). Control of the leishmaniases. World Health Organization Technical Report Series. **793**: 1-158.
- WHO Expert Committee. (1991). Control of Chagas' disease. World Health Organization Technical Report Series. **811**: 1-95.

- Vickerman K. (1976). The diversity of Kinetoplastida flagellates. pp. 1-34. En: *Biology of the Kinetoplastida*. Vol.1 Eds. Lumsden W.H.R. & Evans D.A.. Academic Press. London, U.K.
- Vickerman K. & Preston T. M. (1976). Comparative cell biology of the kinetoplastid flagellates. pp. 35-130. En: *Biology of the Kinetoplastida*. Vol. 1. Eds. Lumsden W.H.R. & Evans D.A. Academic Press. London. U.K.
- Vickerman K. (1989). Trypanosome sociology and antigen variation. *Parasitology*. **99**: S37-S47.
- Vickerman K. (1994). The evolutionary expansion of the trypanosomatids flagellates. *Int. J. Parasitol.* **24**: 1317-1331.
- Ziccardi Z. & Lourenço-de-Oliveira R. (1999). Polymorphism in trypomastigotes of *Trypanosoma (Megatrypanum) minasense* in the blood of experimentally infected squirrel monkey and marmosets. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. **94**: 649-653.

Recibido el 25/01/2010  
Aceptado el 23/06/2010

