

Manual de laboratorio de Parasitología

2. Flagelados sanguíneos y tisulares

**Ignacio García Más. Benito Muñoz Araújo. Amaya Aguirre Inchaurre.
Ignacio Polo Roldán. Ana García Moreno. Pablo Refoyo Román.**

Departamento de Zoología y Antropología Física. Facultad de Ciencias Biológicas.
Universidad Complutense de Madrid. c/ José Antonio Novais, 2. 28040 Madrid.

igarmas@bio.ucm.es titomu@bio.ucm.es aaguirre@bio.ucm.es
ipolorol@bio.ucm.es agmoreno@bio.ucm.es pablorefoyo@teleline.es

Resumen: En este artículo se revisan los conceptos básicos sobre los flagelados sanguíneos y tisulares. Se describen las características de los Cinetoplástidos, de los Tripanosomátidos y de algunas especies con interés biosanitario.

Palabras clave: Flagelados sanguíneos. Flagelados tisulares. Trypanosoma. Leishmania.

INTRODUCCIÓN

Los Protozoos flagelados parásitos de la sangre y otros tejidos de vertebrados pertenecen al orden Kinetoplastida (Cinetoplástidos) y a la familia Trypanosomatidae (Tripanosomátidos). Son denominados Cinetoplástidos debido a la presencia de una estructura, llamada cinetoplasto, que se encuentra en uno de los extremos de la mitocondria; se trata de una masa de ADN mitocondrial que se tiñe intensamente con los colorantes utilizados habitualmente en las tinciones hematológicas.

Desde el punto de vista morfológico, los Flagelados sanguíneos y tisulares se caracterizan por sus pequeñas dimensiones, cuerpo plástico (se puede deformar gracias a la presencia de una red de microtúbulos subpeliculares) y forma foliar u oval; poseen un único flagelo que surge de un saco flagelar, que a veces forma membrana ondulante, y un único núcleo con nucléolo. Existe una única mitocondria, a veces ramificada, en uno de cuyos extremos (el más cercano al nacimiento del flagelo) se encuentra el cinetoplasto.

Además de estas características, los Tripanosomátidos tienen la posibilidad de pasar a lo largo de sus ciclos vitales por varias formas (fenómeno conocido como polimorfismo), distinguibles entre sí por la zona de emergencia del flagelo y por otros aspectos. Estas formas reciben los nombres de amastigoto, promastigoto, epimastigoto, esferomastigoto y tripomastigoto (Figs. 1 y 2):

- **Amastigoto:** forma esférica u oval desprovista de flagelo libre (el flagelo no asoma por fuera del saco flagelar, por lo que no es visible con el microscopio óptico).
- **Esferomastigoto:** forma esférica con flagelo libre y corta membrana ondulante que representa una transición entre la forma amastigoto y las demás formas.
- **Promastigoto:** forma alargada con el cinetoplasto situado por delante del núcleo y con un flagelo que aflora libremente por el extremo anterior.
- **Epimastigoto:** forma alargada con el cinetoplasto yuxtapuesto al núcleo, cerca del cual se origina el flagelo que emerge en este punto del cuerpo, formando una corta membrana ondulante.
- **Tripomastigoto:** forma alargada y foliar con el cinetoplasto situado detrás del núcleo. El flagelo nace en las proximidades del cinetoplasto y emerge lateralmente, formando a lo largo del cuerpo una membrana ondulante.

A su vez, la forma tripomastigoto puede ser más o menos alargada, voluminosa, etc., distinguiéndose formas **delgadas** y largas, formas cortas y **rechonchas** y, por último, formas **intermedias** (Fig. 3). Este fenómeno es conocido con el nombre de polimorfismo o pleomorfismo, y aquellas especies cuyas formas tripomastigotos en la sangre del vertebrado lo presentan se denominan polimórficas o pleomórficas, en contraste con aquellas que no lo presentan (monomórficas).

Desde el punto de vista sanitario y socioeconómico son especialmente interesantes los géneros *Trypanosoma* y *Leishmania*, con varias especies que afectan tanto a los seres humanos como a los animales domésticos.

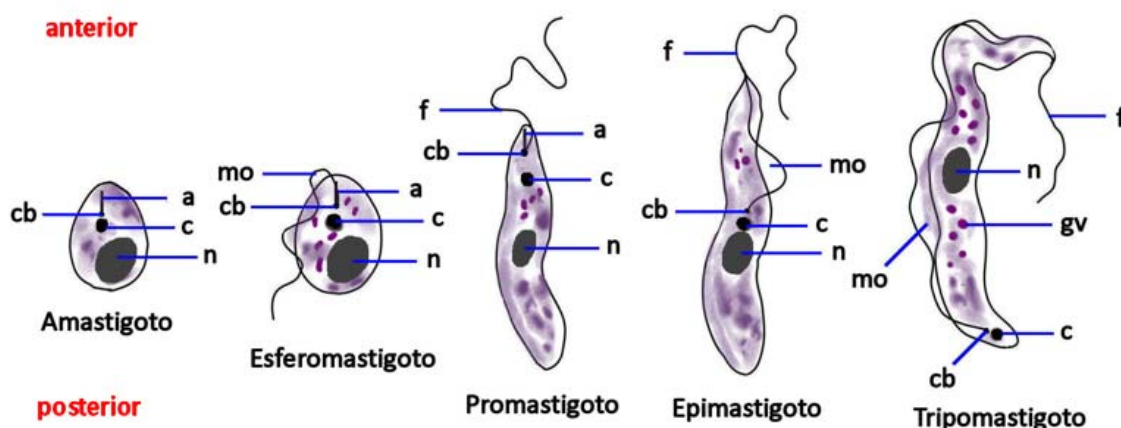


Figura 1. Formas de desarrollo (polimorfismo) de los Tripanosomátidos. (a) axonema, (c) cinetoplasto, (cb) cuerpo basal, (gv) gránulo de volutina, (n) núcleo y (mo) membrana ondulante.

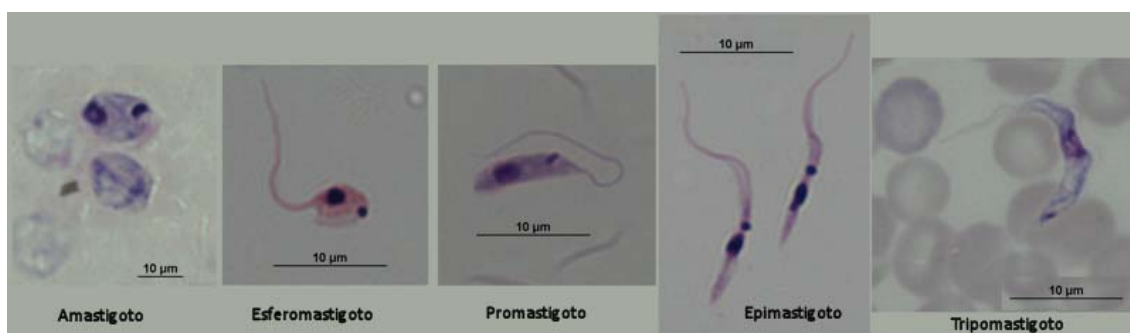


Figura 2. Fotografías de las formas de desarrollo de los Tripanosomátidos.

LOS TRIPANOSOMAS

Los representantes del género *Trypanosoma* Gruby, 1843 viven en la sangre, y a veces en otros tejidos, de todo tipo de vertebrados y son transmitidos por invertebrados hematófagos (vectores).

Los especialistas han separado los tripanosomas de los mamíferos en dos grandes secciones, **Stercoraria** y **Salivaria**, en relación con el lugar del hospedador insecto (vector) en donde el tripanosoma adquiere la forma infectante (metacíclica).

En los **Stercoraria** las formas metacíclicas se desarrollan en los últimos tramos del tracto digestivo del vector y salen al exterior junto con las heces de éste, realizándose la infección del mamífero por contaminación; a este grupo pertenece, por ejemplo, *T. cruzi*, que es transmitido por una chinche triatomina hematófaga al defecar sobre la piel del hospedador.

En los **Salivaria** las formas metacíclicas se desarrollan en las glándulas salivales y/o probóscide del vector y la infección se realiza por inoculación; éste es el caso de *T. brucei gambiense* y *T. b. rhodesiense*, que son transmitidos por una mosca tse-tsé que inocular el parásito mediante la picadura.

Identificación de las especies del género *Trypanosoma*

El diagnóstico específico de una tripanosomiasis se obtiene mediante el estudio de extensiones sanguíneas teñidas con Giemsa u otro colorante de la serie de Romanowsky. Las diversas especies se distinguen entre sí por los siguientes caracteres de las formas sanguíneas (tripomastigotos) (Fig. 1):

1. presencia de formas mono o polimorfas.
2. aspecto del extremo posterior.
3. tamaño, forma y posición del cinetoplasto
4. desarrollo de la membrana ondulante.

5. posición del núcleo en relación con el cuerpo del Protozoo.
6. presencia o ausencia de flagelo libre.

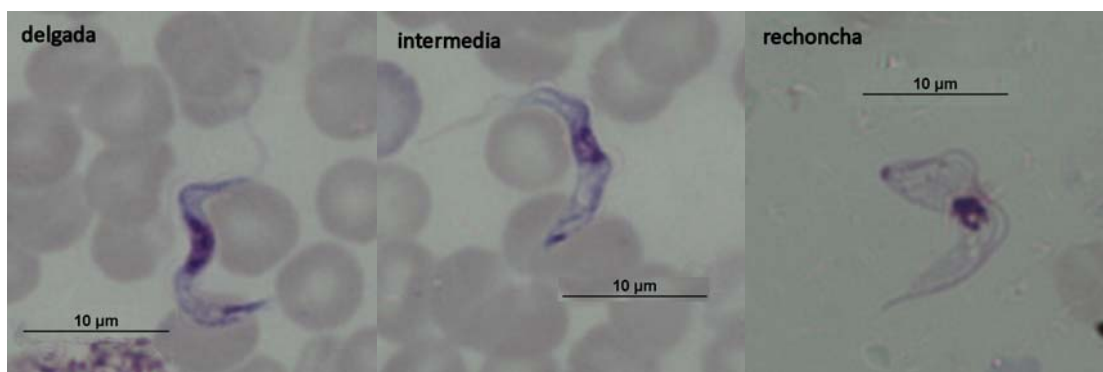


Figura 3. Pleomorfismo de la forma tripomastigoto en la sangre. Forma delgada: larga, con citoplasma estrecho y núcleo arriñonado. Forma intermedia: larga, núcleo oval. Forma rechoncha: corta, citoplasma ancho, núcleo esférico y flagelo libre muy corto.

Tripanosomas de interés biosanitario

Son muchas las especies de tripanosomas que parasitan a los mamíferos. Algunas son bien conocidas en todos sus aspectos por ser objeto de estudios experimentales, otras lo son por afectar a la salud de los seres humanos y de los animales domésticos.

El hombre puede ser parasitado por tres especies del género *Trypanosoma*: *T. b. gambiense*, *T. b. rhodesiense* y *T. cruzi*. Una cuarta especie, *T. rangeli*, parásito de mamíferos silvestres, puede parasitarlo ocasionalmente.

- ***Trypanosoma cruzi*** Chagas, 1909

Es un tripanosoma exclusivo del continente americano que parasita al hombre y a otros mamíferos, provocando en los seres humanos la llamada tripanosomiasis americana o mal de Chagas, que afecta a un 5% de la población.

Los vectores son chinches triatominas hematófagas que expulsan con sus heces, mientras succionan la sangre de sus víctimas, formas infectantes del tripanosoma (formas metacíclicas) que entrarán en la sangre por el orificio de la picadura o cualquier zona erosionada de la piel. En la sangre el tripanosoma permanece en forma tripomastigoto, sin dividirse, para pasar a los tejidos donde se transforma en amastigoto, que se divide rápidamente dando lugar a centenares de amastigotos.

Los amastigotos destruirán la célula y se transformarán en tripomastigotos que pasarán a la sangre. Este ciclo se repite de manera continuada. Los amastigotos se acumulan especialmente en el músculo cardíaco, formando lo que se denominan "pseudoquistes". La chinche se infecta cuando pica a un individuo con tripanosomiasis, al ingerir tripomastigotos con la sangre.

- *Trypanosoma brucei gambiense* Dutton, 1902 y *Trypanosoma brucei rhodesiense* Stephens y Fantham, 1910

T. b. gambiense y *T. b. rhodesiense* son los agentes productores de la tripanosomiasis africana o “enfermedad del sueño” y son transmitidos por moscas tse-tsé. Ambas especies son idénticas morfológicamente; tan sólo se pueden diferenciar mediante estudios especiales, su distribución y por la evolución de la enfermedad que producen.

T. b. gambiense se distribuye por África central y occidental y la enfermedad que produce cursa de manera crónica, pudiendo prolongarse hasta 5 años. *T. rhodesiense* es propia de África oriental y produce una enfermedad de tipo agudo, provocando la muerte del enfermo en unos pocos meses.

La transmisión del parásito se realiza cuando la mosca tse-tsé pica para alimentarse; si está infectada inoculará tripomastigotos infectantes, que pasarán a la sangre donde se dividirán continuamente, para invadir, paulatinamente la linfa y el líquido cefalorraquídeo. La mosca tse-tsé se infecta cuando ingiere sangre de un individuo con tripanosomiasis.

LAS LEISHMANIAS

Todas las especies del género *Leishmania* Ross, 1903 son parásitos obligados de macrófagos y otras células del sistema retículoendotelial de diversos hospedadores vertebrados (mamíferos y reptiles) y del tracto digestivo de ciertos dípteros hematófagos (flebotomos) que son sus vectores. En los vertebrados *Leishmania* se encuentra exclusivamente en forma amastigoto.

En el vertebrado el parásito se desarrolla en la forma amastigoto dentro del citoplasma de las células del sistema retículoendotelial (SRE), donde se multiplica por fisión binaria hasta alcanzar un elevado número de amastigotos que destruyen la célula hospedadora e invaden nuevas células, repitiéndose el proceso sucesivamente.

Cuando el flebotomo vector succiona sangre de un vertebrado infectado, ingiere células con amastigotos. Una vez en el tracto digestivo del vector, tras la digestión de los macrófagos, los amastigotos quedan libres, transformándose seguidamente en promastigotos que se multiplican activamente por fisión binaria.

Cuando un flebotomo infectado succiona sangre de otro vertebrado, le inocula promastigotos que se transforman en amastigotos cuando son fagocitados por células del SRE. Sólo los flebotomos hembras intervienen en la transmisión, pues sólo ellas son hematófagas.

Identificación de las especies del género *Leishmania*

El diagnóstico de la leishmaniasis se realiza mediante el estudio de extensiones (frotis) o improntas de tejidos ricos en células del SRE, que pudieran estar parasitadas, teñidas con Giemsa u otro colorante de la serie de Romanowsky. Dado que los amastigotos de todas las especies de *Leishmania* son idénticos morfológicamente, para el diagnóstico específico se recurre a técnicas especiales.

La forma amastigoto (Fig. 4), única forma que se encuentra en el hospedador vertebrado, presenta al microscopio lumínico las siguientes características:

- 1.- Oval o esférico y de pequeñas dimensiones (2 x 4 μm como promedio); al microscopio lumínico tan sólo son visibles el núcleo y el cinetoplasto, más pequeño. No se observa el flagelo —que está embutido en el saco flagelar y no sobresale del borde citoplasmático— ni el cuerpo basal del flagelo.

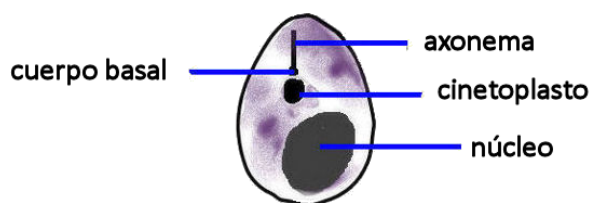


Figura 4. Esquema de amastigoto.

- 2.- Se encuentra exclusivamente en las células del SRE infectadas y su número varía desde algunas unidades a una decena, aunque puede encontrarse hasta un centenar. Puesto que las células parasitadas son muy frágiles, es habitual que al realizar extensiones aquellas se rompan y las leishmanias se observen fuera de la célula huésped. Esta circunstancia, y el hecho de que durante la tinción puedan aparecer grumos de colorante u otros artefactos, hacen que a veces sea difícil identificar las leishmanias en los frotis e improntas. Dado que el citoplasma se tiñe débilmente, el observador debe, en la mayoría de los casos, identificar la leishmania por su aspecto de dos puntos intensamente coloreados de rojo púrpura (Fig. 5).

Leishmanias de interés biosanitario

Dada la dificultad que hay para caracterizar las especies del género *Leishmania*, existe aún confusión sobre la validez de algunas de ellas. Las especies que afectan a los seres humanos son, en su mayoría, zoonóticas (es decir, son comunes al hombre y a otros animales) y dada su importancia se conocen mejor que otras.

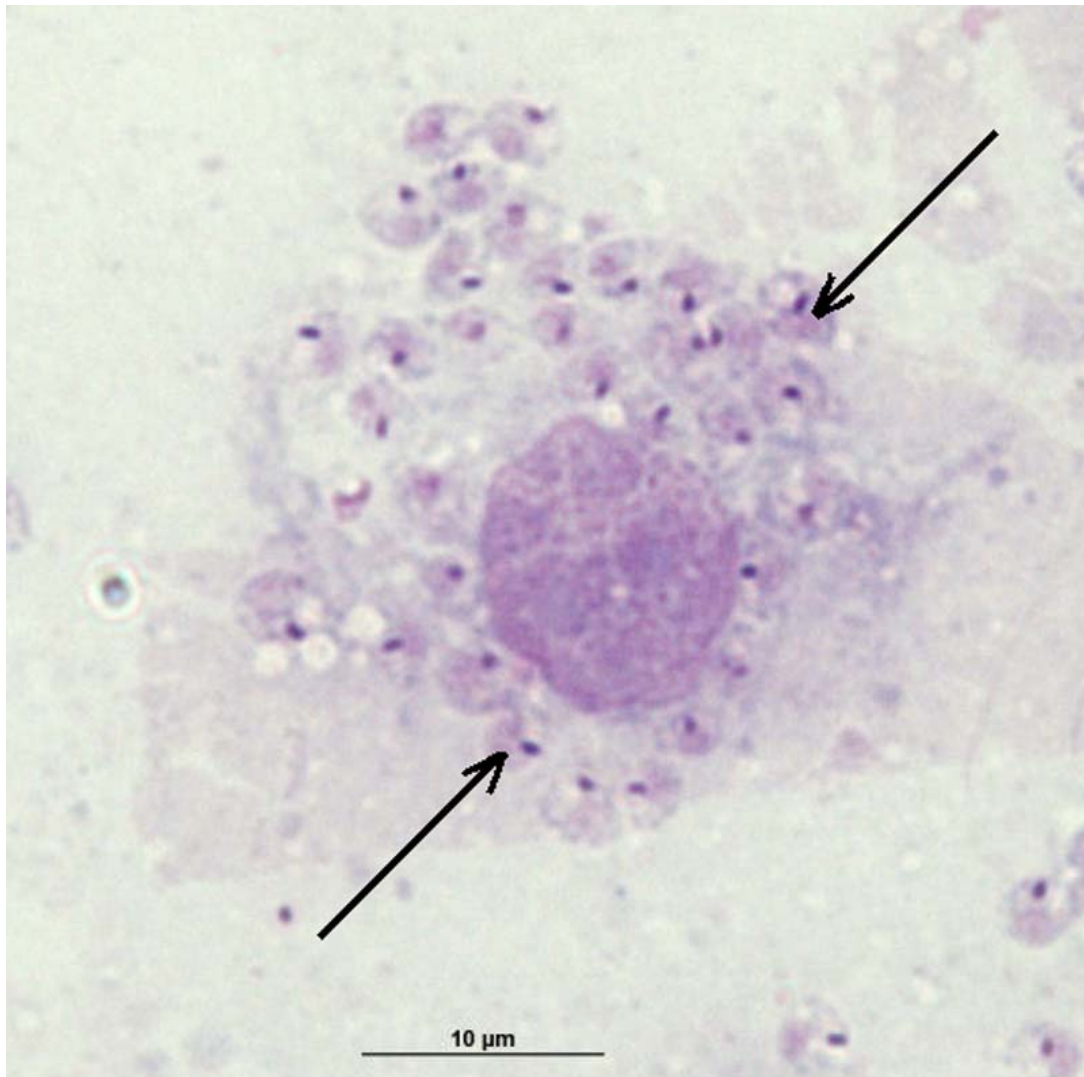


Figura 5. Amastigotos (flechas) en el citoplasma de un macrófago.

Algunas de estas especies causan leishmaniasis cutánea (lesiones en la piel) como *Leishmania tropica* Wright, 1903, *L. major* Yakimov y Schockov, 1915 y *L. aethiopica* Asshford y Bray, 1973; otras afectan a las vísceras (leishmaniasis visceral), como *L. donovani* (Lavern y Mesnili, 1903) Ross, 1903, *L. infantum* Nicolle, 1908 y *L. chagasi* Cunha y Chagas, 1937; por último, existe un tercer grupo de especies que se caracteriza por producir lesiones en las mucosas y piel circundante (leishmaniasis mucocutánea), como *L. braziliensis* Viannia, 1911.

En España existen leishmaniasis cutánea y visceral, ambas producidas por *L. infantum*. *Leishmania donovani* produce leishmaniasis visceral (“kala-azar”) en India, países limítrofes y en África oriental. La enfermedad se caracteriza porque los parásitos invaden las células del S.R.E. de las vísceras (hígado, bazo, médula ósea, etc.), destruyéndolas. El diagnóstico se basa en el hallazgo de amastigotos en improntas o extensiones realizadas con muestras de biopsia de las vísceras.

TRABAJO DE LABORATORIO

La finalidad de esta práctica es adquirir los conocimientos necesarios para identificar las diferentes fases de los tripanosomas y las leishmanias mediante el estudio microscópico de frotis teñidos con Giemsa.

La tinción con Giemsa es la preferida en el diagnóstico de las infecciones con flagelados sanguíneos y tisulares, debido a que tiñe bien las estructuras con carácter diagnóstico (núcleos, cinetoplasto, etc.).

Estudio del género *Trypanosoma*

Se estudiarán frotis sanguíneos teñidos con Giemsa, en los que se podrán observar tanto células sanguíneas como tripanosomas. El colorante de Giemsa es el que se utiliza habitualmente para teñir las extensiones sanguíneas (frotis y gota gruesa) en busca de parásitos hemáticos. Como representantes del género *Trypanosoma* se estudiarán *T. b. rhodesiense* y *T. cruzi*.

- ***Trypanosoma brucei rhodesiense***

Estudio de frotis sanguíneo. Búsquense los tripanosomas en la porción menos teñida del frotis y donde las células sanguíneas no estén amontonadas. El número de tripanosomas que pueden verse en un frotis es elevado, debido a que cuando están en la sangre se dividen continuamente.

a) características de los tripanosomas en el frotis (Fig. 6)

- formas tripomastigoto polimórficas, con morfología: a) largas y delgadas (30 x 1,5 μm), b) cortas y rechonchas sin flagelo libre o muy corto (18 x 3,5 μm), c) intermedias. Las dimensiones pueden estimarse, de modo aproximado, calculando el número de eritrocitos que abarca un tripanosoma y teniendo en cuenta que el diámetro de un eritrocito es de aproximadamente 7 μm .
- extremo posterior romo.
- cinetoplasto pequeño.
- membrana ondulante bien definida y ancha.
- núcleo central.
- con flagelo libre.

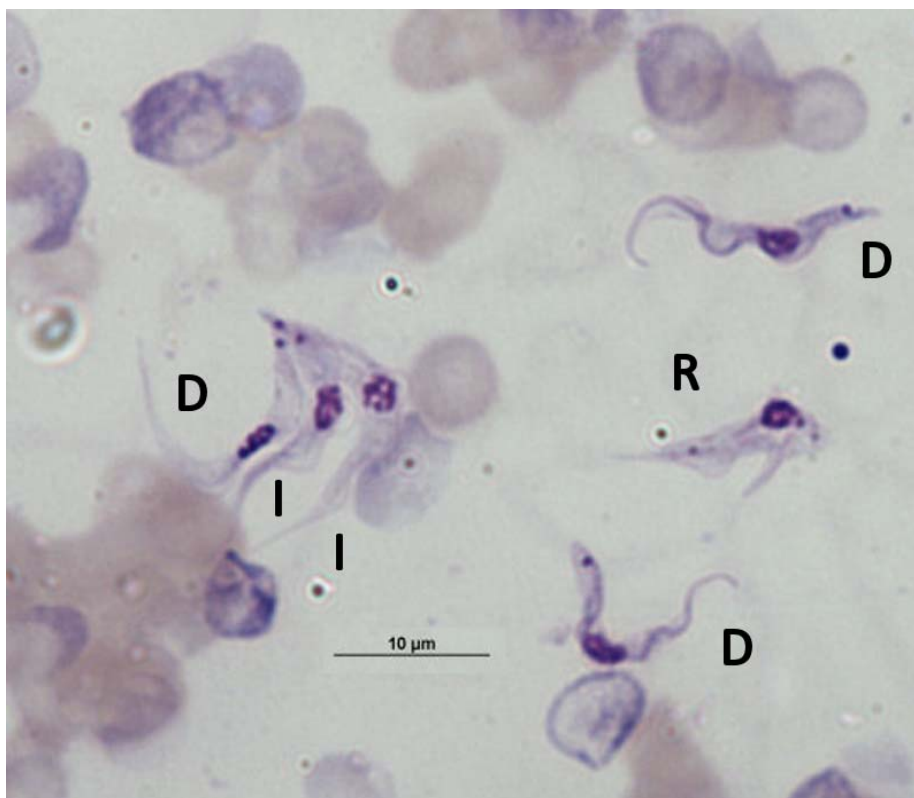


Figura 6. Frotis sanguíneo con formas tripomastigoto. D: forma delgada, R: forma rechoncha, I: forma intermedia

- ***Trypanosoma cruzi***

El parásito vive en forma tripomastigoto en la sangre de su hospedador mamífero (sin dividirse) y como forma amastigoto en diversos tejidos (dividiéndose) y constituyendo cúmulos denominados pseudoquistes.

a) características de la forma tripomastigoto en sangre (Fig. 7)

- polimórfica, con formas: a) largas y delgadas, b) cortas y rechonchas, y c) formas intermedias (19 x 1,5 μm). En las extensiones de sangre teñidas suele presentar forma de C o de interrogación. El número de tripanosomas en el frotis es reducido, debido a que nunca se divide en la sangre.
- extremo posterior puntiagudo.
- cinetoplasto grande y subterminal.
- membrana ondulante bien desarrollada.
- núcleo central.
- flagelo libre.



Figura 7. *T. cruzi* en frotis sanguíneo. Formas intermedia (izquierda) y delgada (derecha).

b) características de las formas amastigotos (formas tisulares) (Fig. 8)

Estudio de una sección histológica de corazón de ratón. Los amastigotos son organismos ovales, de aproximadamente 4 µm de diámetro, que se multiplican dentro de las células, para después transformarse en formas tripomastigotos que son liberados a la sangre. En las fibras musculares los cúmulos de amastigotos forman los llamados pseudoquistes.

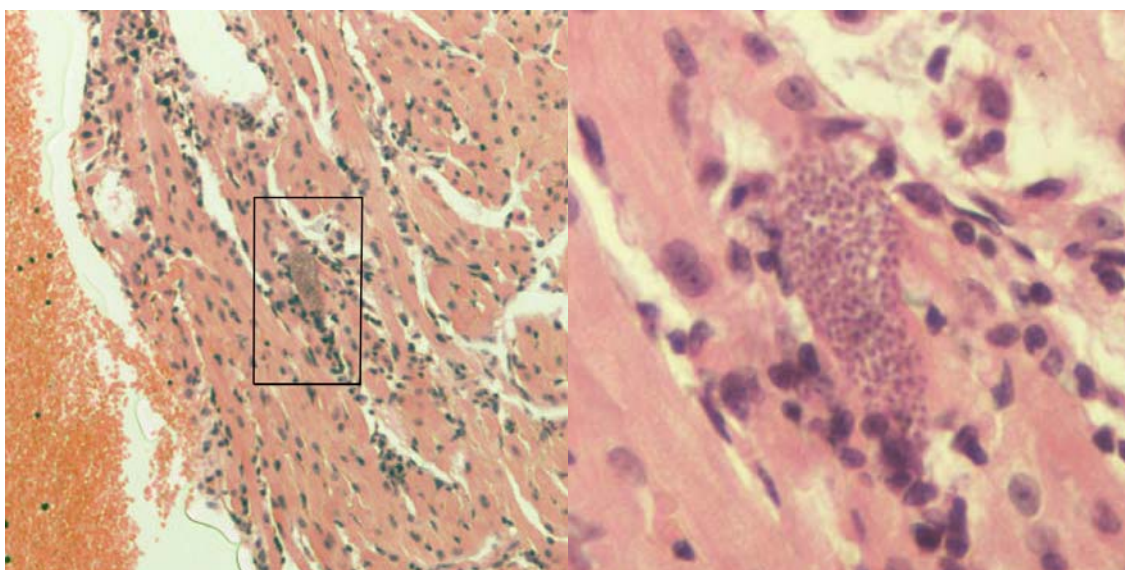


Figura 8. *T. cruzi* en músculo cardíaco. En la imagen izquierda, amastigotos formando pseudoquiste (encuadrado). En la imagen derecha, el pseudoquiste aumentado.

c) características de las formas epimastigotos y esferomastigotos (formas en el vector) (Fig. 9)

Estudio de un frotis realizado con el contenido intestinal de una chinche triatomina infectada. La preparación está teñida con Giemsa y contiene infinidad de formas epi y esferomastigotos. Obsérvense la forma, la posición del cinetoplasto, posición del

núcleo y desarrollo de la membrana ondulante. Compárese con la Fig. 1.



Figura 9. *T. cruzi* en el intestino del vector. Formas epimastigoto (izq.) y esferomastigoto (der.) Compárese con la Figura 1.

Estudio del género *Leishmania*

Se estudiarán improntas de bazo de hámster dorado (*Mesocricetus auratus*) infectado con *Leishmania donovani* teñidas con Giemsa, en las que se podrán observar células del SRE (macrófagos) con el citoplasma invadido de amastigotos. La impronta se realiza aplicando una porción del tejido obtenido por biopsia sobre un porta; parte de las células del tejido quedarán adheridas al vidrio y podrán, tras la fijación y tinción, estudiarse como si se tratase de un frotis.

- ***Leishmania donovani***

a) características de las formas amastigotos de *Leishmania donovani* (en impronta de bazo) (Fig. 10)

- esféricas u ovals y de pequeñas dimensiones (2x4 μm de promedio). El núcleo es esférico y se tiñe de rojo púrpura con el colorante de Giemsa. El cinetoplasto aparece como un pequeño bastón, o puntiforme, que se tiñe intensamente de púrpura violeta. El citoplasma se tiñe de azul, siendo a menudo imprecisos sus límites, por lo que en muchas ocasiones sólo son apreciables dos puntitos próximos entre sí (núcleo y cinetoplasto), de distinto tamaño y teñidos de púrpura.
- los amastigotos se encuentran exclusivamente en el interior del citoplasma del macrófago, pero la técnica de la impronta suele provocar la rotura de la célula hospedadora, por lo que en la mayoría de las ocasiones los parásitos se observan fuera de ésta.

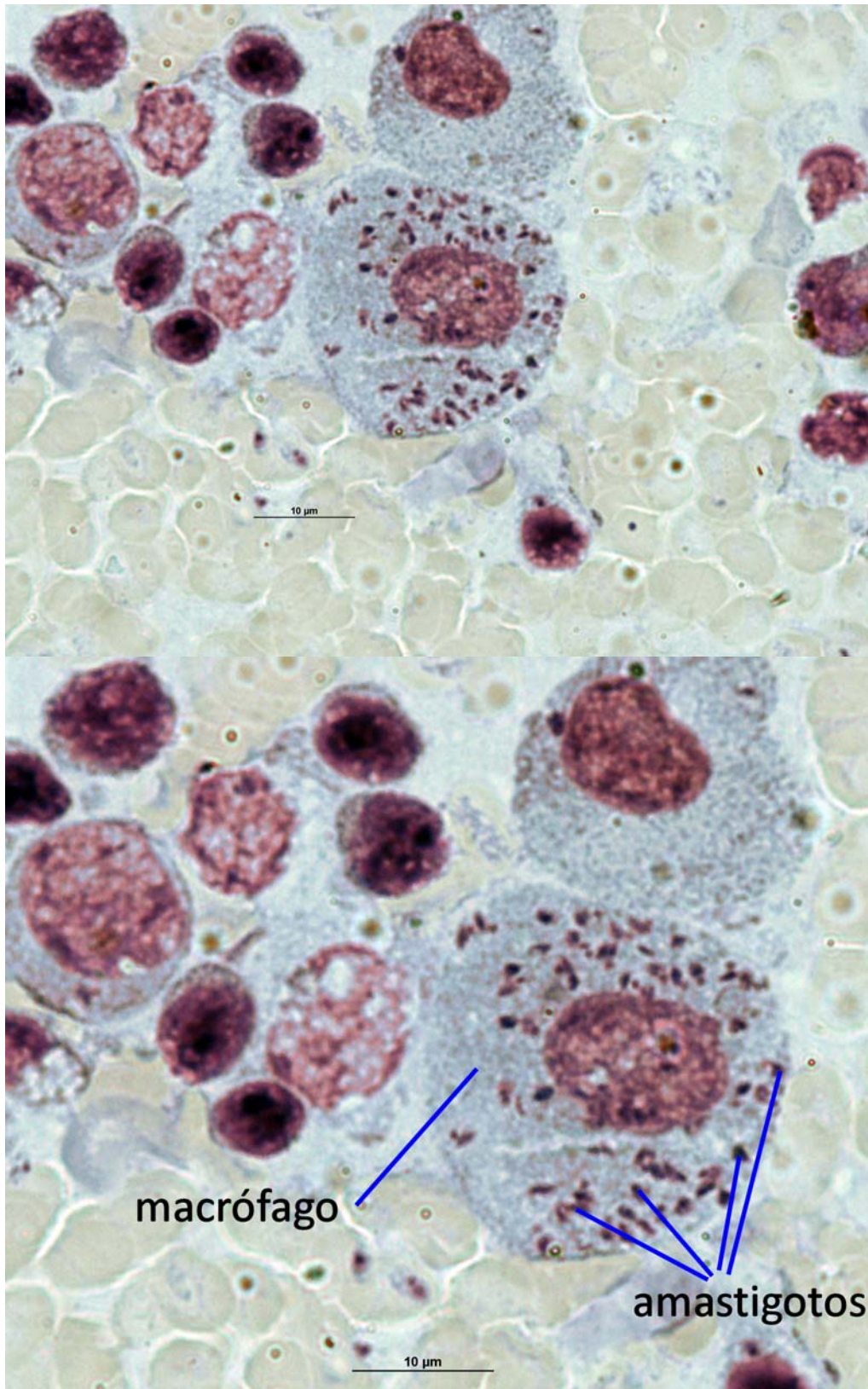


Figura 10. Fotografías de una impronta de bazo de un hámster infectado con *L. donovani*.

b) características de las formas promastigotos (formas en el vector) (Fig. 9)

Estudio de un frotis que contiene las formas que se desarrollan en el intestino del vector, un flebótomo hembra. Obsérvense la forma, la posición del cinetoplasto, del flagelo y del núcleo. Compárese con la Fig. 1.



Figura 9. Formas promastigoto de *L. donovani* en el intestino del vector. Compárese con la fig. 1.

BIBLIOGRAFÍA DE CONSULTA

Ash, L. R. y Oriol, T. C. 1980. Atlas of Human Parasitology. ASCP Press, Chicago.

Ash, L. R. y Oriol, T. C. 1987. Parasites: A Guide to Laboratory Procedures and Identification. ASCP Press, Chicago.

Peters, W. y Gilles, H. M. 1989. A Colour Atlas of Tropical Medicine and Parasitology. Wolfe Medical Publications, London.

RECURSOS ELECTRÓNICOS

Museo virtual de Parasitología. Facultad de Cc. Biológicas. UCM. Madrid, España.

<http://www.ucm.es/centros/webs/fbio/index.php?tp=Museo%20Virtual%20de%20Parasitologia&a=servicios&d=16028.php>