

Estudio del comportamiento de dos cepas de *Trypanosoma rangeli**

María Teresa Paláu Castaño**

Marleny Montilla Moreno†

Claudio Antonio Zúñiga Martí ††

RESUMEN

Se estudiaron las cepas Choachí-2V y Durán del *Trypanosoma rangeli* para obtener la mayor información posible acerca del comportamiento biológico de este parásito y su posible relación de protección contra infecciones por *T. cruzi*. La metaciclologénesis se determinó mediante recuento de las formas metacíclicas en un universo de 200 parásitos durante 15 días de seguimiento. Se produjo la infección, con cultivo axénico por vía intracelómica, en grupos de 20 ninfas de quinto estadio de *Rodnius prolixus*, obteniéndose en hemolinfa y glándulas salivares las diferentes formas del ciclo del parásito incluyendo las metacíclicas infectivas, las cuales fueron inoculadas por vía intraperitoneal a ratones a los cuales se les hizo seguimiento de parasitemias por observación en gota de sangre cada 48 horas durante 20 días. Se pudo determinar que aunque no se observaron formas del parásito después del día 15, éste continúa circulando en baja concentración, ya que al día 20 posinfección, se logró obtener cultivo del parásito a partir de muestras de sangre aparentemente negativas. Los cultivos axénicos purificados de las dos cepas de *T. rangeli* fueron cosechados y analizados por isoenzimas para su identificación bioquímica.

Palabras clave: *Trypanosoma rangeli*; *Rhodnius prolixus*, hemolinfa, glándulas salivares, isoenzimas, cultivo axénico, metaciclologénesis.

Introducción

El parásito *Trypanosoma rangeli* (*T. rangeli*) es un protozoo del subgénero *Herpetosoma* el cual infecta animales silvestres, animales domésticos y al humano.¹ En su ciclo de vida posee una alternancia de generaciones entre un insecto vector triatomino, usualmente del género *Rhodnius* y un hospedero vertebrado.

T. rangeli se encuentra ampliamente distribuido en diferentes regiones de Centroamérica tales como Guatemala, El Salvador, Costa Rica y Panamá;²⁻⁵ en países localizados en el norte de Suramérica tales como

Colombia, Venezuela, y Perú;⁶⁻⁹ y de manera reciente se ha informado la presencia del parásito *T. rangeli* en Brasil.¹⁰⁻¹²

Este parásito es considerado no patógeno para los hospederos vertebrados incluyendo al humano;¹³ sin embargo, ha sido comprobado como patógeno para el insecto vector *Rhodnius prolixus*.^{14, 15} Las infecciones naturales del insecto con *T. rangeli* se identifican por presencia del parásito en la hemolinfa, glándulas salivares y algunas formas epimastigotes en el intestino.¹⁶⁻¹⁷ Durante su ciclo de vida en el insecto, *T. rangeli* invade el hemoceloma, se multiplica de forma espontánea en hemolinfa y de manera intracelular en los hemocitos, para

*Trabajo financiado por el Instituto Nacional de Salud de Colombia y Colciencias (Proyecto 2104-04-895-9).

**PhD. Laboratorio de Parasitología, Instituto Nacional de Salud; profesora, Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.

†MSc. Laboratorio de Parasitología, Instituto Nacional de Salud, Bogotá, Colombia.

††PhD. Profesor facultades de Medicina y de Ciencias Veterinaria y Pecuaria, Universidad de Chile, Santiago de Chile, Chile.

Correspondencia: Dra. Paláu, Laboratorio de Parasitología, Instituto Nacional de Salud, Avenida Eldorado con carrera 50, CAN, Bogotá, Colombia. E-mail mpalau@hemagogus.ins.gov.co

migrar al final a las glándulas salivares, las cuales presentan un aspecto de color blanquecino; al observarlas a través del microscopio se encuentran cubiertas con parásitos en diversos estadios de su transformación metacíclica. En general, la mayoría de los órganos del insecto son afectados por la presencia de *T. rangeli*, principalmente los tubos de Malpighi, la tráquea, las glándulas salivares y el sistema nervioso.¹⁸

En cuanto a los síntomas de la infección con *T. rangeli* en el insecto vector, se encuentra incremento del volumen de la hemolinfa.¹⁹ También se informó²⁰ que triatomíneos infectados con *T. rangeli* presentaban disminución de la concentración de aminoácidos libres en la hemolinfa; sin embargo, el mismo investigador encontró que sucedía lo contrario, altas concentraciones de alanina, glicina e isoleucina cuando el insecto estaba infectado con *T. rangeli* muy virulento. Otra alteración causada por el parásito en el insecto cuando las formas de *Trypanosoma rangeli* invaden hemolinfa, es la lisis de las células musculares del intestino medio produciendo la muerte bajo condiciones naturales y experimentales.²¹⁻²³

Varios estudios de identificación se han realizado y en la actualidad existen diferentes métodos bioquímicos y serológicos para diferenciar entre los parásitos *T. cruzi* y *T. rangeli*, siendo los más relevantes la lisis por el complemento,²⁴⁻²⁵ los estudios isoenzimáticos²⁶ y el uso de lectinas como marcadores de residuos de azúcares en la superficie del parásito *T. rangeli*.²⁷⁻²⁸

En cuanto a la morfología, se pueden distinguir diferentes formas de *T. rangeli* en el hospedero vertebrado y en el invertebrado y a su vez en los diferentes órganos del insecto vector; estas diferentes formas involucran cambios fisiológicos importantes en la población parasitaria. En la hemolinfa se encuentran las formas epimastigotas cortas, medianas y largas, y tripomastigotas metacíclicas; también se observan formas en división longitudinal muy activa, formas esferomastigotas y tripomastigotas; además, es frecuente encontrar la presencia de numerosos hemocitos.

En las glándulas salivares del insecto se encuentran la mayoría de las formas tripomastigotas metacíclicas infectivas de *T. rangeli*;¹⁸ en el intestino sólo hay formas largas de epimastigotas.²³

El parásito *Trypanosoma rangeli* se puede mantener en cultivo axénico en diferentes medios de cultivo, reconociéndose de acuerdo con trabajos anteriores para la transformación metacíclica, que el medio Grace's es más adecuado que el medio LIT (Liver-Infusion-Triptosa).²⁹

Además, se ha podido comprobar que *T. rangeli* crece y se multiplica con éxito en medio de cultivo Tobie con RE1, suplementado con suero fetal bovino al 4%, tanto a temperatura de 23 C, como a temperatura de 30 C. También se ha observado buen crecimiento de los

parásitos extracelulares una vez salen de las células infectadas en laboratorio, manteniendo la población a temperatura de 36.5 C y en medio de cultivo apropiado para cultivo celular DMEM y RPMI (Paláu MT, no publicado).

A pesar de los múltiples trabajos sobre *T. rangeli* es poco lo que se conoce sobre su comportamiento en el hospedero vertebrado, sin embargo existe el consenso general afirmando que las parasitemias en ratones son bajas y de corta duración aparente.

Es importante para el estudio de la enfermedad de Chagas en Colombia, tener presente que en el insecto vector en varias regiones del país, *T. rangeli* coincide con la presencia de *Trypanosoma cruzi* sin olvidar que ambos parásitos son fisiológicamente diferentes, aunque comparten el mismo vector y en ocasiones los mismos reservorios. Cuando estos parásitos se encuentran infectando de manera simultánea a un individuo, interfieren con el diagnóstico de la enfermedad de Chagas, debido a que ambos parásitos poseen antígenos semejantes lo que produce frecuentes reacciones cruzadas.³⁰⁻³³

Cabe mencionar que por estudios experimentales se ha revelado la existencia de un posible efecto protector de *T. rangeli* en contra de infecciones con *T. cruzi* altamente virulentas en infecciones mixtas, en modelo murino con diferentes dosis de inóculo y edad de los animales. Los resultados mostraron control de las parasitemias en los grupos de ratones de reto y cambios significativos a nivel histopatológico y baja o ninguna mortalidad en los ratones.³⁴

Las propiedades biológicas de *T. rangeli*, su no patogenicidad para el humano y la similitud antigénica con *T. cruzi*, además del hecho que circulan juntos en el mismo vector invertebrado produciendo la infección mixta en el hospedero vertebrado, hacen de *T. rangeli* un tema en especial interesante para la investigación. Por tal razón, el presente trabajo se realizó teniendo como objetivo el estudio del comportamiento de *T. rangeli* en diferentes medios y condiciones biológicas, con el fin de obtener información comparativa la cual nos permitirá evaluar a nivel médico la manera como influye la presencia del parásito *T. rangeli* en infecciones mixtas con *T. cruzi*.

Materiales y Métodos

Parásitos

Cepa Choachí-2V (Tcol-193). Procedente del municipio de Choachí, en el departamento de Cundinamarca y aislada de un insecto *R. prolixus*.

Cepa Durán (Tcol-194). Procedente de la zona de Tibú, en el departamento de Norte de Santander y aislada de insecto intradomiciliario *R. prolixus*.

Ambas cepas fueron cedidas por el Centro de Investigaciones en Microbiología y Parasitología (CIMPAT) de la Universidad de los Andes y purificadas en el Laboratorio de Parasitología del Instituto Nacional de Salud, ambas en Bogotá, Colombia. Se encontró que la cepa original Choachí estaba mezclada con *T. cruzi*; por lo tanto, luego de su purificación, la denominamos Choachí-2V.

Cultivos

Mantenimiento del parásito en medio axénico: Los parásitos se mantuvieron en el laboratorio mediante pases sucesivos cada diez días, en tubos con medio de cultivo bifásico Tobie y RE1, suplementado con suero fetal bovino al 4%. Se utilizó incubadora con temperatura de 24° C y humedad relativa del 60%. También se hizo seguimiento de supervivencia del cultivo a temperatura de 30 C y 36.5 C.

Las poblaciones de los parásitos utilizadas para los inóculos intracelómicos de los insectos respectivamente, se obtuvieron a los ocho días de siembra del cultivo axénico, momento en el cual las poblaciones de Choachí y Durán se encontraban en la fase estacionaria con mayor probabilidad de encontrarse tripomastigotes metacíclicos.

Metaciclógenes en cultivo axénico: Para el seguimiento de la transformación metacíclica de los parásitos en cultivo, se sembró 1 ml de población de *T. rangeli* de ambas cepas respectivamente, en tubo con 2ml de medio de cultivo RE1.

Luego, cada dos días durante 15 días, se tomaron muestras en láminas de estos cultivos, se fijaron con metanol y se colorearon con solución Giemsa en proporción de 1 ml de solución madre y 9 ml de buffer fosfato pH 7.2 y se hizo el recuento de formas metacíclicas en un universo de 200 parásitos.

Estudio isoenzimático: Para la identificación por isoenzimas, se cosechó población parasitaria de ambas cepas, a partir del cultivo axénico con crecimiento aproximado de 10⁶ parásitos/ml. Se hizo lavados sucesivos y por centrifugación y se obtuvo precipitado compacto el cual se procesó según técnica publicada.³⁵

Se llevó a cabo la electroforesis en acetato de celulosa para la identificación mediante el análisis de los tres sistemas enzimáticos más significativos: enzima málica (ME.), glucosa fosfato isomerasa (GPI) y malato dehidrogenasa (MDH); considerándose que ME es el sistema más apropiado para la clara diferenciación entre *T. rangeli* y *T. cruzi*.³⁶

Vector

Rhodnius prolixus - Infección experimental. Colonia originaria de Guateque – Boyacá, Colombia, mantenida por el grupo de Entomología – Instituto Nacional de Salud, Bogotá, Colombia. Para conocer el comportamiento de estas cepas de *T. rangeli* en el insecto vector, se

seleccionaron grupos de 20 individuos sanos de quinto estadio ninfal en condiciones de inanición, con el fin de infectarlos con cultivo del parásito vía intracelómica.

Se tomaron poblaciones de cultivo axénico en fase estacionaria de las dos cepas de *T. rangeli* del estudio y se inocularon grupos de ninfas de *R. prolixus* con una dosis de 0.05 ml de población parasitaria/individuo, permitiéndoles alimentarse sobre ratones sanos. Los insectos una vez engurgitados se llevaron a un sitio oscuro, a temperatura de 24 C y con humedad del 60%.

Estas ninfas infectadas con *T. rangeli* Choachí -2V y Durán, respectivamente, se revisaron a partir del día 9 hasta el día 25 después de la infección, tomando un insecto al azar de cada uno de los dos grupos infectados y mediante un corte del tarso de la pata delantera, se tomó una gota de la hemolinfa para visualizar al microscopio el material obtenido en búsqueda de formas parasitarias. Cuando la hemolinfa se encontró con flagelados, se procedió a revisar las glándulas y luego de confirmada la positividad, se procedió a sacrificar todo el grupo de ninfas. Se les extrajo la totalidad de la hemolinfa con la ayuda de una pipeta Pasteur y se llevó el material a un vial. La disección de las glándulas salivares se llevó a cabo sobre un portaobjetos con solución salina estéril, luego de romperlas por homogenización con ayuda de jeringa se observaron a través del microscopio. El material obtenido de hemolinfa y glándulas salivares se inoculó en ratones para continuar los estudios de comportamiento de las dos cepas en el hospedero vertebrado.

La toma de muestras de la hemolinfa y glándulas salivares se llevó a cabo teniendo cuidado de no tocar con el abdomen del insecto la lámina y pipeta Pasteur donde se tomaron las respectivas muestras, con el fin de evitar que secreciones intestinales contaminaran el material.

Se hicieron láminas permanentes de hemolinfa y glándulas, coloreadas con Giemsa como respaldo de los hallazgos y con el fin de obtener fotos de las formas del parásito encontradas en cada caso. Finalmente, se tomó muestras de heces de los insectos a manera de control y se examinaron al microscopio para el reconocimiento de formas flageladas.

Infección experimental en ratones. Se utilizaron las cepas ICR de ratones exocriados (*Mus musculus*) y Balb/C endocriados existentes en el Bioterio del Instituto Nacional de Salud. Para el manejo de los ratones se siguieron las normas éticas para la experimentación con animales enunciadas por ICLAS.

Para la infección de ratones con *T. rangeli*, cepas Choachí-2V y Durán, se utilizaron camadas de ratones lactantes de 10 días (dejándolos con la madre) y grupos de ratones destetados de 14 días de edad.

Los ratones lactantes fueron inoculados con 0.1 ml de cultivo axénico del parásito el cual fue obtenido de forma

previa a partir de siembra de sangre positiva de ratones inoculados con hemolinfa positiva. Los ratones destetados se inocularon por vía intraperitoneal con cultivo axénico del parásito *T. rangeli* en un volumen de 0.2 ml y a una dosis de 100.000 parásitos/ratón, con escasas formas metacíclicas.

La dosis de inóculo con la hemolinfa y glándulas salivares correspondió a 0.2 ml/ratón, tanto en lactantes como destetados debido al escaso volumen que se logra obtener de estas muestras; sin embargo, este material presenta un porcentaje de formas infectantes muy elevado, cerca del 90%, lo que asegura el éxito de la infección.

Se hizo el seguimiento de todos los ratones inoculados con las diferentes muestras, a partir del día 5 hasta el 25 a intervalos de dos días, tomando gota de sangre (3 µl) mediante un pequeño corte de la porción terminal de la cola sobre una lámina y observando en fresco bajo el microscopio en busca del parásito circulante.

Resultados

Cultivo axénico – Metaciclologénesis – Identificación isoenzimática. La máxima transformación metacíclica en cultivo de las dos cepas *T. rangeli* del estudio, fue de alrededor el 5% para Durán y del 8% para Choachí-2V al día 10 del cultivo. El crecimiento poblacional máximo a temperatura de 30 °C se observó entre los días 8 y 12, después de los cuales el cultivo empezaba a presentar deterioro y mortalidad de los parásitos. La cepa Durán a temperatura de 30 °C mostró crecimiento más exuberante que a temperatura de 23 °C., mientras que la cepa Choachí-2V a 36.5 °C presentó igualmente buen crecimiento poblacional.

El estudio isoenzimático de las poblaciones parasitarias a partir de cultivo axénico, analizando los tres sistemas de identificación más utilizados, mostró que las dos cepas estudiadas correspondían a *Trypanosoma rangeli* (Figura 1).

Infección del insecto. Las ninfas de quinto estadio de *R. prolixus* inoculadas con la cepa *T. rangeli* Choachi- 2V mostraron positividad en la hemolinfa entre los días 9 y 18 posinfección. La observación de flagelados en glándulas salivares para Choachí-2V fue a partir del día 10. Las formas del parásito en hemolinfa correspondían a epimastigotas y metacíclicas largas y cortas, dependiendo del proceso de maduración (Figura 2). Se encontraron formas de la cepa Durán en hemolinfa un poco más tarde, al día 15 y en glándulas salivares aproximadamente al día 28 posinfección.

En las glándulas salivares de insectos infectados con ambas cepas se observó que la mayoría de las formas encontradas (90%) fueron metacíclicas tempranas y maduras y un porcentaje menor de epimastigotas (Figura 3) En las infecciones con ambas cepas se pudo observar aumento de tamaño de las glándulas salivares

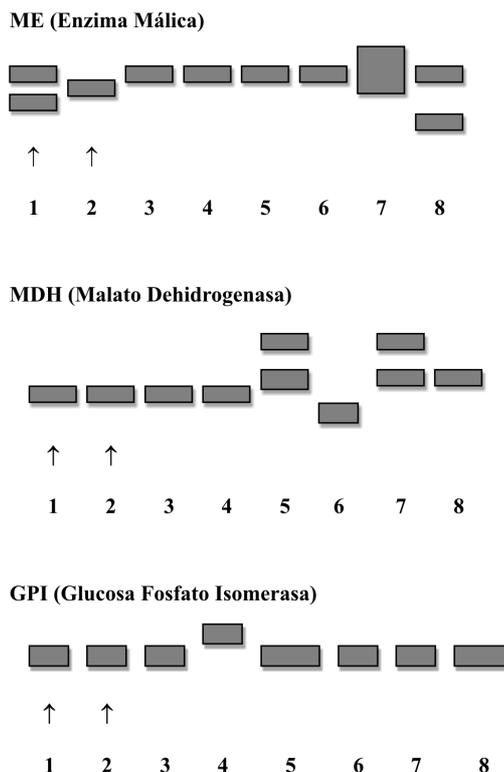


Figura 1. Representación esquemática de los patrones isoenzimáticos de las cepas de *T. rangeli* del estudio y cepas de referencia.

ME:
 Carril 1: *T. cruzi* Col178 ; Carril 2: *T. rangeli* Col90; Carril 3: *T. rangeli* Col11; Carril 4: *T. rangeli* Col193 Choachí 2V; Carril 5: *T. vivax* Col 195; Carril 6: *T. rangeli* Col194 Durán; Carril 7: *Crithidia* Col199 ; carril 8: *T.cruzi* Col18
 MDH:
 Carril 1: *T. cruzi* Col178 ; Carril 2: *T. rangeli* Col90; Carril 3: *T. rangeli* Col11; Carril 4: *T. rangeli* Col193 Choachí 2V; Carril 5: *T. vivax* Col 195; Carril 6: *T. rangeli* Col194 Durán; Carril 7: *Crithidia* Col199 ; carril 8: *T. cruzi* Col18
 GPI:
 Carril 1 *T. rangeli* Col193 Choachí 2V; Carril 2: *T. rangeli* Col194 Durán;
 Carril 3: *T. rangeli* Col11; Carril 4: *T. cruzi* Col178; Carril 5: *T. cruzi* Col196;
 Carril 6: *T. cruzi* Col191; Carril 7: *T. cruzi* Col143; Carril 8: *T. cruzi* Col173.

con aspecto opalescente. También se evidenció aumento considerable en la cantidad de hemolinfa comparativamente con ninfas no infectadas pero igualmente alimentadas.

La cantidad de formas del parásito de Choachí-2V encontradas en hemolinfa fue más abundante que lo encontrado para la cepa Durán, cerca de 100 por campo en aumento de 40x. Se puede anotar la presencia de diversidad de formas dependiendo del momento posinfección en que se encontraba el insecto, desde largas y grandes hasta cortas y pequeñas correspondientes a epimastigotas y tripomastigotas metacíclicas. La movilidad de los flagelados, encontrados tanto en hemolinfa como en glándulas salivares, fue mayor para la cepa Choachí-2V.

En la revisión de las heces de todos los insectos infectados no se observaron formas metacíclicas, lo que asegura la purificación de estas dos cepas de *T. rangeli*, por lo tanto, la ausencia en el aislamiento de población mixta con *T. cruzi*. Como observación adicional, la hemolinfa con parásitos una vez retirada del insecto y mezclada con solución salina al 0.85%, mostró escaso tiempo de supervivencia de los flagelados (12 horas).

Infección en ratón. Los ratones inoculados con formas del parásito procedentes de hemolinfa y glándulas, de las dos cepas de *T. rangeli* del estudio, tuvieron un período de prepatencia corto, ya que para Choachí-2V al día 2 post-infección se pudo observar la presencia de parásitos en promedio de 10-12 /3 μ l de sangre y al día 6 las parasitemias fueron de 50 parásitos / 3 μ l aproximadamente, posteriormente las parasitemias descendieron hasta no visualizarse parásitos después del día 15 (Figura 4).

En el caso de Durán las parasitemias al día 2 fueron de 1 parásito/gota, al día 4 las parasitemias fueron de 5 parásitos/gota y al día 6 se encontraron 3 parásitos/gota, después de lo cual no fue posible observar parásitos circulando. No todos los ratones de los dos grupos inoculados con cultivos axénicos de ambas cepas presentaron parasitemias aparentes.

Se pudo evidenciar que los trypomastigotes sanguíneos de *T. rangeli*, muestran un movimiento característico diferente a *T. cruzi* ya que manifiestan un desplazamiento de reptación vibrátil tanto por el extremo anterior como posterior.

Los ratones infectados con o sin parasitemia evidente fueron sacrificados entre los días 7 y 30 posinoculación, se les tomó muestra de sangre de corazón y ésta fue llevada a cultivo en medio Tobie con RE1 suplementado con suero fetal bovino.

En todos los casos se pudo obtener cultivos axénicos positivos de las cepas Choachí-2V y Durán a partir de los siete días y hasta treinta días después de la infección.

Discusión

El presente estudio permitió la purificación de dos cepas del parásito *Trypanosoma rangeli* y tal como fue descrito por otros investigadores, de acuerdo con la morfología, sitio de hallazgo en el vector, y estudio isoenzimático, se puede confirmar que las cepas del estudio Choachí -2V y Durán corresponden en su identificación a *T. rangeli*.

El seguimiento de estas cepas permitió evidenciar que *T. rangeli* sufre metaciclologénesis en el medio de cultivo axénico utilizado en el estudio, encontrándose mayor porcentaje para Choachí -2V que para la cepa Durán; sin embargo, para ambas cepas la transformación metacíclica que se observó es menor que la conocida para las cepas de *T. cruzi*.

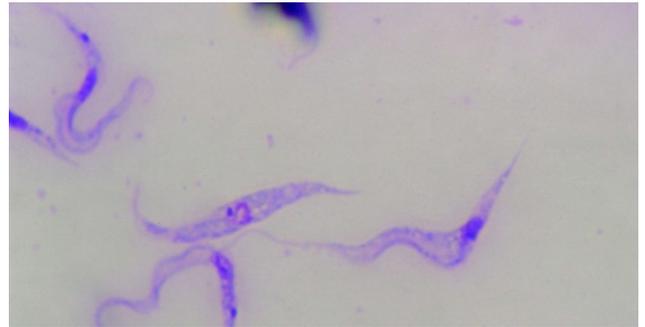


Figura 2. *Trypanosoma rangeli* (Choachí-2V) en hemolinfa de *Rhodnius prolixus*, día 10 post infección experimental: se observan dos formas metacíclicas y dos epimastigotas (Giemsa, 100x).

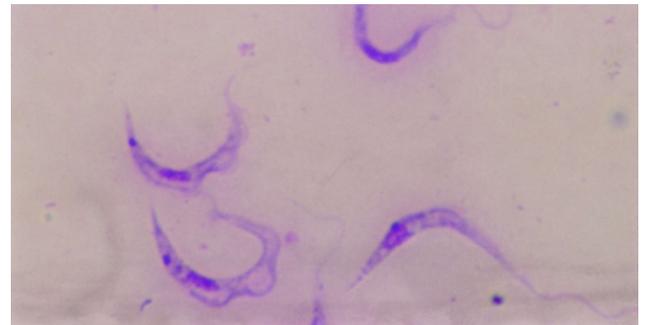


Figura 3. *Trypanosoma rangeli* (Choachí-2V) en glándula salivar de *Rhodnius prolixus*, día 10 post infección experimental: se observan tres formas metacíclicas y una epimastigota (Giemsa, 100x).

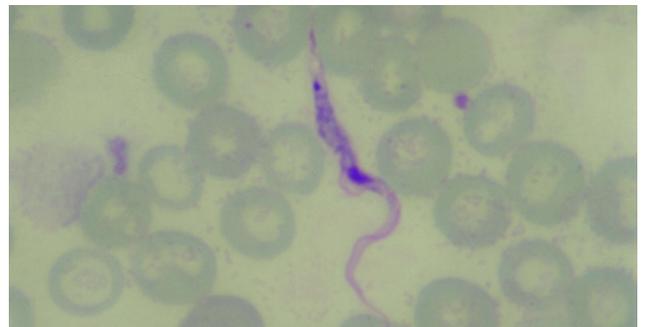


Figura 4. *Trypanosoma rangeli* (Choachí-2V) en sangre de ratón, día 10 post infección experimental. Se observa tripomastigote (Giemsa, 100x).

A manera de comparación, manteniendo los cultivos a tres diferentes temperaturas, se observó que *T. rangeli* soporta satisfactoriamente un rango amplio de temperatura y se adapta muy bien a los 36.5 C, temperatura de muchos vertebrados incluyendo al hombre. Con el estudio en vector se pudo aislar *T. rangeli* de hemolinfa y glándulas salivares de *R. prolixus* después de la inoculación intracelómica, corroborando la presencia de estadios infectivos de este parásito en dichos órganos igual a lo que ocurre en la naturaleza. Todas las formas descritas de *T. rangeli* a nivel del insecto vector,^{18, 37} se pudieron observar en nuestros resultados.

En las heces de los insectos infectados, el parásito se presentó únicamente en forma epimastigota pero en ningún caso se observaron formas infectivas.

Desconocemos la causa del menor número de parásitos y su escasa movilidad de la cepa Durán encontrados en la hemolinfa y glándulas de *R. prolixus* infectados en laboratorio, ya que tanto Choachí como Durán fueron aisladas originalmente de *R. prolixus* intradomiciliados, lo que indica que esta especie es su vector. Es probable que el número inferior de parásitos encontrados sea debido al hecho de la baja transformación metacíclica en el cultivo del cual se cosechó el inóculo para la infección.

En cuanto a la infección en ratón con las cepas *T. rangeli*, se encontró bajas parasitemias, siendo menores para ratones con la cepa Durán comparados con los Choachí-2V y mucho menores para ambas cepas, cuando el parásito provenía de cultivo axénico que cuando el inóculo del parásito provenía de manera directa de la hemolinfa y glándulas salivares. Evento que puede ser debido al hecho que las formas procedentes del insecto son en su gran mayoría infectivas, además de la presencia de posibles potenciadores glandulares que permiten el éxito de infección en el hospedero por la inoculación, aunque la cantidad existente sea baja.

El período de prepatencia tuvo variación dependiendo de la cepa de *T. rangeli* como de la edad de los ratones inoculados y de la fuente del inóculo. La explicación más probable para la presencia de los parásitos en sangre al día 2 posinoculación de hemolinfa y glándulas es que dichos parásitos fueron los inoculados; sin embargo, cabe anotar que después del día 15 no fue evidente la presencia de los parásitos pero se confirmó su presencia, lo que indica permanencia de *T. rangeli* en el hospedero vertebrado.

Está por demostrarse todavía el hecho que *T. rangeli* pudiera multiplicarse en su hospedero vertebrado y queda la inquietud si aquellas formas circulantes hasta 30 días o más sean las mismas del inóculo o corresponden a formas producto de la división dentro del hospedero vertebrado; se sabe muy poco de los mecanismos de permanencia de *T. rangeli* en sangre o de manera intracelular; sin embargo, en la actualidad se ha comprobado que algunas cepas del parásito *T. rangeli* infectan células de vertebrados *in vitro*.^{29, 38}

Con respecto a la parasitemia de los ratones pertenecientes a los distintos grupos y procedencia del inóculo, es probable que el menor número de trypomastigotes encontrados en ratones infectados con Durán indique la existencia de un comportamiento propio de cepa. También es probable que sea debido a que la metaciclogénesis en cultivo axénico para Durán fue menor que para Choachí - 2V y, por lo tanto, las formas infectantes inoculadas inicialmente en el ratón a partir de esta población fueran menores, lo que disminuye la probabilidad de éxito en la infección.

En cuanto a la observación de las formas del parásito, en algunos casos las metacíclicas de varias cepas y clones de *T. cruzi* son semejantes en su morfología a las metacíclicas de *T. rangeli* con kinetoplasto subterminal, de manera que la disposición del kinetoplasto no siempre es un

parámetro que permita distinguir con certeza ambos parásitos.

Para el análisis isoenzimático los resultados están de acuerdo con lo informado por otros investigadores,³⁶ donde se confirma a la enzima málica (ME) como un marcador de diagnóstico para la diferenciación de *T. cruzi* y *T. rangeli*, exhibiendo la actividad de dos locus en el primer caso y un solo locus para el segundo caso.

Las pruebas de infección celular *in vitro* que se llevaron a cabo utilizando línea Vero y población de la cepa Choachí-2V a partir de cultivo axénico han revelado que este parásito infecta las células con índice de infección bajo y eso puede ser debido a que la población utilizada en estas pruebas de infección fue cosechada de cultivo axénico con baja metaciclogénesis.

Estudios anteriores con la cepa *T. rangeli* C23 (TCol-11) revelan resultados de parasitemias más elevadas en ratón y la infección celular *in vitro* más exitosa,²⁹ que lo encontrado en este estudio.

Al parecer, la cepa Choachí-2V muestra una mejor adaptación que Durán tanto en el insecto vector como en el hospedero vertebrado, aun cuando en cultivo axénico su crecimiento poblacional es semejante.

Consideramos muy importante en los estudios de investigación con *T. rangeli* tener la certeza que las poblaciones utilizadas para los diversos estudios sean puras y correspondan de manera exclusiva a una especie de trypanosomátido, ya que es conocido en la naturaleza que existe la presencia de *T. cruzi* y *T. rangeli* simultáneamente en un mismo vector y por lo tanto puede ocurrir fácilmente la obtención de poblaciones mixtas de un aislamiento original.

Teniendo el material de *T. rangeli* y conociendo sobre su comportamiento, sigue abierta la posibilidad de buscar respuestas con respecto al papel protector que puede desempeñar *T. rangeli* en las infecciones con *T. cruzi*.

Referencias

1. D'Alessandro A. Biology of Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli, Tejera 1920. In Lumsden WHR, Evans DA. (eds) Biology of Kinetoplastida. Academic Press, London, vol 1. 1976: 327-403.
2. Aguilar FJ. Enfermedad de Chagas en Guatemala. Rev Col Med Guatemala 1971; 22(1):19-25.
3. Peñalver LM, Rodríguez MI, Bloch MY, Sancho G. Tripanosomiasis en el Salvador. Arch Coleg Méd Salvador 1965; 18(1): 97-134.
4. Montero GF. Trypanosoma rangeli en Costa Rica. I Congreso Latinoamericano y II Nacional de Microbiología de México, 1978.
5. Sousa OE, Johnson CM. Frequency and distribution of Trypanosoma cruzi y Trypanosoma rangeli in the Republic of Panama. Am J Trop Med Hyg 1971; 20:405-10.
6. Groot H. Nuevo foco de trypanosomiasis humana en Colombia. An Socied Biología Bogotá 1951; 4:220-1.

7. Pifanoi F, Mayer M, Medina R, Benaim-Pinto H. Primera comprobación de *Trypanosoma rangeli* en el organismo humano por cultivo de sangre periférica. *Archiv Venez Med Tropical Parasit Med* 1948; 2(2):89-120.
8. Torres RA. *Trypanosoma rangeli* (Tejera, 1920) en La Guajira Venezolana. Estudio del parásito en el humano. *Kasmera* 1979; 7(1 y 4):41-63.
9. Herrera A. Trypanosomiasis producida por *Trypanosoma rangeli* en el Perú. III Congreso Peruano de Microbiología y Parasitología. Conferencias y Mesas redondas. Trujillo, Perú, 1970: 31-9.
10. Lucena DT, Márquez RJ. Primeiro caso de infeccao huaman por *Trypanosoma rangeli*. Tejera 1920 no Brasil. *Rev Bras Med* 1954; 11(4): 535-40.
11. Ramírez LE, Machado MI, Maywald PG, Matos A, Chiari E, Silva EL. First evidence of *Trypanosoma rangeli* in the southeast of Brazil an endemic region for Chagas' disease. *Rev Soc Bras Med Trop* 1998; 31(1): 99-102.
12. 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.
13. Mansfield JM. Non pathogenic *Trypanosomes* of mammals. In Kreir JP (ed). *Parasitic Protozoa*, 1977.
14. Gómez I. Nuevas observaciones acerca de la acción patógena del *Trypanosoma rangeli*, Tejera 1920 sobre *Rhodnius prolixus* (Sthal, 1859). *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 1967 ; 9: 5-10.
15. Marinkelle CJ. Pathogenicity of *Trypanosoma rangeli* for *Rhodnius prolixus* (Stahl) in nature (Hemiptera: Reduviidae) (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). *J Med Entomol* 1968; 5(4): 497-9.
16. Groot H. Further observations of *Trypanosoma ariarii* of Colombia, South America. *Am J Trop Med Hyg* 1952; 1:585-92.
17. D'Alessandro A, Mandel S. Natural infections and behavior of *Trypanosoma rangeli* and *Trypanosoma cruzi* in the vector *Rhodnius prolixus* in Colombia. *J Parasitol* 1969; 55(4): 846-52.
18. Cuba CA. Revisión de los aspectos biológicos y diagnósticos del *Trypanosoma* (herpetosoma) *rangeli*. *Rev Soc Bras Med Trop* 1998; 31(2):207-20.
19. Grewal MS. *Trypanosoma rangeli* Tejera 1920 in its vertebrate and invertebrate host. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1956; 50:301-2.
20. Schaub GA. The effects of *Trypanosomatids* on insect. *Adv Parasitol* 1992; 31:255-319.
21. Tobie EJ. Fate of some culture flagellates in the hemocoel of *Rhodnius prolixus*. *J Parasitol* 1968; 54:1040-6.
22. Watkins R. Histology of *Rhodnius prolixus* infected with *Trypanosoma rangeli*. *J Invertebr Pathol* 1971; 117:59-66.
23. Añez N. Studies on *Trypanosoma rangeli* Tejera 1920. V. Developmental pattern in the alimentary canal of *Rhodnius prolixus*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1983, 78(2):183-91.
24. Schottelius J, Muller V. Differentiation between *Trypanosoma cruzi* and *T. rangeli* by their different complement sensitivity. *Trop Med Parasit* 1982; 33:147-50.
25. Schottelius J, Muller V. Interspecific differentiation of *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma conorhini* and *Trypanosoma rangeli* to *Rhodnius prolixus* and mode of transmission by invertebrate host. *J Parasitol* 1984; 50:593-8.
26. Stheindel M, Carvalho-Pinto C, Toma HK, Mangia RH, Ribeiro-Rodriguez R, Romanha A. *Trypanosoma rangeli* (Tejera 1920) isolated from a silvatic rodent (*Echimys dasthrix*) in Santa Catarina island, Santa Catarina State: first report of *Trypanosoma* in Southern Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1991; 86:73-9.
27. Miranda Santos I, Pereira ME. Lectin discriminate between pathogenic and non-pathogenic South American *Trypanosomes*. *Am J Trop Med Hyg* 1984; 33:839-44.
28. Schottelius J, Muller V. Interspecific differentiation of *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma conorhini* and *Trypanosoma rangeli* by lectins and combination with complement lysis. *Acta Tropica* 1984; 41:29-38.
29. Zúñiga C, Palau MT, Penin P, Gamallo C, de Diego JA. Characterization of a *Trypanosoma rangeli* strain of Colombian origin. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1997; 92(4): 523-30.
30. Anthony R, Johnson C, Soussa O. Use of micro-Elisa for quantitating antibody to *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*. *Am J Trop Med Hygiene* 1979; 6:969-73.
31. Guhl F, Marinkelle CJ. Antibodies against *Trypanosoma cruzi* in mice infected with *T. rangeli*. *Ann Trop Med Parasitol* 1982; 76(3):361.
32. Basso B, Moretti E, Fontenia S, Vottero-Cima N. *Trypanosoma* (Schizotrypanum) *cruzi* and *Trypanosoma* (Herpetosoma) *rangeli*. II. Overlapping of antigenic spectrum. *Rev Latinoam Microbiol* 1989; 2:141-6.
33. Cárdenas ME, Marinkelle CJ. Reactividad cruzada entre *Trypanosoma rangeli* y *Trypanosoma cruzi* y su posible papel protector en una infección chagásica en ratones. *MEDUNAB* 1998; 1(1): 14-21.
34. Zúñiga C, Paláu MT, Penin P, Gamallo C, de Diego JA. Protective effect of *Trypanosoma rangeli* against infections with a highly strain of *Trypanosoma cruzi*. *Trop Med Int Health* 1997; 2(5):482-7.
35. Godfrey DG, Kilgour V. Enzyme electrophoresis in characterizing the causative organism of *Gambia trypanosomiasis*. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 1976; 70:219-24.
36. Breniere SF, Bosseno MF, Barnabe C, Urdaneta-Morales S, Tibayrenc M. Populations genetics of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*; taxonomical and epidemiological purpose. *Biol Res* 1993; 26:27-33.
37. Vallejo GA, Marinkelle CJ, Guhl F, Sánchez N. Comportamiento de la infección y diferenciación morfológica entre *Trypanosoma cruzi* y *T. rangeli* en el intestino del vector *Rhodnius prolixus*. *Rev Brasil Biol* 1988; 48(3): 577-87.
38. Osorio Y, Travi BL, Palma GI, Saravia N. Infectivity of *Trypanosoma rangeli* in promonocytic mammalian cell line. *J Parasitol* 1995; 8(15):687-93.