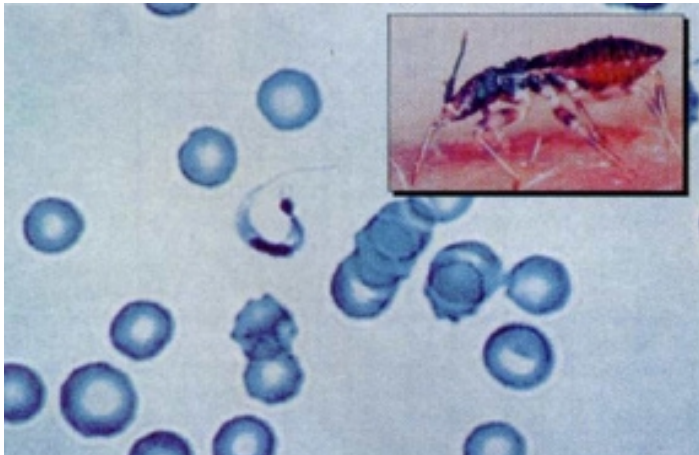


Artículos Originales

Reactividad cruzada entre *Trypanosoma rangeli* y *Trypanosoma cruzi*, y su posible papel protector en una infección chagásica en ratones

María Eugenia
Cárdenas Angelone*
Cornelis J. Marinkelle**



Extracelularmente se observa la imagen de un tripomastigote. En el recuadro superior se encuentra el *Rhodnius prolixus*, vector del *Trypanosoma cruzi*. (Tomado de la revista Bienestar, Organización Sanitas Internacional, Mayo-Junio de 1997)

Resumen

Sobre la base de la gran similaridad antigénica entre *T. rangeli* y *T. cruzi*, que ha sido reportada por diversos investigadores, el presente estudio muestra un fenómeno de protección en ratones de experimentación OF-1 frente a una infección chagásica, con previa inmunización de los animales con dos estadios de desarrollo de *T. rangeli* (tripomastigotes metacíclicos y/o epimastigotes), por diferentes rutas corporales. El seguimiento de los animales se realizó mediante tasa de mortalidad, observación de comportamiento y aspecto físico, curva de parasitemia, titulación de anticuerpos IgG por medio de Inmunofluorescencia Indirecta y detección de fracciones antigénicas relevantes reconocidas por medio de Inmunoblot. Los resultados comparativos arrojados por el estudio, permiten observar que: hubo una mejor protección frente a la enfermedad, en aquellos animales inmunizados solo con epimastigotes de *T. rangeli*, utilizando rutas corporales combinadas de inoculación; que la inmunización con metatripomastigotes de *T. rangeli* parece aumentar el curso de la infección con *T. cruzi*; y que existen por lo menos tres polipéptidos de importancia que además de ser responsables de la reactividad cruzada entre las dos especies, también pueden tener algún papel en el fenómeno de protección.

Palabras Clave

Trypanosoma rangeli, *Trypanosoma cruzi*,
Trypanosomiasis Americana, Enfermedad de Chagas.

* Bacterióloga M.Sc.

** Md. Ph D.

Centro de Investigaciones en Microbiología y Parasitología Tropical. Departamento de Ciencias Biológicas, Universidad de Los Andes, Santafé de Bogotá, D. C. Colombia, 1996.

Correspondencia Dra. M. E. Cárdenas:
Universidad Autónoma de Bucaramanga
Facultad de Medicina. A.A: 1642

INTRODUCCION

En varios países de América Latina se han reportado infecciones conjuntas entre *T. cruzi* y *T. rangeli*, donde el primero causa la enfermedad de Chagas, y el segundo no es patógeno para el hombre. La enfermedad es predominantemente rural con repercusión urbana, afecta al menos a 20 millones de personas en Latinoamérica y ha tomado auge la transmisión vía transfusiones sanguíneas. La infección ocurre mediante penetración de tripomastigotes infectivos presentes en las heces del vector a través de abrasiones en la piel ó mucosas. Las fases de incubación, aguda y de latencia suelen pasar desapercibidas, y la fase crónica se manifiesta generando con frecuencia incapacidad laboral al paciente debido a la cardiopatía chagásica. Ha sido sugerido que algunas características de la enfermedad pueden poseer un elemento inmunopatológico debido a presencia de autoanticuerpos contra el miocardio.

Aprovechando la similitud antigénica reportada entre las dos especies de tripanosomas^{2,4} (hasta de un 60%) que muestra reactividad cruzada, y dado que comparten zonas de distribución geográfica, así como reservorios y vectores, se pretende conseguir una posible inmunización con el inocuo para vertebrados *T. rangeli*, sin que ésta acarree problemas secundarios de autoinmunidad.

MATERIALES Y METODOS

CULTIVOS DE TRIPANOSOMAS

*Epimastigotes de *T. rangeli cepa P-19* y *T. cruzi cepa Catatumbo* fueron obtenidos masivamente en medio RE-I modificado³, cosechados en fase exponencial. Estos fueron utilizados para preparar antígeno formalizado para Inmunofluorescencia Indirecta (IFI), para inmunización de los ratones según esquema (Tabla 1) y para obtener extracto proteico para la realización del Western-blot, previa cuantificación de proteínas totales por el método de Lowry⁷.

*Los tripomastigotes de *T. rangeli*, se obtuvieron de glándula salival de *Rhodnius prolixus* mediante infección intrafemoral de ninfas de 5o. estadio⁸, y se utilizaron para la inmunización de los ratones según esquema, y para obtener extracto proteico para realizar Western-blot.

*Los tripomastigotes de *T. cruzi* fueron mantenidos mediante inoculaciones intraperitoneales quincenales de ratones CFW de 40 días de edad, y se utilizaron para retar los ratones del experimento, previamente inmunizados con *T. rangeli*.

INDUCCION DE INMUNIDAD E INFECCION CON *T. cruzi*.

*Grupos de ratones hembras OF-1, de 23 días de edad, fueron inmunizados por diferentes rutas corporales, con

metatrimastigotes y/o epimastigotes de *T. rangeli* (10^5 formas totales en un volumen máximo de 0,1 ml de PBS), de acuerdo a la Tabla 1. Por la ruta subcutánea, se inmunizaron con y sin adyuvante de Freund. En el primer estímulo con adyuvante completo y en los siguientes alternando la utilización del adyuvante incompleto. Los estímulos se realizaron durante seis ocasiones con intervalos de ocho días. Ocho días después del último estímulo, fueron retados intraperitonealmente los ratones con 10^5 tripomastigotes sanguíneos de *T. cruzi*, y éste fue considerado el día cero.

SEGUIMIENTO DE LOS RATONES Y SU RESPUESTA INMUNE

A partir del día 5º post-reto, se les inició a los ratones una curva de parasitemia de *T. cruzi*/ml sangre vs. tiempo de infección, mediante recuento de tripomastigotes en cámara de Neubauer. Al mismo tiempo se anotaron datos relacionados con presencia de enfermedad, comportamiento y crecimiento, así como tiempo de sobrevivencia (para tasa de mortalidad = TM). Se extrajo suero a los ratones, para la realización de IFI e Inmunoblot en el período pre-reto y en los días 14, 31, 48 y 72 post-reto. Para la técnica de inmunoblot, se enfrentaron mezclas de sueros de los ratones de los diferentes grupos de inoculación (ver Tabla 1), extraídos tanto en el período pre-reto (mezcla I), como en el período post-reto (mezcla II), con membranas de nitrocelulosa, que contenían 5 carriles con las siguientes proteínas: carril 1: antígeno de glándula salival de *R. prolixus* infectada con metatrimastigotes de *T. rangeli*; carril 2: glándula salival sana como control; carril 3: antígeno de epimastigotes de *T. rangeli*; carril 4: medio RE-I como control; y carril 5: antígeno de epimastigotes de *T. cruzi*. En términos generales fueron utilizados como criterios de protección, tiempo de sobrevivencia y curva de parasitemia.

ANALISIS ESTADISTICOS

Los datos de supervivencia y curva de parasitemia, fueron sometidos a la prueba *t* de Student, considerándolos estadísticamente significantes a un nivel de $P < 0,05$. Los cálculos estadísticos se aplicaron para la comparación de hipótesis nulas y alternas planteadas entre los diferentes grupos de inoculación, por ejemplo:

"La TM de los ratones inmunizados con epimastigotes de *T. rangeli* es igual (hipótesis nula) ó es menor (hipótesis alterna) que la TM de los ratones no inmunizados".

"La parasitemia de los ratones inmunizados con epimastigotes de *T. rangeli* es igual (hipótesis nula) ó es menor (hipótesis alterna) que la parasitemia de los ratones no inmunizados"

Tabla 1. Resumen de la clasificación de los ratones utilizados en el estudio.

Se observa la clasificación de los ratones empleados en el experimento, de acuerdo a la ruta y el antígeno empleado en la inmunización. Igualmente se observa la manera como fueron mezclados los sueros para la realización del inmunoblot: la sección I corresponde al período pre-reto y la sección II al período post-reto con el patógeno. ID=intradérmica; SC=subcutánea; IP=intra-peritoneal.

RATONES	No. GRUPOS DE INOCULACION	ANTIGENO RECIBIDO EN LA INMUNIZACION (De <i>T. rangeli</i>)	RUTA DE INOCULACION PARA INMUNIZAR	MEZCLA DE SUEROS PARA BLOT
1 - 4	1	Epimastigotes	Intradérmica	A-I y A-II
5 - 8	2	Epimastigotes	Intraperitoneal	A-I y A-II
9 - 13	3	Epimastigotes	Subcutánea con adyuvante	A-I y A-II
15 - 18	4	Epimastigotes más Tripomastigotes	Intradérmica	B-I y B-II
19 - 22	5	Epimastigotes más Tripomastigotes	Intraperitoneal	B-I y B-II
23 - 27	6	Epimastigotes más Tripomastigotes	Subcutánea con adyuvante	B-I y B-II
14	7	Epimastigotes	Subcutánea sin adyuvante	C-I y C-II
28	7	Epimastigotes más Tripomastigotes	Subcutánea sin adyuvante	C-I y C-II
29 - 32 y 37	8	No fueron inmunizados, solo retados con <i>T. cruzi</i> cepa Catatumbo como control	————— o —————	D-I y D-II
33 - 34	9	Epimastigotes	Combinadas (ID-SC-IP)	E-I y E-II
35 - 36	10	Epimastigotes más Tripomastigotes	Combinadas (ID-SC-IP)	F-I y F-II
38	11	Epimastigotes (control No retado)	Combinadas	G-I y G-II
39	11	Epimastigotes más Tripomastigotes (Control no retado)	Combinadas	H-I y H-II
40		CONTROL		

De acuerdo con los valores calculados y teóricos del valor de Z, se infirió en la curva normal, y se eligió la hipótesis aceptable, que para ambos casos arriba mencionados fue la hipótesis alterna.

RESULTADOS

COMPORTAMIENTO Y SUPERVIVENCIA

En todos los ensayos llevados a cabo, la supervivencia y estado físico de los ratones, puntualizados hasta el día 130 post-infección, fue mayor y mejor respectivamente, en términos generales para los ratones inmunizados con epimastigotes de *T. rangeli* solamente (Fig. 1 y Tabla 2). Los grupos que tuvieron mejor sobrevivencia fueron el No. 1 y el No. 9, quienes además de tener 0% de TM tuvieron el mejor estado físico aparente de buena salud. Seguidos por el grupo No. 6, que recibió en la inmunización tam-

bién metatripomastigotes de *T. rangeli*, quienes mostraron también 0% de TM, pero con mal estado físico de salud, caracterizado por mala nutrición y "pelo erizado".

PARASITEMIAS

En términos generales, todos los ratones del experimento, que fueron retados con *T. cruzi*, desarrollaron parasitemia durante la fase aguda de la infección. Sin embargo los inmunizados previamente, retardaron el inicio de dicha parasitemia unos días en comparación con los controles, y por otro lado, dichas parasitemias fueron más bajas (reducción hasta de 2 log. para el grupo No. 9). Fig. 2. A su vez, entre los ratones inmunizados con epimastigotes solamente, y además con tripomastigotes, los primeros desarrollaron niveles más bajos de parasitemia. Hacia el día 21, que fue el pico máximo alcanzado por los controles no inmunizados, se observa una parasitemia mucho más baja en los ratones

Tabla 2. Aspecto Físico y fecha de muerte de los ratones de experimentación.

ASPECTO FISICO Y FECHA DE MUERTE DE LOS RATONES DE EXPERIMENTACION.					
No. DEL RATON	Días Post-Infección con <i>T. cruzi</i> cepa Catatumbo.				
	DIA 15o.	DIA 30o.	DIA 45o.	DIA 130o.	DIA DE MUERTE
1	N	N	N	N	
2	N	N	N	N	
3	N	N	N	N	
4	N	N	N	N	
5	N	N	N	N	
6	N	N	N	N	
7	N	Pelo Erizado	Mal nutr.-Paraliz.		*45
8	N	N	N		
9	N	N	N		118
10	N	N	N	N	
11	N	N	N	N	
12	N	N	N	N	
13	N	N	N	N	
14	Pelo Erizado	Pelo Erizado	Mal nutr.-Paraliz.		90
15	Pelo Erizado-Hinchado				23
16	Pelo Eriz.-Hinchado.				28
17	Pelo Erizado	Hinchado	Hinchado		121
18	N	Hinchado	Hinchado	Hinchado	
19	N	Distendido	Distendido	Distendido	
20	N				31
21	N	N	N	N	
22	N	N	N	N	
23	Pelo Erizado-Mal nutrid.	Pelo Eriz.-Mal nutr.	Pelo Eriz.Mal nut.	Pelo Eriz.-Mal nut.	
24	Pelo Erizado-Mal nutrid.	Pelo Eriz.-Mal nutr.	Pelo Eriz.Mal nut.	Pelo Eriz.-Mal nut.	
25	Pelo Erizado-Mal nutrid.	Pelo Eriz.-Mal nutr.	Pelo Eriz.Mal nut.	Pelo Eriz.-Mal nut.	
26	Pelo Erizado-Mal nutrid.	Pelo Eriz.-Mal nutr.	Pelo Eriz.Mal nut.	Pelo Eriz.-Mal nut.	
27	Pelo Erizado-Mal nutrid.	Pelo Eriz.-Mal nutr.	Pelo Eriz.Mal nut.	Pelo Eriz.-Mal nut.	
28	Pelo Erizado-Mal nutrid.	Pelo Eriz.-Mal nutr.	Paraliz.-Morib.		124
29	Pelo Erizado-Paralizado				26
30	Hinch.-Pelo Eriz.-Irrit.				25
31	Pelo Erizado	Mal nutr.-Paraliz.			60
32	Pelo Erizado-Paralizado				29
33	N	N	N	N	
34	N	N	N	N	
35	N	Hinchado	Hinchado	Hinchado	
36	N	Pelo Eriz.-Hinch.			46
37	N	Pelo Erizado			129
38	N	N	N	N	
39	N	N	N	N	
40	CONTROL SANO	CONTROL SANO	CONTROL SANO	CONTROL SANO	

OBSERVACIONES:

N = Normal (Comparativamente con el Ratón No. 40 que es el control Sano)

Mal nutrido=Mal nutr.= Grado severo de desnutrición con exceso en la pérdida de peso

Paralizado - Paraliz. = No responde a estímulos

Hinchado - Hinch. = Distendido = Aumento en el tamaño del abdomen

Irritable - Irrit. = Sensible a la palpación corporal

Pelo Erizado - Pelo Eriz. = Escasa o Moderada pérdida de pelo, con pérdida de su simetría

Moribundo - Morib. = Estado terminal del animal

* La Fecha de muerte está dada en el día post-infección con *T. cruzi* en que muere el animal

inmunizados con epimastigotes solamente (grupos de inoculación No. 1, 2, 3 y 9) que fueron los que coincidieron en todos los demás aspectos analizados, con tener el mejor curso de la infección. Las parasitemias de los animales que sobrevivieron a la fase aguda de la infección disminuyó hacia el día 38, cuando algunos empezaron a negativizarse por examinación microscópica.

INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA

Fueron considerados positivos los títulos 1:16. Esta técnica permitió evaluar los títulos tanto anti-*T. rangeli*, como anti-*T. cruzi*, desarrollados por los animales, a medida que avanzó la infección, y por lo mismo, durante el período pre-reto, permitió observar la reactividad cruzada demostrada entre las dos especies. Los grupos de inoculación No. 1 y 4 (inmunizados intradérmicamente) no mostraron producción de anticuerpos en este período, y los grupos No.2, 3, fueron los que mostraron reactividad cruzada (suero anti-*T. rangeli*, reconociendo antígeno de *T. cruzi* formalizado). En el período post-reto, los títulos más altos de ambos tipos de anticuerpos, fueron alcanzados por el grupo No. 1. El mayor título alcanzado en promedio para todos los grupos, de ambos tipos de anticuerpos fue hacia el día 31, y a partir de entonces empezaron a disminuir (Tabla 3).

INMUNOBLOT

De acuerdo con el esquema de realización descrito en la Tabla 1, los resultados arrojados por el ensayo fueron las siguientes bandas (bd.) de reacción: Fig. 3.

Período Pre-reto:

CARRIL 1:

10-13 bd. entre 19-128 kDa comunes al carril 2, excepto por:

*45 kDa (sólo en carril 1, reconocida por la mezcla C-I).

*35, 163 y 186 kDa (sólo en carril 2 por C-I).

*31 y 54 kDa (sólo en carril 2 por F-I), y

*25 kDa (sólo en carril 2 por B-I).

CARRIL 3:

A-I, B-I, C-I, G-I y H-I reconocieron las siguientes bd.:

25, 37, 46, 51, **61, 71 y 77** kDa (prominencia de tres últimas)

F-I, además de las anteriores: 100, 112 y 146 kDa.

CARRIL 5:

A-I: 73 kDa (tenue).

(reac. cruzada) C-I, E-I y G-I: 26, 40 y 73 kDa (tenues).

Período Post-reto:

CARRIL 1 y 2: Variación solamente cuantitativa en comparación con pre-reto.

CARRIL 3:

G-II reconoció 3 bd. de alto PM: 128, 135 y 150 kDa.

D-II (reac. cruzada sentido contrario): 20, 60 y 76 kDa. Tenues.

CARRIL 5:

8 bd. de reacción entre 22-80 kDa.

Tabla 3. Títulos de anticuerpos por IFI

Muestra títulos de Ac tanto contra antígeno de *T. rangeli*, como contra *T. cruzi*, antes del reto y a medida que avanza el tiempo luego del reto. Se muestran los títulos de los grupos que tuvieron mejor comportamiento (No. 1, 2, 3 y 9) y del grupo control no inmunizado (No. 8) -: Negativo.

Grupo de Tipo inoculación	Pre-reto Ag.	1	4D	31D	48D	72D
1	Ag. Tr	1/64	1/64	1/512	1/128	1/16
	Ag. Tc	—	1/16	1/512	1/128	1/32
2	Ag. Tr	1/32	1/128	1/256	1 1/128	1/8
	Ag. Tc	1/16	1/32	1/64	1/64	1/32
3	Ag. Tr	1/128	1 1/128	1/128	1/64	1/32
	Ag. Tc	1/16	1/32	1/64	1/32	1/16
8	Ag. Tr	—	1/4	1/16	1/32	—
	Ag. Tc	—	1/16	1 1/128	1/256	1/128
9	Ag. Tr	1/128	1/32	1 1/128	1/64	1/4
	Ag. Tc	—	1/16	1/32	1/128	1/64

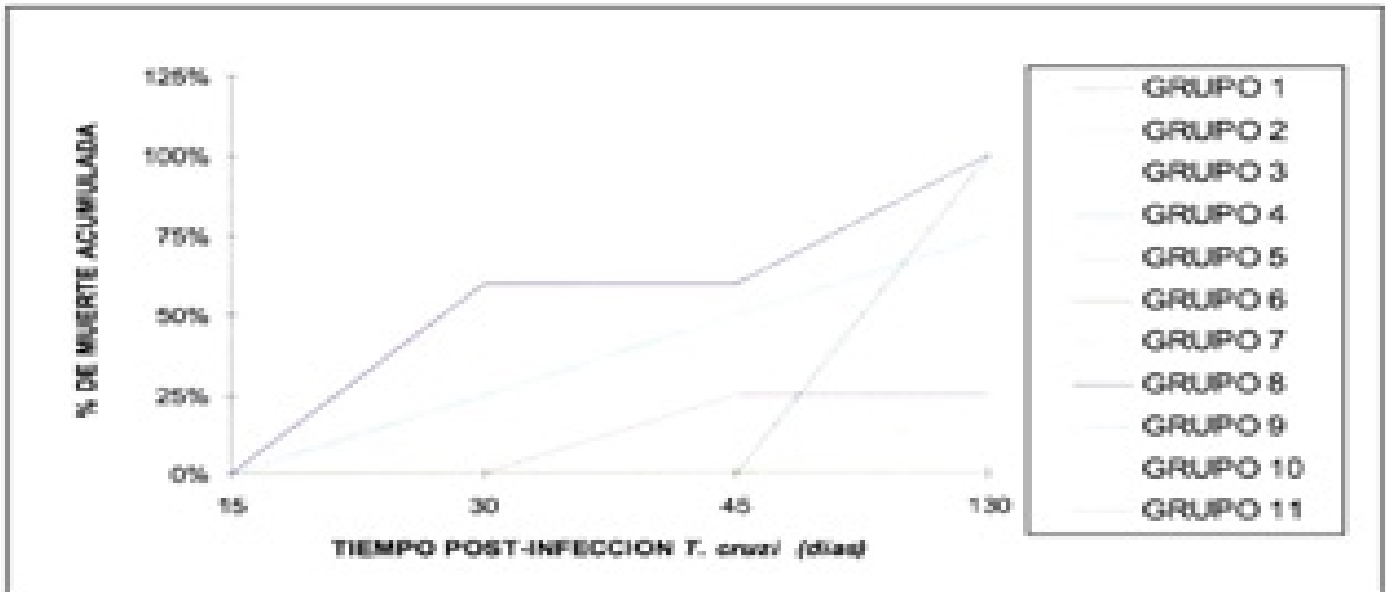


Figura 1. Rata de muerte acumulada de los ratones de experimentación. Ver el texto. Los grupos No. 1, 6, 9 y 11 tuvieron 0% de mortalidad. Los grupos No. 2 y 5 mostraron la misma mortalidad durante el estudio

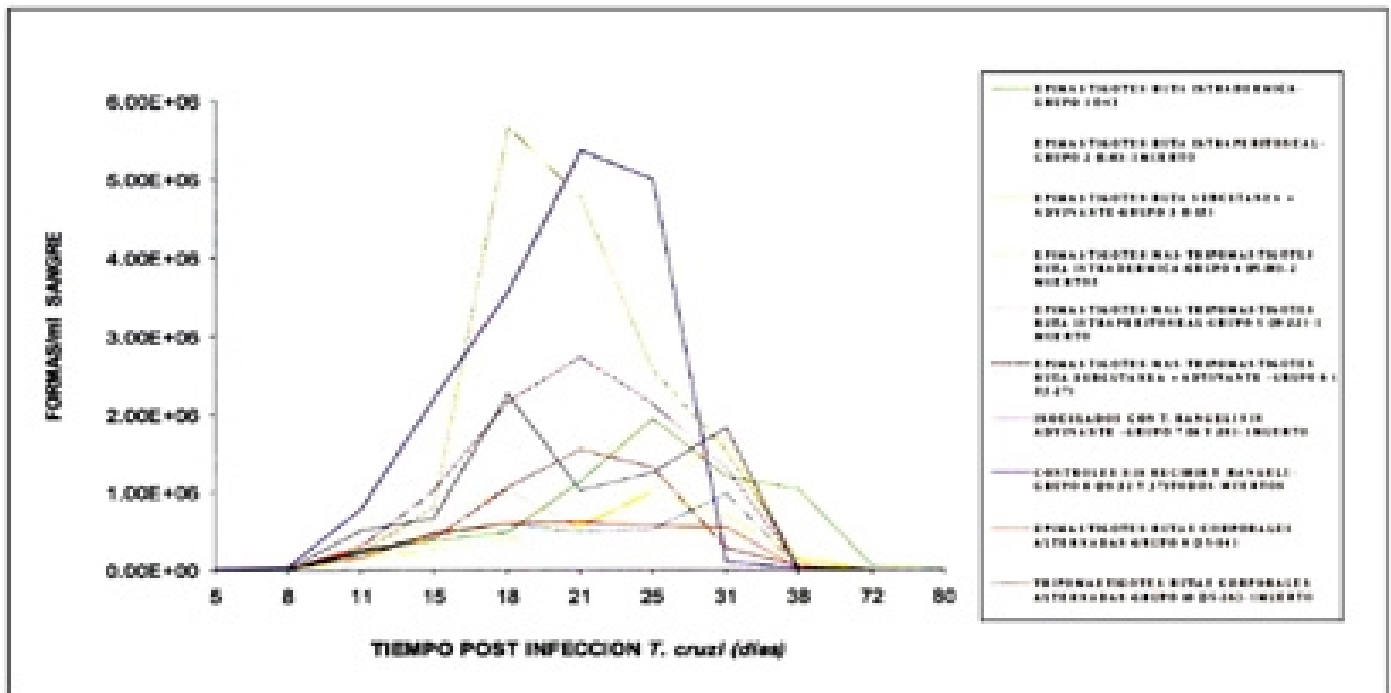


Figura 2. Curvas promedio de los diferentes grupos de inoculación. Muestra las parasitemias entre los diferentes grupos de inoculación ya expuestos, en forma comparativa, se observa que la mayor parasitemia definitivamente ocurrió entre los no inmunizados, siendo la excepción el grupo número cuatro. Todas las curvas promedio siguieron un esquema parecido con inicios, subidas y declives hacia los mismos días en términos generales. El grupo con mínimo nivel de parasitemias fue el grupo nueve.

DISCUSION

Estudios comparativos entre el patógeno *T. cruzi* y el no patógeno *T. rangeli*, han revelado similitudes a nivel antigénico, bioquímico y genético². La reacción cruzada entre los dos parásitos, detectada por IFI, está de acuerdo con los reportes publicados de que las dos especies comparten hasta un 50% de sus epítopes inmunogénicos⁶. Los resultados obtenidos en el presente trabajo están de acuerdo con los anteriores hallazgos, ya que a partir de epimastigotes, más que de metatripomastigotes de *T. rangeli*, fue posible inducir en ratones de experimentación una cierta respuesta inmune humoral, detectable con antígenos de *T. cruzi*, para producir una resistencia parcial a la infección con la cepa Catatumbo de *T. cruzi*, medida tanto por nivel de parasitemia, como por rata de muerte.

A pesar de que todos los animales desarrollaron parasitemia, los inmunizados con epimastigotes de *T. rangeli*, solamente, por cualquier vía corporal, y más aún cuando se utilizaron rutas corporales combinadas, fueron los que mostraron niveles más bajos de parasitemia y también tasas de mortalidad más bajas. Así mismo, fueron ellos quienes en el período pre-reto demostraron aunque baja, una cierta reactividad cruzada con antígenos de superficie de *T. cruzi*, detectada mediante la técnica de IFI, la cual se constituyó en un 38%, lo que está de acuerdo con estudios previos⁶. De la misma manera, puede decirse que este esquema de inoculación es buen método para la obtención de buenos títulos de sueros control positivo anti-*T. rangeli*.

Otro hecho observado en el presente estudio, es que los metatripomastigotes de *T. rangeli*, inoculados previamente al reto con *T. cruzi*, no solo fueron mucho menos inmunogénicos que los epimastigotes, como ha sido reportado⁵, sino que al parecer empeoraron el curso de la infección en los ratones empleados, considerando el he-

cho curioso de que en la naturaleza las formas infectantes del *T. rangeli*, son precisamente los tripomastigotes metacíclicos provenientes de glándula salival del vector. Lo que haría pensar en la posibilidad de realizar estudios epidemiológicos encaminados a la comparación en la severidad de cuadros clínicos entre poblaciones humanas afectadas por infecciones únicas con *T. cruzi*, o afectadas por infecciones mixtas con *T. rangeli*.

De acuerdo con los resultados del presente estudio, se observa que la inmunización con *T. rangeli*, utilizando adyuvante de Freund por vía subcutánea no mostró variación en cuanto a parasitemia, ni tasa de mortalidad, ni títulos de anticuerpos, comparándoles con los animales inmunizados por la misma ruta sin utilizar el adyuvante, similar a un reporte previo¹.

Se pudo observar con los presentes resultados que la teoría de algunos autores, sobre la necesidad de que ambos tipos de respuesta, tanto humoral como celular sean indispensables para la defensa del huésped, es bastante valedera, pues justamente en los ratones inmunizados por rutas corporales combinadas demostraron la mejor resistencia a la enfermedad.

Los animales inmunizados sólo con epimastigotes de *T. rangeli*, lograron sobrevivir a la fase aguda de la enfermedad, desarrollando un aparente estado de equilibrio entre el huésped y el parásito, posiblemente gracias a la presencia de anticuerpos protectores. Si se tiene en cuenta el hecho de que el nivel de parasitemia en la fase aguda, no está directamente relacionado con la gravedad de la enfermedad, podría considerarse la posibilidad de estudios posteriores que no necesariamente estén encaminados a bloquear la infección inicial, pero sí a prevenir las manifestaciones clínicas posteriores de la enfermedad.

La reactividad cruzada entre las dos especies de tripanosomas, también fue detectada mediante análisis de inmunoblot. Sueros anti-*T. rangeli*, de los ratones inmunizados solo con epimastigotes en el período pre-reto, reconocieron con antígeno heterólogo de *T. cruzi*, un polipéptido de 71-73 kDa, presente también y de manera prominente en el carril del antígeno homólogo. Si bien para *T. rangeli*, no ha sido descrita aún ninguna proteína conocida con dicho peso, para *T. cruzi*, ha sido demostrada la existencia de una glicoproteína GP-72, la cual junto con otros cuatro antígenos de 32, 44, 54 y 61 kDa, ha sido reportada por algunos autores⁴, como los cinco antígenos más prominentes compartidos por las dos especies de tripanosomas, en el estadio de epimastigote. Igualmente, los sueros de estos mismos ratones reconocieron de manera menos intensa otras dos bandas de Mr 26 y 40 kDa frente al antígeno de *T. cruzi*, que podrían también ser epítopes comunes de proteínas de reacción cruzada; las cuales, además, podrían tener algún papel relevante en el fenómeno de protección frente a la infec-

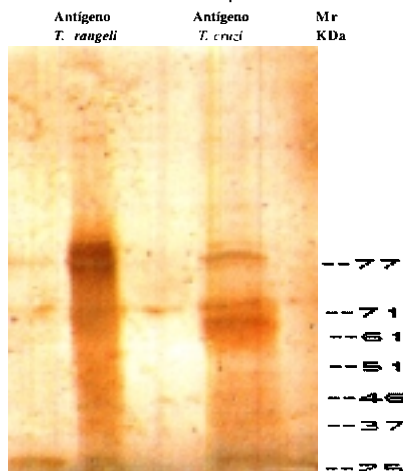


Figura 3. Inmunoblot con suero extraído en el período pre-reto de los ratones No. 33 y 34 (inmunizados con epimastigotes de *T. rangeli*, utilizando rutas corporales combinadas para la inoculación)

ción con *T. cruzi*, que fue observada, ya que fueron reconocidas solamente por los ratones inmunizados con epimastigotes, quienes mostraron mayor resistencia a la enfermedad (Fig. 3).

En cuanto a las bandas reconocidas en los carriles 1 y 2 (glándula salival infectada y glándula control sana, respectivamente), es importante anotar que en su mayoría estuvieron presentes en ambos carriles, y esto es lógico, ya que a pesar de los lavados realizados a los metatripomastigotes, pudo quedar algún residuo de glándula salival, o incluso el parásito pudo incorporar sustancias del medio, de tal modo que al ser inoculados al ratón, despertaran algún tipo de respuesta inmune. La baja antigenicidad de los tripomastigotes de *T. rangeli*, ya ha sido previamente reportada⁵, y también el hecho que nuevamente se observó en este estudio, de que los epítopes antigénicos del parásito parecen estar restringidos al estadio de epimastigote. Solamente hubo una banda de Mr 45 kDa, presente solo en el carril de glándula infectada y no en el carril control, que podría adjudicarse al estadio de tripomastigote, pero que aún no ha sido estudiada. Por el contrario las otras seis bandas presentes en el carril control y no en el carril 1, puedan ser un hecho que se deba a una pérdida de expresión normal de proteínas, debido a la infección parasitaria, pues como es sabido, el *T. rangeli*, a diferencia del *T. cruzi*, es patógeno para el vector, y precisamente uno de los órganos que más le afecta son las glándulas salivales.

Finalmente la reacción cruzada en sentido contrario, es decir suero anti-*T. cruzi*, reconociendo antígeno de *T. rangeli*, se detectó en el período post-reto con el suero de los ratones control no inmunizados; los cuales reconocieron tres bandas tenues de Mr aprox. de 20, 60 y 74 kDa, con prominencia de la última (posiblemente la misma de 73 kDa mencionada antes).

Con todo lo anterior en mente se abre la posibilidad de buscar nuevos enfoques a la prevención de la enfermedad de Chagas, sin la utilización de antígenos propios de *T. cruzi*, evitando correr el riesgo de despertar una

patogénesis autoinmune, teoría que ha sido postulada por muchos autores.

SUMMARY

Based on the great antigenic similarity between *T. rangeli* and *T. cruzi*, that has been reported by several researchers, the present study shows a phenomenon of protection in lab mice - OF 1 against a chagas disease infection with previous immunization of the animals by means of the different developmental stages of *T. rangeli* (metacyclical tripomastigotes and/or epimastigote) in several routes of entry. The follow-up of the animals was carried out through mortality rate, observation of changes of behavior and physical appearance, parasitemic curve, antibody titer of IgG by indirect immunofluorescence, and detection of antigenic relevant fractions recognized by the immunoblot.

The comparative results of the study show that: there was a better protection against the disease in those animals immunized only with epimastigotes of *T. rangeli* using combined corporal routes of inoculation, also; that immunization with metatripomastigotes of *T. rangeli* seems to increase the infection course with *T. cruzi*; and that, at least three polypeptides of importance exist that, besides being responsible of the crossed reactivity between the two species, they can also have a role in the protection phenomenon.

BIBLIOGRAFIA

1. Basso B, Moretti E, Vottero-Cima E. Immune Response and Trypanosoma cruzi infection in Trypanosoma rangeli-immunized mice. Am J Trop Med Hyg. 1991; 44: 413-419.
2. Bronzina A, D'alessandro A, Segura E. Diferencias y similitudes antigénicas entre Trypanosoma rangeli y Trypanosoma cruzi. Med. 1980; 40: 45-49.
3. Duque S, Peláez D, Corredor A. Normas para cultivo in vitro de Parásitos de la familia Trypanosomatidae. Manual de Procedimientos Instituto Nacional de Salud. 1993.
4. Grogl M, Kuhn R. Identification of antigens of culture forms of Trypanosoma cruzi and Trypanosoma rangeli recognized by sera from patients with chronic Chaga's Disease. J Parasitol. 1984; 70: 822-824.
5. Guhl F, Hudson L, Marinkelle CJ, et al. Clinical Trypanosoma rangeli infection as a complication of Chagas's Disease. Parasitol. 1987; 94: 475-484.
6. Guhl F, Marinkelle CJ. Anticuerpos contra Trypanosoma cruzi en ratones infectados con Trypanosoma rangeli. Am Trop Med Parasitol. 1982; 76: 361.
7. Lowry O, Rosenbrogh M, Farr L, Randall R. Protein measurement with the Folin-phenol reagent. J Biol Chem. 1951; 193: 265-275.
8. Vallejo GA, Marinkelle CJ, Guhl F, Sanchez N de. Mantenimiento en el laboratorio de Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli Tejera, 1920. Rev Biol Trop. 1986; 34: 75-81.