

**UNIVERSIDAD NACIONAL
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO
POSGRADO EN CIENCIAS VETERINARIAS TROPICALES**



Infección experimental de vectores de la enfermedad de Chagas (Reduviidae: Triatominae) y de un modelo murino, con cepas de *Trypanosoma rangeli* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) genéticamente diferentes.

MARLEN CORDERO SERRANO

Heredia, 16 de abril de 2008

Tesis sometida a consideración del Tribunal Examinador de Posgrado Regional en Ciencias Veterinarias Tropicales para optar al grado de Magíster Scientae en Enfermedades Tropicales.

Infección experimental de vectores de la enfermedad de Chagas (Reduviidae: Triatominae) y de un modelo murino, con cepas de *Trypanosoma rangeli* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) genéticamente diferentes.

Marlen Cordero Serrano

Tesis presentada para optar al grado de Magíster Scientae en Enfermedades Tropicales. Cumple con los requisitos establecidos por el Sistema de Estudios de Posgrado de la Universidad Nacional. Heredia. Costa Rica.

MIEMBROS DEL TRIBUNAL EXAMINADOR

Luis Nazario Araya, Ph.D.
Miembro del Consejo Central de Posgrado

Sandra Estrada König, M.Sc.
Coordinadora PCVET

Rodrigo Zeledón Araya, Ph.D.
Tutor

Andrea Urbina Villalobos, M.Sc.
Lectora

Marco Herrero, Ph.D.
Lector

Marlen Cordero Serrano
Sustentante

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por darme la vida y las fuerzas para permitirme concluir mis estudios.

A mi familia, mis padres y mis hermanas, por todo su amor, apoyo y dedicación.

A Edgar por su amor y su apoyo.

Al Dr. Rodrigo Zeledón, por darme la oportunidad y el honor de realizar mi tesis bajo su tutoría, por su dedicación, consejos, guía, entrega y apoyo incondicional.

A mis lectores, la Dra. Andrea Urbina y el Dr. Marco Herrero, por sus recomendaciones y su apoyo.

A mis amigos, especialmente a Sue Hellen Gamboa, por toda la ayuda que me brindo y por su gran amistad.

A todo el personal del Laboratorio de Zoonosis, Heriberto Gutiérrez, Sergio Alfaro, quienes me ayudaron siempre y me guiaron en mi trabajo.

Al Consejo Nacional para Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICIT) por la beca otorgada para realizar esta maestría.

DEDICATORIA

A mis padres, Carmen y Rodolfo
y mis hermanas Nidia, Grettel y Evelyn,
los tesoros más grandes que tengo en mi vida.

ÍNDICE GENERAL

Agradecimientos	v
Dedicatoria	vi
Índice General	vii
Índice de cuadros	viii
Índice de figuras	ix
Resumen	x
Abstract	xi
Introducción	1
Definición del problema	18
Objetivos	20
<i>Objetivo general</i>	20
<i>Objetivos específicos</i>	20
Materiales y Métodos	21
Materiales	21
Métodos	22
<i>I Parte: Curvas de crecimiento en cultivo monofásico</i>	22
<i>II Parte: Estudio de las dos cepas en insectos triatóminos</i>	24
<i>III Parte: Estudio de infección en ratones con ambas cepas</i>	25
<i>Estudio morfológico de las dos cepas de T. rangeli</i>	26
<i>Análisis Estadístico</i>	27
Resultados	28
Discusión	52
Conclusiones	62
Recomendaciones	63
Bibliografía	64

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1.	Especies de triatóminos utilizadas para la infección con <i>T. rangeli</i>	22
Cuadro 2.	Datos de picos máximos de crecimiento de cepas <i>T. rangeli</i> de genotipos diferentes en diversos medios de cultivo monofásicos.	34
Cuadro 3.	Cantidad estimada de parásitos en hemolinfa de insectos infectados con la cepa JMZ16 (KP1-)	37
Cuadro 4.	Cantidad estimada de parásitos en hemolinfa de insectos infectados con la cepa EV26 (KP1+)	38
Cuadro 5.	Cantidad estimada de parásitos en hemolinfa de diferentes especies de triatóminos inoculados con <i>T. rangeli</i> JMZ16 (KP1-)	40
Cuadro 6.	Cantidad estimada de parásitos en hemolinfa de diferentes especies de triatóminos inoculados con <i>T. rangeli</i> EV26 KP1+	42
Cuadro 7.	Cantidad estimada de parásitos en la hemolinfa de diferentes especies de insectos triatóminos infectados con <i>T. rangeli</i> JMZ16 (KP1-)	44
Cuadro 8.	Cantidad estimada de parásitos en la hemolinfa de diferentes especies de insectos triatóminos infectados con <i>T. rangeli</i> EV26 (KP1+)	45
Cuadro 9.	Número acumulativo de insectos infectados con <i>T. rangeli</i> (KP1- y KP1+) en hemolinfa (del 3° al 28 día) y glándulas salivales (del 15 al 30 día)	46
Cuadro 10.	Experimento #1 en ratones usando cepas <i>T. rangeli</i> de reciente aislamiento de ratones infectados	49
Cuadro 11.	Experimento #2 en ratones usando cepas <i>T. rangeli</i> de reciente aislamiento de ratones infectados	49
Cuadro 12.	Experimento #3 en ratones usando cepas <i>T. rangeli</i> de reciente aislamiento de ratones infectados	50
Cuadro 13.	Valores acumulativos de la infección de ratones Balb/c y Swiss en 3 experimentos con 2 cepas de <i>T. rangeli</i> de genotipos diferentes	50
Cuadro 14.	Morfometría de 2 cepas de <i>T. rangeli</i> , de genotipos diferentes, en sangre de ratón Swiss. Las cifras representan el promedio en micrómetros de 30 ejemplares medidos \pm la desviación estándar	51

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Esquema representativo de las medidas a realizar en los dibujos de cada cepa de <i>T. rangeli</i>	27
Figura 2.	Curvas de crecimiento de <i>T. rangeli</i> JMZ16 (KP1-) en medios de cultivo monofásicos	28
Figura 3.	Curvas de crecimiento de <i>T. rangeli</i> EV26 (KP1+) en medios de cultivo monofásicos	29
Figura 4.	Curvas de crecimiento de cepas de <i>T. rangeli</i> KP1- y KP1+ en medio de Warren puro	30
Figura 5.	Curvas de crecimiento de cepas de <i>T. rangeli</i> KP1- y KP1+ en medio de Warren suplementado con 10% de SFB	31
Figura 6.	Curvas de crecimiento de <i>T. rangeli</i> KP1- y KP1+ en medio de Warren suplementado con 20% de SFB	32
Figura 7.	Curvas de crecimiento de las cepas <i>T. rangeli</i> KP1- y KP1+ en medio LIT suplementado con 20% de SFB	32
Figura 8.	Curvas de crecimiento de la cepa <i>T. rangeli</i> JMZ16 (KP1-) en medios de Warren y LIT con 20% de SFB	33
Figura 9.	Curvas de crecimiento de la cepa <i>T. rangeli</i> EV26 (KP1+) en medios de Warren y LIT con 20% de SFB	34
Figura 10.	Porcentaje de epismastigotos y tripomastigotos de la cepa <i>T. rangeli</i> JMZ16 (KP1-) en medio de cultivo LIT+20% SFB	35
Figura 11.	Porcentaje de epis y tripos de la cepa <i>T. rangeli</i> EV26 (KP1+) en medio de cultivo LIT+ 20% SFB	35
Figura 12.	Cuantificación de la parasitemia en hemolinfa de 4 especies de triatóminos infectados con cepa JMZ16 (KP1-)	47
Figura 13.	Cuantificación de la parasitemia en hemolinfa de 4 especies de triatóminos infectados con cepa EV26 KP1+	48

RESUMEN

Se compararon dos cepas de *T. rangeli*, de Colombia y de Costa Rica, genotípicamente diferentes (KP1+ y KP1-), las cuales presentaron similitudes y diferencias en cuanto a diversos parámetros observados tanto *in vivo* como *in vitro*.

Ninguna de ellas logro crecer en medio líquido de Warren, aunque crecieron bien si este se adiciona de suero fetal bovino al 10 o 20 %. Las cepas presentaron diferencias en cuanto al tiempo para alcanzar los picos máximos de crecimiento que siempre fueron mayores para la cepa KP1-. Ninguna de las dos cepas logro infectar células Vero en cultivo de tejidos.

En cuanto a la infección comparativa de insectos triatóminos, inoculados por vía hemocelómica, la cepa KP1- logro completar el ciclo en su vector natural *R. pallescens*, mientras que la cepa KP1+ logro lo mismo tanto en *R. prolixus* como en *R. pallescens*, lo cual no se reporta en la literatura. Ambas cepas infectaron únicamente la hemolinfa de *T. lecticularia* y de *T. bruneri* ya que no consiguieron completar el ciclo en las glándulas salivales. En las especie *T. dimidiata* y *T. infestans*, las infecciones hemolinfáticas, con la única cepa que logro infectarlas (KP1+), fueron muy bajas y transitorias, mientras que *P. geniculatus* fue totalmente refractario a la infección con ambas cepas.

Los cultivos de las dos cepas recién recuperadas de ratones infectados, fueron capaces de infectar nuevos ratones de las razas Balb/c y Swiss, mientras que las mismas cepas mantenidas en el laboratorio en medios de cultivo por mas de 2 años, perdieron su capacidad de infectar ratones, aún usando inóculos altos. No se notó una diferencia significativa en cuanto a la susceptibilidad de ambas razas de ratones para cada una de las cepas.

En un estudio morfométrico comparativo de tripomastigotos sanguíneos, se comprobó que la cepa KP1+ aventajó significativamente en longitud y en el índice PN/NA a la cepa KP1-, lo cual sugiere que la morfometría podría ser un criterio de diferenciación entre cepas fenotípicamente diferentes. Estos resultados permiten afirmar que las cepas de *T. rangeli* de genotipos diferentes presentan diferencias importantes en cuanto al comportamiento biológico y morfológico tanto en condiciones *in vitro* como *in vivo*.

Palabras claves

Trypanosoma rangeli, Insectos triatóminos, Interacción parásito-vector, Cepas KP1- y KP1+, Genotipos, Morfometría

ABSTRACT

Two genotypically different *T. rangeli* isolates, (KP1+ and KP1-), from Colombia and Costa Rica, were compared under different *in vitro* and *in vivo* parameters, presenting similarities and differences in some aspects.

None of them was able to grow in Warren's liquid medium except when 10 to 20 % fetal calf serum was added to the medium. A difference in time for reaching the peak of the growth curve was noticed for the two isolates and KP1- strain exhibit higher figure at the peak. Also, none of them was able to grow in tissue culture inside Vero cells.

In relation to their ability to infected triatomine insects by hemocelomic injection of the parasite, the KP1- strain was able to complete the salivary gland cycle in *R. pallelescens*, whereas the KP1+ strain completed the cycle in both *R. prolixus* and *R. pallelescens*, something not reported in the literature. Both strains infected the hemolymph of *T. lecticularia* and of *T. bruneri* but were unable to complete the cycle in the salivary glands. In *T. dimidiata* and *T. infestans* the infection with KP1+, the only strain that infected these bugs, were low and transient, whereas *P. geniculatus* was completely refractory to the infection by both isolates.

The two strains, after reisolation in cultures, were able to infect two breed of mice (Balb/c and Swiss) whereas, even with high inocula, the original strains, maintained in culture for more than 2 years, were unable to infect mice. Both breeds behaved in this respect similarly.

Morphometric studies of blood trypomastigotes showed that those from the KP1+ strain were significantly longer and with larger PN/NA index than those from strain KP1-. These results suggest that both genotypes could be differentiated by their size in blood.

The results allow us to believe that *T. rangeli* of different genotypes exhibits some differences in relation to biological and morphological characteristics, both *in vitro* and *in vivo*.

Keywords

Trypanosoma rangeli, Triatomine insects, Interaction parasite-vector, Strains KP1- y KP1+, Genotypes, Morphometry

INTRODUCCION

La tripanosomiasis americana o enfermedad de Chagas ha sido estudiada desde 1909 cuando el médico brasileño Carlos Chagas descubrió el agente causante de esta enfermedad, un protozoo flagelado, al que llamó *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* y reportó el insecto vector y los primeros casos de esta tripanosomiasis (Chagas, 1909).

En 1920, durante un estudio de esta enfermedad en Venezuela, Tejera encontró en el contenido intestinal de *Rhodnius prolixus* un flagelado morfológicamente diferente a *T. cruzi*, el cual describió como una nueva especie llamándola *Trypanosoma (Crithidia) rangeli*, sugiriendo que podría ser un parásito de vertebrados (Tejera, 1920; Grewal, 1969; D' Alessandro, 1976; D' Alessandro y Saravia, 1999).

A partir de su descubrimiento, este parásito tomó importancia y actualmente es considerado el segundo tripanosoma americano que infecta al hombre y otros mamíferos (D' Alessandro, 1976; D' Alessandro y Saravia, 1999; Vallejo et al., 1999; Guhl y Vallejo, 2003).

Su importancia se debe, a que a pesar de que se caracteriza por no ser patógeno para el hombre y otros mamíferos, su distribución geográfica coincide con la de *T. cruzi*, comparte varios hospederos vertebrados e invertebrados e incluso puede producir infecciones mixtas. Además, al ser la transmisión de *T. rangeli* más eficiente y más segura (transmisión anterior) que la de *T. cruzi* (transmisión posterior) podría darse el caso de que se transmita solo el primero y se detecte en un presunto paciente, mediante xenodiagnóstico, sin ser un individuo chagásico. En otros casos se podría encontrar una infección mixta, o podría ocurrir que un *Rhodnius* infectado solo con *T. cruzi* transmita únicamente este parásito a una persona. Por ello, *T. rangeli* es estudiado dentro del contexto de la biología y epidemiología de la enfermedad de Chagas, ya que es importante poder diferenciar ambos parásitos y llegar a un acertado diagnóstico cuando se trata de un ser humano (D' Alessandro, 1976; Grisard et al., 1998; Vallejo et al., 1999; Guhl y Vallejo, 2003; Vallejo et al., 2003; Urrea et al., 2004).

El parásito

T. rangeli es un tripanosoma delgado, que mide entre 23-37 μm de longitud incluyendo el flagelo libre. Presenta una membrana ondulante bien desarrollada y un cinetoplasto pequeño, redondo y subterminal (D' Alessandro y Saravia, 1999; Guhl y Vallejo, 2003).

Este tripanosoma se encuentra ampliamente distribuido en América Central y del Sur, en países como Costa Rica, El Salvador, Guatemala, Honduras, Nicaragua, Panamá, Brasil, Colombia, Perú, Venezuela y Bolivia, infectando varias especies de mamíferos y triatóminos (Añez, 1982a; D' Alessandro, 1976; D' Alessandro y Saravia, 1992, 1999; Eger-Mangrich et al., 2001).

Desde el punto de vista taxonómico, este parásito ha sido considerado dentro del subgénero *Herpetosoma* por Hoare (1972); sin embargo, Añez (1982a) considera que este hemoflagelado presenta las características suficientes para ser colocado dentro de un nuevo subgénero que llama *Tejeraia*. No obstante, como lo afirman D' Alessandro y Saravia (1999) se requieren más estudios filogenéticos basados en la organización genética de especies de *Herpetosoma* para contar con la información necesaria que permita determinar el estatus taxonómico de *T. rangeli* y considerar si se justifica el cambio a un nuevo subgénero.

Maia da Silva et al., (2004), al realizar estudios filogenéticos de varias especies de tripanosomas, consideran que este parásito y especies análogas, reúne características que le permiten ser colocado en un nuevo clino llamado Clino *T. rangeli*, ya que presenta muchas diferencias biológicas, morfológicas y bioquímicas, con otros tripanosomas de su mismo subgénero *Herpetosoma*; sin embargo, como lo afirman los mismos autores, se requieren otros estudios para realizar cambios en la taxonomía de este parásito.

Debido a su amplia distribución geográfica, se han hecho estudios y se han encontrado diferentes características genotípicas entre las cepas de *T. rangeli*, las cuales se asocian con diferencias para infectar determinadas especies de triatóminos y hospederos vertebrados (D' Alessandro y Saravia, 1992; Grisard et al., 1999).

Una característica importante de este parásito es su facilidad para crecer bajo condiciones de laboratorio en medios artificiales difásicos como el Senekjie con medio líquido LIT, con 10% de suero fetal bovino, el cual es usado principalmente para obtener grandes cantidades de flagelados y facilitar su mantenimiento. Otros líquidos utilizados en medios artificiales

difásicos son el medio Eagle con 20% de suero fetal o el Locke con antibióticos (penicilina y estreptomicina). En estos medios se han encontrado amastigotos de 2 a 6 μm , promastigotos de 5 a 10 μm , epimastigotos cortos y largos de 20 a 70 μm y tripomastigotos de 31 a 64 μm de longitud; predominando los epimastigotos con respecto a los tripomastigotos (D' Alessandro, 1976; Añez, 1982a; D' Alessandro y Saravia, 1999).

No obstante, a pesar de su facilidad para crecer y mantenerse por largos periodos de tiempo en medios de cultivo, debe tomarse en cuenta que por periodos prolongados los flagelados pueden perder infectividad para mamíferos y se pueden modificar sus principales características biológicas, por lo que se recomienda un mantenimiento cíclico en subpasajes de ratón-insecto-ratón, insecto-ratón-cultivo-insecto, para mantener las principales propiedades infectivas en los cultivos (Vallejo et al., 1986).

Algunos autores consideran que las características biológicas de las cepas de *T. rangeli* en el hospedero invertebrado, varía con la edad de la cepa, así como con la forma en que ha sido mantenida: cultivo-cultivo, ratón-insecto-ratón, insecto-ratón-cultivo-insecto. Así mismo, se cree que el mantenimiento *in vitro* en forma prolongada de este parásito puede provocar la falta de infectividad para animales vertebrados ya que las verdaderas formas infectivas no se logran mantener (Zeledón 1954, Tobie 1964, D' Alessandro 1976, D' Alessandro y Saravia 1992).

Por otro lado, se ha demostrado que, *in vitro*, este parásito necesita de más requerimientos nutricionales para su desarrollo, ya que Zeledón (1959) al utilizar un medio líquido monofásico libre de proteínas modificado por Warren (1960) para el crecimiento de *T. cruzi*, no logró cultivar *T. rangeli*, por lo que consideró este medio como diferencial entre ambos parásitos. Pero, Minter-Goedbloed & Oliveira (1976) aseguran que fueron capaces de crecer una cepa de *T. rangeli* aislada de *Rhodnius ecuadoriensis* de Perú en este medio y la mantuvieron por al menos 10 subpasajes. Así mismo, D' Alessandro y Saravia (1992) tuvieron problemas para crecer una cepa de *T. cruzi*, y estos autores consideran que algunas cepas de *T. rangeli* pueden crecer en este medio debido a variaciones entre ellas y por ello creen que el medio de Warren no permite separar las dos especies. Estudios en nuestro laboratorio de Zoonosis con 16 cepas de *T. rangeli* y 11 de *T. cruzi*, de distinto origen, indican que la gran mayoría de las primeras son incapaces de crecer en este medio,

mientras que *T. cruzi* sí lo hace aunque algunas cepas no crecen más allá del tercero o cuarto pasaje (Zeledón et al., datos no publicados).

Vectores

Las especies del género *Rhodnius* han sido consideradas como los hospederos invertebrados naturales para este protozooario, no solo por presentar mayor infección sino también porque son las únicas en las que este parásito completa su ciclo de vida en la naturaleza, desarrollando tripomastigotos metacíclicos en sus glándulas salivales (Zeledón y Blanco, 1965; Hoare, 1972; Guhl y Vallejo, 2003). A pesar de ello, debe mencionarse que Marinkelle (1968) logró observar el ciclo completo de *T. rangeli* en *Triatoma dimidiata* de Colombia, siendo la única especie del género *Triatoma* encontrada infectada en las glándulas salivales en la naturaleza aparte de especies de *Rhodnius*.

El estudio de otros triatóminos como vectores de *T. rangeli* se ha realizado tanto en condiciones naturales como de laboratorio; en la naturaleza, especies como *Eratyrus mucronatus*, *Panstrongylus geniculatus*, *Rhodnius robustus*, *Triatoma maculata*, *T. infestans*, *T. nitida*, *Cavernicola pilosa*, entre otras, han presentado parásitos en el intestino pero no en hemolinfa y glándulas salivales, indicando que la simple presencia de estos flagelados en el intestino no significa capacidad vectorial de estos insectos. (Hoare, 1972; D' Alessandro, 1976; Guhl y Vallejo, 2003). En el caso de *R. robustus*, Miles et al., (1983), en la Región Amazónica de Brasil, encontraron, este insecto infectado en forma natural, en glándulas salivales y demostraron además su capacidad vectorial, logrando transmitir por la vía inoculativa el parásito en ratones sanos, considerándolo así un vector natural de *T. rangeli* en ese país.

T. dimidiata ha sido encontrado infectado naturalmente en su intestino con *T. rangeli*, pero no en hemolinfa y glándulas salivales fuera de Colombia, e incluso en condiciones experimentales solo ha presentado infección en intestino y hemolinfa pero las glándulas salivales permanecen libres de infección. Esto contrasta con lo afirmado por Marinkelle (1968) y, por ello, la capacidad vectorial de *T. dimidiata* es aún controversial (De León, 1949; 1959; D' Alessandro, 1976; Guhl y Vallejo, 2003).

Cabe destacar que las especies del género *Rhodnius* presentan un pigmento rojo en sus glándulas salivales, una hemoproteína conocida como nitroforina que podría ser la

responsable de que el parásito pueda desarrollarse en las glándulas y, de esta manera, completar su ciclo biológico. Las especies del género *Triatoma* carecen de este pigmento y presentan una proteína llamada trialisina, la cual lisa los parásitos y bacterias, por lo que probablemente juegue algún papel en cuanto a que *T. rangeli* no pueda establecerse en sus glándulas, haciendo que las especies del género *Triatoma* no actúen como vectores naturales de este flagelado (Soares et al., 1998; Ribeiro et al., 1998; Amino et al., 2002; Azambuja y García, 2005).

Lo afirmado por Marinkelle (1968) sobre *T. dimidiata* como posible vector en Colombia, no debe menospreciarse ya que D' Alessandro (1972), al alimentar insectos en ratones infectados con *T. rangeli*, logró obtener infección experimental en glándulas salivales no solo en *R. neglectus* sino también en varias especies del género *Triatoma* como *T. patagonica*, *T. protracta* y *T. infestans*, considerándolos como potenciales vectores de *T. rangeli* (Grewal, 1969).

Una característica de *T. rangeli* es que puede desarrollarse cíclicamente en los insectos, en cualquier estadio ninfal y en insectos de ambos sexos; además, la infección no se pierde durante el proceso de muda del insecto; pero, se ha comprobado que los dos primeros estadios son más susceptibles a la infección, es decir, que el efecto patogénico de *T. rangeli*, es mayor en estos estadios ninfales, así como en el 5° estadio ninfal (Añez, 1984; Añez et al., 1987; D' Alessandro y Saravia, 1992).

Se ha demostrado además, que este parásito puede transmitirse de insecto a insecto por un proceso conocido como canibalismo, en el cual las ninfas jóvenes se alimentan sobre las ninfas más viejas y a los pocos días presentan parásitos en su intestino y hemolinfa; de esta manera el parásito logra mantenerse por largos periodos tanto en hábitats domésticos como silvestres (Añez, 1982b).

Ciclo de vida en el hospedero invertebrado

El ciclo de vida en el insecto se inicia en el canal alimentario. Los tripanosomas de diversos hospederos vertebrados, una vez ingeridos, llegan al intestino donde se unen por medio del flagelo a algunas células epiteliales que tienen el citoplasma menos denso y empiezan a reproducirse por fisión binaria o múltiple (de Oliveira y de Souza, 2001, Dias et al., 2007).

En el intestino, se han reportado epimastigotos de 28 a 67 μm en división; sin embargo, también se presentan pequeñas formas flageladas y no flageladas, redondas u ovaladas de 5 a 7 μm de diámetro y tripomastigotos de 23 a 49 μm . Algunos atraviesan la pared intestinal y entran a la cavidad general, en donde aparecen como epimastigotos de 13 a 65 μm y tripomastigotos de 30 a 45 μm , los cuales se reproducen abundantemente en la hemolinfa antes de invadir las glándulas salivales. En estas, la morfología de los parásitos varía en relación a la duración del parasitismo, ya que conforme logran ingresar al interior de la glándula, se da el proceso de transformación de tripomastigotos a típicos metacíclicos (Groot et al., 1951; Groot et al., 1953; Groot, 1953; Zeledón, 1954; Zeledón, 1956; D' Alessandro, 1963; Hoare, 1972; D' Alessandro, 1976; Añez, 1983a, 1983b; D' Alessandro y Saravia, 1992).

La invasión de la hemolinfa puede ocurrir en diferentes tiempos después de la infección. Algunas veces a las 24 horas después de la ingesta de sangre, incluso antes de que alcance el intestino posterior, pero su establecimiento varía según la cepa de *T. rangeli*. En la mayoría de los casos, la invasión ocurre durante los primeros 50 días de infección, en un rango de 15 a 183 días (Añez, 1983b; D' Alessandro y Saravia, 1992; D' Alessandro y Saravia, 1999; Gómez et al., 1999).

El desarrollo de este parásito en la hemolinfa ocurre en dos fases: una fase extracelular, donde las formas predominantes a lo largo de la infección son epimastigotos y tripomastigotos largos, los cuales se reproducen por fisión binaria y múltiple, y una fase intracelular, donde estas formas se desarrollan en los hemocitos, que son células que se encuentran en la hemolinfa de los insectos, aquí se da una transformación de estos parásitos a esferomastigotos para seguir su desarrollo y posteriormente liberarse como formas redondeadas (Tobie, 1970; D' Alessandro, 1976; Añez, 1983b). Sin embargo, esta última fase es controversial ya que según estudios realizados por de Oliveira y de Souza (2003), los hemocitos, principalmente plasmátocitos, que aumentan en la hemolinfa de insectos infectados, son capaces de ingerir los epimastigotos y destruirlos dentro de vacuolas, siendo esta una respuesta celular a la infección por *T. rangeli*.

Posteriormente, cuando se da un buen establecimiento de los parásitos en la hemolinfa, ocurre la invasión de las glándulas salivales generalmente entre 4 y 7 días después de la infección; no obstante, algunos autores como D' Alessandro (1976) afirman que puede

presentarse hasta los 17 días o más. Groot (1953), quien fue el primero en observar este ciclo en detalle y descubrir las formas metacíclicas, afirma que la invasión puede presentarse entre tres y nueve días después de la invasión de la hemolinfa. Una vez ahí, se multiplican y transforman en metatripomastigotos, llegando a ser las formas predominantes a los 55 días posteriores a la infección donde el número en una sola glándula es mayor a los 142 000 flagelados (Groot y San Martín, 1953).

En las glándulas, al inicio de la infección, se encuentran predominantemente formas pequeñas, ovoides y fusiformes además de pocos epimastigotos en división; luego, se desarrollan epimastigotos largos de 13 a 63 μm en gran cantidad que pueden llegar a medir hasta 140 μm . (Groot et al., 1951; Groot et al., 1953; Groot, 1953; Zeledón, 1954; Zeledón, 1956; D' Alessandro, 1963; Hoare, 1972; D' Alessandro, 1976; Añez, 1983a, 1983b; D' Alessandro y Saravia, 1992). Estudios realizados por microscopía electrónica han demostrado que los epimastigotos largos se adhieren a la superficie externa (lámina basal) de la glándula salival. Primero introducen el flagelo y una vez ahí, se rodean de una vacuola que les ayuda a llegar al citoplasma de la célula glandular (Ellis et al., 1980; Meirelles et al., 2005).

Una vez ahí, los parásitos salen de sus vacuolas y permanecen bajo la forma de epimastigotos unidos a las microvellosidades de las células glandulares. En este lugar es donde se inicia la diferenciación de los epimastigotos a tripomastigotos, cortos, medianos y largos de 13 a 32 μm y finalmente se originan los pequeños metatripomastigotos de 8 a 13 μm , los cuales son infectantes para el hospedero vertebrado durante la picadura. (Groot et al., 1951; Groot, 1953; Zeledón, 1954; Zeledón, 1956; Ellis et al., 1980; Añez, 1983a; D' Alessandro y Saravia, 1992; Meirelles et al., 2005; Dias et al., 2007).

Se han descrito diversos mecanismos por los cuales los parásitos pueden penetrar las glándulas salivales. Basseri et al. (2002) consideran que en la superficie de las glándulas de *Rhodnius prolixus* se encuentran ciertos carbohidratos que podrían servir como receptores para que las formas largas de *T. rangeli* puedan unirse a la superficie de la glándula salival, previo a la invasión.

Por otro lado, Meirelles et al., (2005) consideran que los epimastigotos producen una molécula lítica, una proteína formadora de poros (PFP), llamada rangelisina, la cual, permitiría el pasaje del parásito a través de la barrera epitelial; esto causa ciertos daños

puntuales en la lámina basal de la glándula salival, descritos como hoyos, en los cuales los epimastigotos penetran hacia las células glandulares.

Se estima que la tasa de infección experimental en glándulas salivales es de 30% en *R. prolixus*, 63% en *R. neglectus* y 11% en *Triatoma* cuando alguna especie de este género se logran infectar (Groot et al., 1951; Groot, 1953; Hoare, 1972; D'Alessandro, 1976; Añez, 1982a; D'Alessandro y Saravia, 1992; Mello et al., 1995; D'Alessandro y Saravia, 1999).

Se ha demostrado que algunos parásitos llegan al recto y son excretados con las heces sin colonizar la pared rectal, como lo hace el *T. cruzi* (Zeledón, 1998). Esto sugiere que la transmisión del parásito por la ruta fecal podría ocurrir; sin embargo, los tripomastigotos encontrados aquí son diferentes a los metacíclicos de las glándulas salivales por lo que el mecanismo de transmisión posterior es controversial y no es aceptado por la mayoría de los investigadores (Groot et al., 1951; Groot et al., 1953; Groot, 1953; Zeledón, 1954; Zeledón, 1956; D'Alessandro, 1963; Hoare, 1972; D'Alessandro, 1976; Añez, 1983a, 1983b; D'Alessandro y Saravia, 1992).

Susceptibilidad de los vectores a la infección con T. rangeli

Se presentan diferencias en cuanto a la susceptibilidad de los insectos de diversas especies a desarrollar la infección debido a variaciones individuales, a la diversidad de áreas geográficas tanto de los vectores como del parásito y a la respuesta del insecto hospedero, la cual puede inhibir el desarrollo del parásito en algunas especies (Zeledón et al., 1963; Zeledón, 1965; Zeledón y Blanco, 1965; Hoare, 1972; Machado et al., 2001; de Stefani Marquez et al., 2006).

Además, se ha observado cierta resistencia de los insectos según los diferentes grados de infectividad o virulencia de los tripanosomas y se ha determinado que el porcentaje de infección en glándulas salivales es mayor en machos que en hembras, lo cual se interpreta como resistencia natural ligada al sexo (D'Alessandro, 1976). Por otro lado, este autor afirma que los insectos expuestos a una reinfección por *T. rangeli* presentan resistencia mostrando parasitemias más bajas, considerando que algún factor de la respuesta inmune podría actuar como mecanismo de resistencia a las reinfecciones (D'Alessandro, 1976).

Vizioli y Salzet (2002) demostraron que los diversos vectores han desarrollado una respuesta inmune contra microorganismos infecciosos invasores, mediante la expresión de

péptidos antimicrobianos, los cuales, podrían ser secretados por el vector para limitar el crecimiento o para favorecer el desarrollo de diferentes agentes infecciosos.

Boulanger et al., (2006) consideran que estos péptidos antimicrobianos (AMPs) en insectos triatóminos, podrían contribuir en la especificidad de las interacciones parásito-vector, ya sea regulando el número de parásitos o matándolos directamente. Con ello, se podría explicar las diferencias entre cepas de *T. rangeli* genéticamente diferentes, en cuanto a su capacidad para desarrollarse en diferentes especies de insectos vectores. Pero, se requieren mayores estudios para determinar el papel que juegan estos péptidos en la respuesta inmune del insecto contra infecciones por parásitos, no solo para contribuir con el conocimiento de las interacciones parásito-vector, sino también para ser utilizado como una herramienta de control de los agentes transmitidos por insectos.

Por otro lado, Whitten et al., (2001) estudiaron la respuesta inmune de *Rhodnius prolixus* contra la infección de dos cepas de *T. rangeli*. Ellos observaron que con la cepa H14 de *T. rangeli* los niveles de superóxido y profenoloxidasa aumentaron después de 24 horas de infección y que la concentración de nitritos y nitratos en hemolinfa aumentó considerablemente; esto provocó que el número de parásitos en hemolinfa fuera muy bajo y que esta cepa no pudiera invadir las glándulas salivales de *R. prolixus*. Por otra parte, la cepa Choachi de *T. rangeli* a pesar de que estimuló los niveles de superóxido y profenoloxidasa, en un nivel más bajo que la cepa H14, las concentraciones de nitritos y nitratos en hemolinfa fueron bajas, por lo que el parásito se multiplicó rápidamente e invadió las glándulas salivales.

Estos resultados indican que la respuesta inmune del insecto *R. prolixus* podría protegerlo selectivamente contra ciertas cepas de *T. rangeli*, permitiendo así que solo algunas de ellas puedan sobrevivir, multiplicarse y completar su ciclo de vida en el insecto (Whitten et al., 2001).

Así mismo, el alto grado de adaptación de *T. rangeli* a su hospedero invertebrado y el aislamiento geográfico que presentan los diversos linajes de este flagelado puede definir su habilidad para establecerse en un determinado insecto (Zeledón, 1970; Machado et al., 2001; Guhl et al., 2002; Vallejo et al., 2003).

Zeledón y Monge (1966) estudiando comparativamente la respuesta inmune de *T. infestans* y de *R. prolixus* a la infección por *T. rangeli*, demostraron que en *T. infestans* se dio un

incremento en el número de células fagocíticas en la hemolinfa horas después de que se estableciera la infección; mientras que en *R. prolixus*, el número de hemocitos aumentó a un nivel menor y se dió cuando la infección era alta, por lo que probablemente ya no se podían eliminar todos los parásitos presentes en la hemolinfa como lo hace *T. infestans*. Además, demostraron que en *R. prolixus* la concentración de proteínas, carbohidratos y aminoácidos disminuía considerablemente debido a la infección, mientras que en *T. infestans*, debido a que la infección fue transitoria, la concentración bajó, pero no fue tan significativa.

Patogenicidad de T. rangeli para los insectos vectores

T. rangeli es altamente patógeno para el insecto bajo condiciones naturales. Su efecto patológico varía entre las especies de insectos, independientemente de que invada solo hemolinfa o complete el ciclo en las glándulas. La patogenicidad observada en *R. prolixus* se caracteriza por el aumento de la cantidad de hemolinfa, desaparición del pigmento rojo de la epidermis, daño y deformidades durante la muda, reducción de las contracciones musculares del intestino y pared abdominal, anormalidades en los túbulos de Malpighi, lo que ocasiona una reducción de la excreción de orina y heces, falta de la hormona diurética, daño en los tejidos, cambios en la presión osmótica, parálisis de los músculos del intestino, así como una alta mortalidad (Zeledón et al., 1963; Zeledón y Monge, 1966; Gomez, 1967; Marinkelle, 1968; Grewal, 1969; Tobie, 1970; Watkins, 1971; D' Alessandro, 1976; D' Alessandro y Saravia, 1992, 1999; Guhl y Vallejo, 2003).

Ormerod (1967) demostró además, que la infección con *T. rangeli* puede causar una modificación en la concentración de aminoácidos esenciales presentes en la hemolinfa de *R. prolixus*. Según el nivel de infección producida, algunos aminoácidos, esenciales para el metabolismo del insecto, decrecen, otros aumentan y algunos se mantienen en concentraciones normales. La disminución de aminoácidos podría deberse al incremento en número de los flagelados en la hemolinfa, los cuales requieren de estos nutrientes para su desarrollo, por lo que los toman de sus hospederos (Zeledón y Monge, 1966). Así mismo, el aumento de algunos aminoácidos podría estar asociado probablemente al daño en el metabolismo de las ninfas o al aumento en el metabolismo de los flagelados que produciría

esos aminoácidos; aunque podría ser una respuesta inmune por parte del insecto contra *T. rangeli* (D' Alessandro, 1976).

El mecanismo patológico se produce en dos fases: una fase aguda, donde se da el establecimiento del parásito en el insecto, seguido de una rápida multiplicación y una invasión temprana de la hemolinfa, lo cual lleva al parásito a todos los tejidos del cuerpo donde su desarrollo podría causar daños graves en los principales sistemas como el muscular, nervioso, traqueal, provocando manifestaciones patológicas o la muerte. Luego se produce una fase crónica o tardía, caracterizada por el establecimiento del parásito en el intestino del insecto y en algunos casos por una posterior invasión en la hemolinfa, la cual también provoca una alta mortalidad (Watkins, 1971; Añez, 1984).

El estado patológico causado por este flagelado se produce en cualquier estadio ninfal, independientemente de la susceptibilidad al parásito; sin embargo, las infecciones fatales ocurren en mayor medida en el 1º y 2º estadio ninfal y en menor grado en los demás estadios, interfiriendo con la muda. Tales infecciones frecuentemente matan a los insectos, aunque en los adultos las infecciones generalmente no causan alta mortalidad (D' Alessandro, 1976; Añez, 1982b; Añez et al., 1987).

La mortalidad puede estar relacionada con el nivel de parasitemia del vertebrado donador, que influiría en la intensidad de la infección y en el grado de invasión en el insecto, ya que se ha comprobado que una infección de baja proporción en los insectos causa una baja mortalidad lo que permite que estos sobrevivientes lleguen a transmitir *T. rangeli* a varios vertebrados; así mismo, la invasión del parásito en intestino, hemolinfa y glándulas salivales provoca una alta mortalidad durante el periodo de infección (Añez, 1984; D' Alessandro y Saravia, 1992). Sin embargo, Marquez et al., (2006) observaron que no hay una correlación directa entre intensidad de infección y mortalidad, ya que para algunas especies de triatóminos, la mortalidad es muy baja aún presentando alta parasitemia en heces y hemolinfa.

Se ha descrito que en ciertos grupos de insectos la invasión del parásito a la hemolinfa y el resto del cuerpo (tejidos), incluyendo glándulas salivales, causa poco o ningún efecto patológico. Este grupo puede ser el principal responsable de la transmisión de *T. rangeli* al hospedero vertebrado y en algunos casos a otros insectos debido a una mejor relación hospedero-parásito (Añez y East, 1984).

Reservorios

El rango de hospederos vertebrados es muy amplio, distribuyéndose en cinco órdenes de mamíferos: Edentata, Marsupialia, Carnivora, Rodentia y Primates (Hoare, 1972; D' Alessandro, 1976; Miles et al., 1983; D' Alessandro y Saravia, 1992, 1999; Grisard et al., 1998).

Diversas especies de mamíferos incluyendo ratas, ratones, hamsters, conejos, monos, perezosos, mapaches, cerdos y zarigüeyas (*Didelphis* spp.) han sido infectadas experimentalmente con *T. rangeli*; sin embargo, se han observado parasitemias de hasta más de 52 días y con un nivel de parásitos sanguíneos bajo, actuando algunos de ellos como posibles reservorios de este parásito en la naturaleza (Añez, 1982a; Añez et al., 1985; Guhl y Vallejo, 2003).

La transmisión a los vertebrados puede ocurrir mediante dos estaciones, la estación anterior o transmisión inoculativa, la cual es la ruta principal de infección y en la que el vector inyecta metatrimastigotos con la saliva durante la picadura y la estación posterior o método contaminativo, la cual si bien puede ocurrir, es controversial, ya que si se presenta podría deberse a una contaminación de las heces con metatrimastigotos ingeridos de las glándulas salivales (D' Alessandro y Saravia, 1992).

Ciclo de vida en el hospedero vertebrado

El ciclo de vida del parásito en el vertebrado no está muy claro y los datos en la literatura son muy escasos y contradictorios. Su infección se inicia con el depósito de formas metacíclicas infectantes en los capilares o en la dermis de los animales. Luego migran al torrente circulatorio donde en los primeros tres días se da un crecimiento progresivo de su longitud que va de formas metacíclicas a típicos trimastigotos sanguíneos de 26.4 a 33.8 μm , en un rango de 23 a 37 μm de longitud; luego permanecen sin cambios en la sangre hasta que desaparecen completamente de la circulación (Sousa et al., 1974; D' Alessandro, 1976; Añez, 1981; 1982a; Añez et al., 1985).

Durante el periodo de crecimiento de los flagelados en la sangre de los vertebrados, en algunos casos, podría darse una transformación en su constitución antigénica de superficie, lo que les permite, aparentemente, evadir la respuesta inmune humoral durante un corto periodo de tiempo y una vez que aparecen los trimastigotos sanguíneos típicos, en contra

de los cuales se produce una respuesta específica, éstos son inmediatamente destruidos (Añez et al., 1985).

Sin embargo, Groot (1951) al inocular voluntarios humanos comprobó que la infección de *T. rangeli* se demostró luego de 15 meses de la inoculación, por lo que en algunos casos los tripomastigotos sanguíneos podrían evadir la respuesta inmune del hospedero y mantenerse por largos periodos de tiempo en la sangre.

Se considera que *T. rangeli* normalmente no se divide en el hospedero vertebrado. En algunos casos, como en infecciones en humanos y en ratas, se han encontrado formas en división mostrando flagelados con dos núcleos, otros con membrana ondulante o con flagelo y cinetoplasto duplicados. Estas formas han sido interpretadas como verdaderas formas en división y como la transformación es observada en el sitio de deposición, se asume que esto se debe a formas metacíclicas que se estaban dividiendo. Actualmente la mayoría de autores considera que estos flagelados estaban en proceso de división al ser inyectados ya que no hay evidencia de división en ningún otro sitio u órgano seccionado. Por ello, este parásito puede sobrevivir sin multiplicarse en los hospederos vertebrados (Groot et al., 1951; Grewal, 1969; D' Alessandro, 1976; Añez, 1981; 1982b; D' Alessandro y Saravia, 1992, 1999; Eger-Mangrich et al., 2001).

Además de la ausencia de tripomastigotos multiplicándose en la sangre, surge la incertidumbre de que este parásito tampoco es capaz de producir amastigotos en los tejidos de los vertebrados como lo hace *T. cruzi*. Osorio et al., (1995), lograron infectar células humanas con una cepa de *T. rangeli* colombiana y obtuvieron formas redondas, no flageladas, indistinguibles de los amastigotos. También obtuvieron formas redondas con un corto flagelo dentro de las células aparentemente transformándose en amastigotos, sugiriendo que *T. rangeli* tiene la capacidad de invadir los tejidos de vertebrados aunque en baja proporción. Esto le permitiría sobrevivir intracelularmente por extensos periodos; sin embargo, no se ha logrado demostrar verdadera multiplicación intracelular y en los casos en que se producen amastigotos intracelulares podría pensarse en cultivos mezclados con *T. cruzi*. Eger-Mangrich et al., (2001), al tratar de infectar líneas celulares de ratón, específicamente macrófagos peritoneales, además de células Vero, con varios tipos de *T. rangeli* de diferentes regiones geográficas, demostraron rangos de infección muy bajos y no encontraron formas intracelulares luego de 24 horas de interacción célula-parásito. Por ello,

el desarrollo de este parásito en sus hospederos vertebrados es controversial y parcialmente definido y entendido.

Además, el hecho de que cepas de *T. rangeli* puedan perder infectividad al mantenerse por largos periodos de tiempo en condiciones *in vitro* puede provocar que las parasitemias en vertebrados sean muy bajas, o que no se presenten, ya que, se considera que el mantenimiento prolongado de las cepas en cultivo provoca que las formas del parásito pierdan capacidad de infección (Zeledón 1954; D'Alessandro 1972, 1976; Urdaneta-Morales y Tejero 1985; Tejero et al., 1988 y Tanoura et al., 1999).

Vallejo et al., (1986) señalan que el mantenimiento cíclico de *T. rangeli* mantiene la infectividad de las glándulas salivales de los insectos posiblemente por tiempo indefinido y los tripomastigotos metacíclicos aparecen invariablemente a partir del décimo primer día de post-inoculación de los insectos, en contraste con un mantenimiento no cíclico, en el cual, la aparición de los tripomastigotos metacíclicos se inicia varios días más tarde y finalmente las formas de cultivo pierden infectividad.

Deane (1958 a, b) en el Estado de Pará, Brasil, logró observar en algunos ejemplares de *Didelphis marsupialis marsupialis* infecciones por *T. cruzi*; en otros solo infecciones por *T. rangeli* y en algunos casos infecciones mixtas. En todos los casos, se practicó el xenodiagnóstico y las formas encontradas en el contenido intestinal de *Rhodnius prolixus* fueron tripanosomas tipo *T. cruzi*, así como formas indistinguibles de las de *T. rangeli*, por lo que afirma que se deben conocer con exactitud los estadios y aspectos de ambos flagelados tanto en los hospederos vertebrados como en los invertebrados ya que pueden presentarse infecciones mixtas en un mismo hospedero que podrían confundirse al realizar el diagnóstico ya que ambas formas son morfológicamente similares.

El periodo prepatente de la infección en animales inoculados con parásitos de cultivo es variable, pero usualmente puede ser tan solo de un día o durar hasta casi dos meses. La duración de la infección varía de acuerdo con la edad de los animales, el nivel de parasitemia y con la cantidad de parásitos inoculados. La parasitemia es generalmente baja, aumenta en el 4º día post-infección y típicamente persiste por tres semanas, mientras que a los tres meses no hay evidencia de parásitos; sin embargo, en algunos casos ha llegado a persistir por periodos más largos. En ratas y ratones la infección ha durado desde siete a 12 meses y en animales más grandes y en el hombre puede tardar hasta 16 meses e incluso

tres años (Groot et al., 1951; Grewal, 1969; D'Alessandro, 1976; Añez, 1981; Añez et al., 1985; D'Alessandro y Saravia, 1992; Osorio et al., 1995).

Infección humana

La frecuencia relativa de *T. rangeli* en humanos no está bien documentada y los informes disponibles varían considerablemente. Se han registrado más de 2600 casos en diferentes países de América, donde Guatemala y Venezuela son los países con mayor número de reportes (D'Alessandro 1976).

En Panamá la frecuencia de infección también es muy alta. En este país, Sousa y Johnson (1971) encontraron que la frecuencia de personas infectadas con *T. rangeli* era seis veces mayor que la encontrada para *T. cruzi*, ya que de 167 personas infectadas, 28 presentaron *T. cruzi*, mientras que 157 presentaron *T. rangeli* y solo 18 tuvieron infecciones mixtas, lo que demuestra la mayor eficacia de la picadura como método de transmisión.

En países como El Salvador se reportan índices de infección de entre 6 y 22%, en donde se han encontrado más de 51 casos humanos; así mismo, en Nicaragua y Honduras este índice varía de acuerdo con la frecuencia de *R. prolixus* en algunas zonas. (D'Alessandro y Saravia, 1992).

En Brasil, Coura et al. (1996), reportaron, por serología, tres casos humanos de infección por *T. rangeli* durante un estudio de la enfermedad de Chagas llevado a cabo al norte del estado de Amazonas; con ello, concluyen que en áreas del país, donde el parásito aún no se había confirmado, se presentaron infecciones humanas por *T. rangeli*.

Por otro lado, en países como Colombia, Perú y Ecuador, la infección se presenta, aunque el porcentaje es muy bajo atribuido a un subregistro de casos, por lo que la información no se encuentra disponible (D'Alessandro, 1976; D'Alessandro y Saravia, 1992; 1999; Grisard et al., 1999; Guhl y Vallejo, 2003).

Se ha demostrado que en la mayoría de los países de América Latina se dan infecciones mixtas con *T. cruzi*, pero donde *R. prolixus* u otras especies de *Rhodnius* como *R. pallescens* o *R. ecuadoriensis* prevalecen, *T. rangeli* se presenta más frecuentemente, mientras que está ausente cuando *T. dimidiata* prevalece. (Zeledón, 1954; D'Alessandro, 1976; D'Alessandro y Saravia, 1999). Por ejemplo, en Panamá se ha observado que en las zonas donde se presenta únicamente *T. dimidiata* solo se dan infecciones por *T. cruzi*

mientras que en la región Central donde *R. pallescens* es más frecuente, las infecciones humanas con *T. rangeli* se encuentran fácilmente (Sousa y Jonhson, 1971; D' Alessandro y Saravia, 1999).

La infección en humanos se confirma por la presencia del parásito en muestras de sangre, hemocultivo o xenodiagnóstico (Zeledón, 1954; D' Alessandro, 1976; D' Alessandro y Saravia, 1999).

Groot et al., (1951), inocularon cuatro voluntarios con *T. rangeli* y no encontraron ninguna sintomatología en ellos; así mismo, en uno de ellos, no se logró encontrar parásitos en sangre sino hasta 105 días después de la infección, mientras que en otro de ellos, no se encontraron parásitos en sangre hasta 13 meses después de la inoculación. Esto permitió establecer que el periodo prepatente de la infección humana es de 22 a 108 días y la duración de la parasitemia es prolongada llegando a durar hasta 18 meses en los que no se presenta ninguna alteración patológica.

ADN del cinetoplasto (kDNA)

El cinetoplasto de *T. rangeli* contiene ADN mitocondrial, el cual es llamado ADN del cinetoplasto o kDNA. Se caracteriza por tener un pequeño tamaño y una limitada complejidad en relación con el ADN nuclear; además, por ser fácil de aislar, por su heterogeneidad de secuencias, y por tener una rápida evolución, constituye un depósito de información sobre la naturaleza de las poblaciones de estos hemoflagelados (D' Alessandro y Saravia, 1992).

Este ADN contiene de 25-50 maxicírculos que varían en tamaño desde 20 hasta 37 kb y codifican instrucciones para el ARN ribosomal en la formación de proteínas involucradas en la transducción de energía mitocondrial; además, contiene varios cientos de copias de minicírculos con un tamaño de 0,5 a 2,5 kb, los cuales están relacionados con la edición del ARN y se caracterizan por ser altamente heterogéneos en su secuencia de nucleótidos (D' Alessandro y Saravia, 1992; Vallejo et al., 1994).

Todos los minicírculos presentan una, dos o cuatro regiones conservadas y cada cepa de tripanosoma presenta un número determinado de regiones conservadas. Se designan como kP1 los que presentan minicírculos con una región conservada, kP2 los que tienen dos

regiones conservadas y kP3 con cuatro regiones (Macedo et al., 1993; Vallejo et al., 1994, 2003; Recinos et al., 1994; Guhl y Vallejo, 2003).

Así mismo, la presencia o ausencia de estas regiones permite establecer dos tipos de *T. rangeli* designados como kP1(+) aquellas que presentan minicírculos del tipo kP1, kP2 y kP3 y como kP1(-) aquellos parásitos con minicírculos del tipo kP2 y kP3. Estos tipos presentan ciertas diferencias en cuanto a su habilidad para infectar determinadas especies de triatóminos ya que algunas especies del género *Rhodnius* como *R. prolixus*, son solamente susceptibles a *T. rangeli* kP1 (+) mientras que otras como *R. pallescens* y *R. colombiensis* son susceptibles solamente a *T. rangeli* kP1 (-) (Vallejo et al., 2002, 2003; Guhl y Vallejo, 2003; Urrea et al., 2004).

Esta característica permitiría suponer que cada especie de *Rhodnius* puede seleccionar la subpoblación a la cual es susceptible en la naturaleza para transmitirla por inoculación al hospedero vertebrado, o que la adaptación de este parásito a lo largo del tiempo a un vector particular simpátrico podría originar estas diferencias entre estos tipos de *T. rangeli* que están en un proceso de especiación (Guhl y Vallejo, 2003; Vallejo et al., 2003; Urrea et al., 2004; Maia da Silva et al., 2007). Maia da Silva et al., (2004, 2007) sugieren, que esta característica se debe a que las poblaciones de *T. rangeli* han coevolucionado con sus especies vectores locales provocando que las especies alopátricas presenten diferentes grados de infección o incluso sean inapropiadas como vectores.

DEFINICIÓN DEL PROBLEMA

El hecho de que *T. rangeli* y *T. cruzi* posean vectores triatóminos y reservorios vertebrados comunes, crea una situación epidemiológica importante. Al ser el primero un agente no patógeno a diferencia del segundo, se hace indispensable diferenciarlos bien en sus distintas fases vitales de desarrollo, para no llevar a un error en el diagnóstico.

Esto también tiene implicaciones ecogeográficas, ya que hay áreas del continente en donde existe *T. cruzi* y no existe *T. rangeli* y aunque lo contrario también podría darse, lo más frecuente es que coincidan los dos en zonas donde existen especies de *Rhodnius* y ambos puedan inclusive encontrarse en un mismo insecto.

Como la transmisión de *T. rangeli* es más eficiente y más segura (transmisión anterior) que la de *T. cruzi* (transmisión posterior) podría darse el caso de que se transmita solo el primero y se detecte en un presunto paciente, por xenodiagnóstico, sin ser este chagásico. En otros casos se podría encontrar una infección mixta, o podría suceder que un *Rhodnius* infectado solo con *T. cruzi* lo transmita a una persona. En todas estas situaciones debe conocerse lo suficiente sobre la biología y características de ambos parásitos para no llegar a un error parasitológico de diagnóstico.

Uno de los criterios más importantes para identificar *T. rangeli*, está basado en su ciclo de vida biológico en el hospedero invertebrado, el cual conlleva la invasión de la hemolinfa y glándulas salivales del vector, resultando en una transmisión inoculativa.

Sin embargo, este criterio está influenciado por las especies de triatóminos y las cepas de tripanosoma, ya que se ha observado una alta heterogeneidad entre cepas de *T. rangeli* aisladas de América Central y del Sur.

Esta heterogeneidad permite designar al menos dos cepas de *T. rangeli* genéticamente diferentes, KP1(+) y KP1(-), con base en el ADN del cinetoplasto, las cuales presentan a su vez diferencias en cuanto a su capacidad para adaptarse a una especie de vector determinada.

Estudios realizados han demostrado una relación especial parásito-vector y sugieren una coevolución de *T. rangeli* con su especie simpátrica de vector en la cual, cepas de *T. rangeli* KP1(+) completan su ciclo en el grupo “prolixus” (*R. prolixus*, *R. robustus*, *R.*

neglectus, *R. nasutus* y *R. neivai*) mientras que cepas KP1(-) solo pueden completarlo en el grupo “pallenscens” (*R. pallenscens*, *R. colombiensis*, *R. ecuadoriensis*).

De esta manera se demuestra que la habilidad de *T. rangeli* para llegar a la hemolinfa de los insectos es dependiente de las características genotípicas del parásito y de las especies de triatóminos. Esto tiene implicaciones epidemiológicas importantes cuando se requiera hacer estudios para determinar la cepa del parásito que está circulando en la zona o cuando se requiera identificar el insecto vector cuando se aísla el parásito, por ejemplo de un animal silvestre que actúa como reservorio.

Además, también tiene otras implicaciones diagnósticas y epidemiológicas de relevancia, ya que puede encontrarse un tripanosoma morfológicamente semejante al *T. rangeli* en la sangre de un reservorio y para confirmar la especie mediante el xenodiagnóstico, se debería usar el vector natural de la cepa en la zona para dar un diagnóstico correcto y no caer en el error de usar un insecto no vector en el cual no se dé la evolución normal del parásito y se interprete como un falso negativo.

Por otro lado, las diferencias de comportamiento de las cepas de *T. rangeli* en animales vertebrados y medios de cultivo, así como sus características fenotípicas y su capacidad de virulencia en invertebrados y vertebrados son aspectos aún poco conocidos, por lo que se hace indispensable investigar más sobre estos aspectos parasitológicos y biológicos de las cepas de *T. rangeli* no solo para la identificación del parásito sino también para aclarar la posición taxonómica de este flagelado y respaldar los estudios de la relación hospedero-parásito y su relación con el patógeno *T. cruzi*.

OBJETIVOS

General

Comparar dos cepas de *Trypanosoma rangeli*, una aislada de un mapache de Costa Rica (*Procyon lotor*) caracterizada genéticamente como KP1- y otra aislada de *Rhodnius prolixus* de Colombia, caracterizada como KP1+ en medios de cultivo, insectos triatóminos, y en ratones.

Específicos

1. Comparar la curva de crecimiento de ambas cepas de *Trypanosoma rangeli* en medios de cultivo monofásicos.
2. Estudiar la evolución de dos cepas de *T. rangeli* KP1- y KP1+, en la hemolinfa de insectos triatóminos de varias especies y su eventual desarrollo en glándulas salivales.
3. Infectar ratones Balb/c y Swiss-CD con ambas cepas de *T. rangeli* KP1- y KP1+ crecidas en cultivo y estudiar el curso de la infección en forma comparativa.
4. Determinar tasas de infección en las dos razas de ratones por examen microscópico de la sangre.
5. Realizar infecciones *in vitro* en células VERO con las dos cepas de *T. rangeli* usando formas infectantes.
6. Hacer estudios morfométricos comparativos del parásito tanto en insectos como en ratones.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Se utilizaron las cepas siguientes:

Trypanosoma rangeli de Costa Rica (JMZ16)

Aislada el 27 de mayo del 2003 de un mapache (*Procyon lotor*) macho adulto, del Refugio La Tirimbina de Sarapiquí. Mantenido en el laboratorio de Zoonosis de la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional en dos medios difásicos, Senekjie/Infusión de hígado y tripticasa (SNK/LIT) con 10% de suero fetal bovino y Senekjie/Locke en cuarto con aire acondicionado a una temperatura de $28 \pm 1^\circ\text{C}$. Esta cepa se determinó en nuestro laboratorio como KP1- mediante los primers KP1L diseñados por Vallejo et al., (1994).

Trypanosoma rangeli de Colombia (EV26)

Aislada el 19 de mayo de 1981 de *R. prolixus* en el Departamento Meta en Colombia y mantenida por congelamiento en el Centro Internacional de Enfermedades Infecciosas (CIDEIN) de Colombia. Enviada por la Dra. Nancy Saravia el 12 de mayo del 2005 en medios de Tobie y de Schneider.

Se mantiene en el laboratorio de Zoonosis de la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional, en medio difásico, Senekjie /Infusión de hígado y tripticasa (SNK/LIT) con 10 % de suero fetal bovino a una temperatura de estufa de $28 \pm 1^\circ\text{C}$. Esta cepa se determinó en nuestro laboratorio como KP1+ mediante los primers KP1L diseñados por Vallejo et al., (1994)

Insectos

Las especies de insectos utilizadas se muestran en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Especies de triatóminos utilizadas para la infección con *T. rangeli*

Triatómino	Origen	Fecha de recolecta
<i>Rhodnius prolixus</i>	Copán y Las Mesas de Colón, Honduras. Donados por Carlos Ponce	1 diciembre, 1983
<i>Rhodnius pallescens</i>	Los Chiles, Costa Rica	20 y 21 abril, 2004
<i>Triatoma dimidiata</i>	Parque Nacional Santa Rosa, Guanacaste y Santo Domingo, Heredia, Costa Rica	11 febrero y 10 junio, 2004
<i>Triatoma infestans</i>	Donados por el Laboratorio René Rachou, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil	1998
<i>Triatoma lecticularia</i>	Estados Unidos. Donados por Cleber Galvão, Instituto Oswaldo Cruz, Brasil	2004
<i>Triatoma bruneri</i>	Cuba. Donados por Elias Aldana de la Universidad de Mérida, Venezuela	2000
<i>Panstrongylus geniculatus</i>	Donados por el Instituto de Medicina Tropical de la Universidad Central, Venezuela	2000

Todas las especies son mantenidas en el insectario de la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional a temperatura ambiente y alimentadas periódicamente en palomas, hamsters y ratas.

Cepas de ratones

Se usaron ratones Balb/c y ratones Swiss-CD machos, de entre tres y cuatro semanas de edad, con un peso aproximado de entre 6 y 20 gramos cada uno, mantenidos en el Bioterio de la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional.

Métodos

I Parte

Curvas de crecimiento en cultivo monofásico

Se practicaron cuatro experimentos por duplicado, en dos de los cuales se usó medio líquido de Warren (5ml), adicionado de suero fetal bovino al 10% y al 20% respectivamente. Como controles se usó medio de Warren puro (Warren, 1957) usando

sangre de bovino y se usó medio monofásico de Infusión de Hígado y Trypticasa (LIT) con 20% de suero fetal bovino (5ml).

Utilizando las dos cepas JMZ16 y EV26 se hicieron los repiques en tubos de 13 x 100 con el medio monofásico respectivo y se mantuvieron en estufa a $28 \pm 0.2^\circ\text{C}$.

Para cada tubo de cultivo de cada cepa, se utilizó un inóculo previamente contado en una cámara de Neubauer, 2.85 millones de parásitos de la cepa JMZ16 y 2.9 millones de parásitos de la cepa EV26, tomados de cultivos de 6 días de repicados y mantenidos en medio difásico de Senekjie/Infusión de hígado y tripticasa (SNK/LIT) con 10% de suero fetal bovino.

Se realizaron diluciones de alícuotas de los cultivos y se contaron los flagelados con una cámara de Neubauer (hemocitómetro) a intervalos de 2-3 días hasta su decrecimiento.

Se determinó el número de parásitos en duplicado y se graficó la curva de crecimiento.

Cada 5 días se tomaron 5 μl del cultivo de medio LIT con 20% de SFB y se realizaron frotis que se tiñeron con Giemsa para observar la proporción de epimastigotos y tripomastigotos en relación con la curva de crecimiento.

Infeción de cultivos celulares

Con las cepas JMZ16 y EV26, mantenidas en pasajes quincenales *in vitro* y las cepas recién aisladas de ratón (3 y 4 pasajes) y mantenidas en medio difásico de SNK-LIT con 10% de suero fetal bovino, se inocularon cultivos de células Vero mantenidas en botellas T25 con medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Eger-Mangrich et al., 2001). Las células se pusieron a crecer por dos días en botellas T25 con medio DMEM para formar la monocapa y una vez formada se realizó la inoculación; para ello, se lavaron tres veces con 4 ml de PBS 1x y posteriormente se agregaron 4.5 ml de medio DMEM y 0.5 ml de cultivos de *T. rangeli* para ambas cepas de 15 a 18 días de repicadas. Se incubaron a 37°C y 5% de CO_2 y a las 72 horas se lavaron con 4 ml de PBS para eliminar parásitos libres en el medio y luego se les agregó 5 ml de medio DMEM y se observaron en microscopio invertido cada 24 horas por 10 días, para determinar la formación de formas similares a amastigotos intracelulares.

II Parte

Estudio de las dos cepas en insectos triatóminos.

Utilizando las cepas antes mencionadas se infectaron grupos de 15 insectos en el 5° estadio ninfal de su ciclo de vida, con un inóculo intracelómico de 10 µl de medio de cultivo utilizando una microjeringa de 50 µl, inyectándolos en el tórax, cerca de la coxa del tercer par de patas. Todos los insectos utilizados fueron alimentados 72 horas antes de cada experimento.

Se utilizaron cultivos de 15 a 18 días de repicados para cada cepa de *T. rangeli*, para utilizar un mayor número de tripomastigotos.

Se usaron inóculos entre 1 y 5 x 10³ parásitos para cada insecto, previamente determinados por conteo de los parásitos en un hemocitómetro. Cada grupo de insectos recibió la misma cantidad de parásitos de las dos cepas, según el experimento realizado.

Los insectos se colocaron en placas de Petri de vidrio de 150 x 20 mm con papel de filtro en una estufa a 26°C.

Se revisaron en diferentes días posteriores a la inoculación extrayendo, con un alfiler entomológico estéril, una gota de hemolinfa del tórax y observándola en el microscopio de luz a 400x.

Se realizaron frotis de la hemolinfa en diferentes días posteriores a la inoculación y se tiñeron con Giemsa para hacer observaciones morfológicas de los parásitos durante el curso de la infección.

En el Experimento 1 se usaron 15 ninfas de 5° estadio de las especies *R. pallescens*, *R. prolixus*, *T. bruneri* y *P. geniculatus*; cada grupo fue inoculado con 1350 parásitos por insecto de ambas cepas. Estos insectos se revisaron a los 5, 12 y 42 días posteriores a la infección.

En el Experimento 2 se usaron todas las especies mencionadas en el Cuadro 1, excepto *P. geniculatus*; cada grupo de insectos fue inoculado con 3300 parásitos de la cepa JMZ16 y con 3650 parásitos de la cepa EV26

En el Experimento 3 se usaron las especies mencionadas en el Cuadro 1 y cada grupo se inoculó con 5500 parásitos por insecto de ambas cepas.

En estos experimentos, se usaron como controles positivos para cada cepa del parásito, las dos especies de *Rhodnius*.

En los experimentos 2 y 3 se revisaron todos los insectos desde los 3 días posteriores a la infección y hasta los 24 ó 28 días, alimentándolos a los 15 días. En cada periodo de observación se anotó el nivel de parasitemia de cada individuo representando con una cruz (+) un nivel bajo de parásitos (entre 1 y 3 parásitos por campo de 400x), con dos cruces (++) un nivel moderado de parásitos (entre 5 y 15 parásitos por campo de 400x) y con tres cruces (+++) un nivel alto de parásitos (cantidad incontable de parásitos), en la muestra de hemolinfa analizada. Durante el curso de la infección y al finalizar este periodo, se procedió a disecar los insectos que quedaban vivos y a examinar sus glándulas salivales para observar, en el microscopio de luz a 400x, la presencia de parásitos tanto dentro como fuera de la glándula.

En un cuarto experimento, se inocularon 15 ninfas de cada una de las siguientes especies: *R. prolixus*, *R. pallescens*, *T. lecticularia* y *T. dimidiata*, con 5.5×10^5 parásitos de la cepa JMZ16 y 5.6×10^5 de la cepa EV26; se revisaron dos días después de la inoculación y durante los 20 días posteriores, para lo cual, se tomaron cada dos días, tres ninfas al azar para extraer hemolinfa y realizar diluciones con solución salina para contar en una cámara de Neubauer el número de parásitos por ml de hemolinfa y sacar el promedio de estos tres insectos.

Se graficó el curso de la parasitemia durante el periodo de estudio.

III Parte

Estudio de la infección en ratones con ambas cepas

Utilizando las cepas de *T. rangeli* KP1- y KP1+ se usaron dos metodologías para la preparación de los cultivos con el fin de comparar la infectividad de cultivos de reciente aislamiento con cultivos mantenidos por largo tiempo en el laboratorio.

En la primera metodología, se usaron cultivos mantenidos en laboratorio por 2 años y medio, se preparó una suspensión de parásitos en tubos de 25 x 200 con medio SNK-LIT al 10% de SFB y se mantuvieron en las mismas condiciones antes mencionadas; se utilizaron los cultivos a los 15 días de repicados.

En la segunda metodología, se prepararon cultivos de cada cepa extrayendo sangre de ratones infectados por picadura (xenodiagnóstico), de forma estéril, de la cola y se inoculó en tubos de 13 x 100 con medio SNK-LIT para su posterior crecimiento; se mantuvieron por 3 pasajes quincenales y una vez bien crecidos, se realizó la suspensión de parásitos en tubos de 25 x 200 con medio SNK-LIT y se usaron a los 12 días de repicados. Estos cultivos se consideran de reciente aislamiento.

En cada metodología, los cultivos se centrifugaron a 1288g por 20 minutos para concentrar los parásitos del medio de cultivo, en una centrifuga refrigerada a 8°C; se juntaron los sedimentos, se realizó una dilución en solución de Locke y se contó en una cámara de Neubauer (hemocitómetro) para determinar el número de parásitos a inocular en cada ratón. Se realizaron 3 experimentos con cada metodología aplicada, donde se infectaron con cada cepa, por vía intraperitoneal, cinco ratones Swiss-CD y cinco ratones Balb/c. En cada experimento se usó un inóculo cuantificado entre 6 y 142×10^6 parásitos. Se revisaron los días subsiguientes a la infección durante 20 días, tomando sangre de la cola y observándola al microscopio de luz a 400x, para determinar el número de parásitos en al menos 30 campos distintos.

En cada experimento se determinó el número de animales infectados y se realizaron tasas de infección en cada grupo de ratones.

Se realizaron frotis sanguíneos cada 2 días y se hizo una tinción de Giemsa para llevar a cabo estudios morfométricos de las cepas.

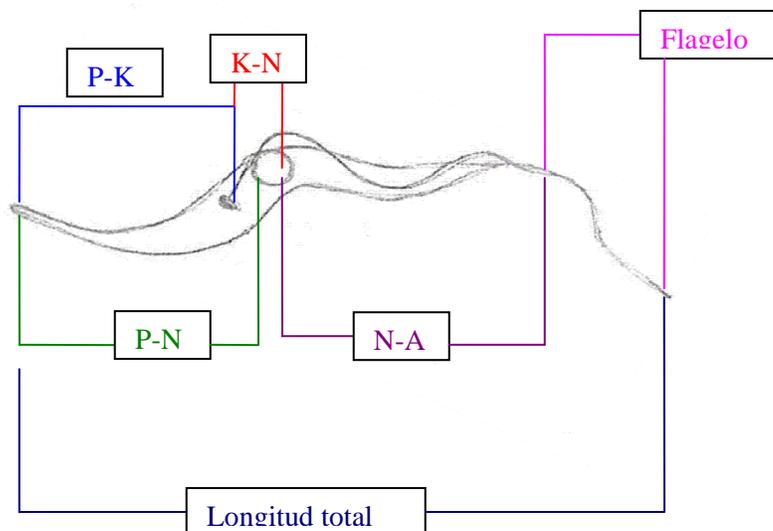
Estudio morfométrico de las cepas de *T. rangeli*

Para realizar este estudio morfométrico, se usaron los frotis teñidos con Giemsa de sangre de ratones infectados y se dibujaron, con ayuda de una cámara clara, 30 parásitos de cada cepa. Con ayuda de un curvómetro marca Derby se hicieron las siguientes medidas, siguiendo la metodología empleada por Zeledón y Vieto (1958):

Del extremo posterior al cinetoplasto (P-K), del cinetoplasto al núcleo (K-N), del extremo posterior al núcleo (P-N), del núcleo al extremo anterior (N-A), índice PN/NA; largo del flagelo y longitud total (Figura1).

Las medidas se transformaron a micrómetros usando una escala micrométrica y se calcularon las desviaciones estándar en cada una de ellas.

Figura 1. Esquema representativo de las medidas a realizar en los dibujos de cada cepa de *T. rangeli*



Análisis Estadístico

En los experimentos de infección en ratones, se realizó la evaluación de la diferencia de susceptibilidad de las dos razas de ratones a la infección por cada cepa de *T. rangeli* haciendo uso de la prueba de Diferencia de proporciones del programa InfoStat.

En los experimentos de morfometría se realizaron comparaciones de las medidas de longitud total e índice PN/NA haciendo uso de la prueba estadística T-Student.

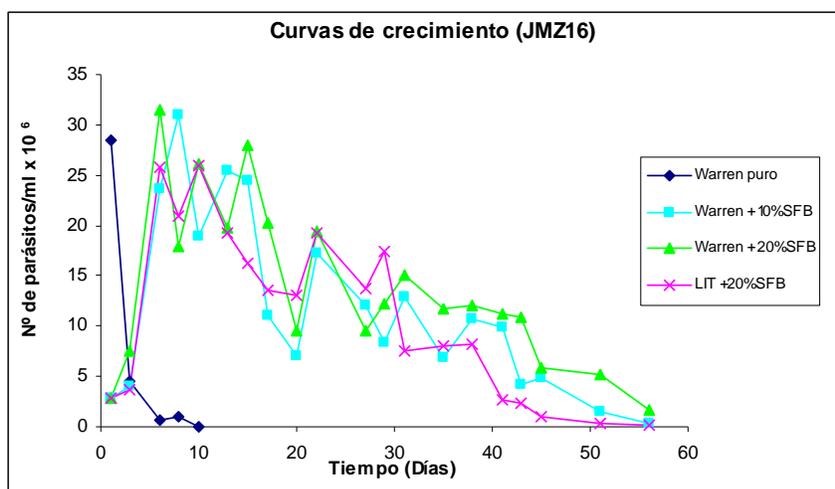
RESULTADOS

En la figura 2 se puede observar que la cepa JMZ16 (KP1-) no logra crecer en medio de Warren puro, es decir, sin suero fetal bovino, ya que presentó un decrecimiento durante los primeros 10 días; mientras que en el medio de Warren suplementado con 10% de suero fetal bovino, la cepa tuvo un buen crecimiento, ya que del inóculo inicial de 2.85 millones de parásitos logra alcanzar un máximo de 31 millones de parásitos por ml tan solo a los 8 días.

De igual forma el parásito pudo crecer bien en medio de Warren suplementado con 20% de suero fetal bovino, en el cual llegó a 31.5 millones a los 6 días de cultivo. En ambas concentraciones de suero fetal el comportamiento fue muy similar, alcanzando los máximos picos de crecimiento en los primeros 10 días y varios picos de crecimiento secundario durante los primeros 30 días.

Por otro lado, en medio LIT con 20% de SFB el comportamiento de esta cepa también fue muy similar teniendo un pico máximo de crecimiento de 26 millones a los 10 días de cultivo. Esta cepa de *T. rangeli*, en este último medio, presentó una fase estacionaria después de un mes de mantenimiento en cultivo y una fase de decrecimiento y muerte de los parásitos entre los 43 y 50 días, mientras que en los otros medios, la fase de decrecimiento se dio a los 40 días (Cuadro 2).

Figura 2. Curvas de crecimiento de *T. rangeli* JMZ16 (KP1-) en medios de cultivo monofásicos



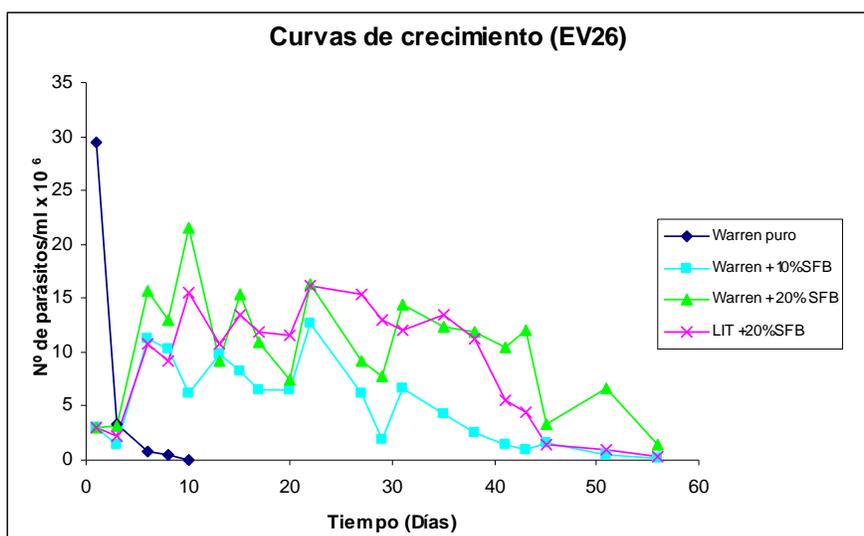
En la figura 3 se observa que el crecimiento de la cepa EV26 (KP1+) en medio de Warren sin suero fetal bovino fue muy pobre, manteniéndose solo durante los primeros 10 días de cultivo en los cuales siempre presentó un decrecimiento en relación con su inóculo inicial, el cual fue de 2.9 millones de parásitos.

Por otro lado, en medio de Warren suplementado con 10% de SFB esta cepa creció fácilmente; sin embargo, llegó a su pico máximo de crecimiento de 12.7 millones hasta los 22 días de cultivo, contrario a su crecimiento en medio de Warren con 20% de SFB, en el cual llegó a 21.6 millones de parásitos a los 10 días de cultivo y no empezó su fase de decrecimiento sino hasta los 45 ó 50 días de cultivo.

Al analizar el crecimiento de *T. rangeli* (KP1+) en medio LIT con 20% SFB se observa que se mantuvo con varios picos de crecimiento durante los primeros 20 días y llegó a su máximo crecimiento con 16.2 millones de parásitos a los 22 días, mientras que a los 38 días ya iniciaba su fase de decrecimiento (Fig.3).

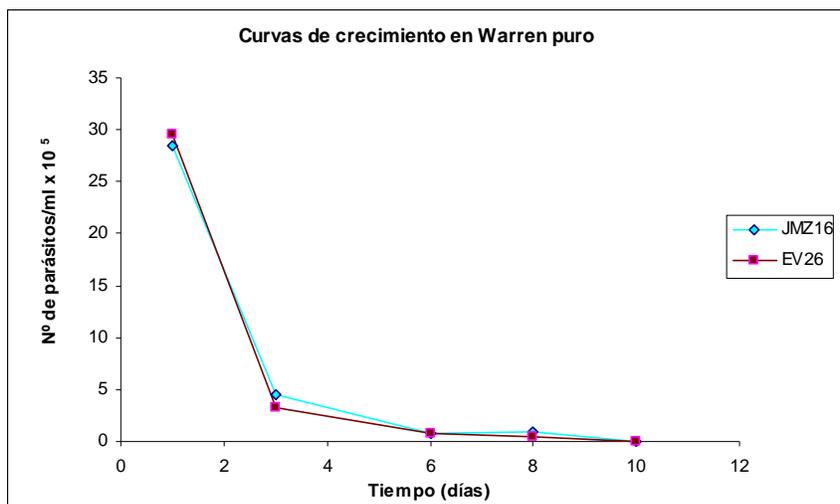
Se puede observar así, que en el medio de Warren con 20% de SFB el crecimiento del parásito fue mayor comparado tanto con Warren al 10% de SFB como con LIT al 20% de SFB (Cuadro 2).

Figura 3. Curvas de crecimiento de *T. rangeli* EV26 (KP1+) en medios de cultivo monofásicos



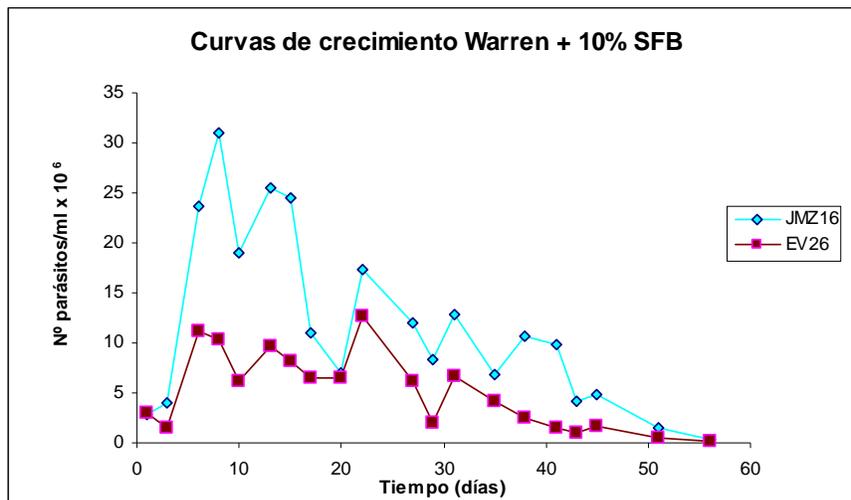
Al analizar ambas cepas de *T. rangeli* KP1- y KP1+ en medio de Warren puro, se observa que no presentaron crecimiento durante el tiempo de cultivo. El número de parásitos bajó drásticamente en tan solo 3 días de cultivo y a los 10 días de mantenimiento en cultivo ya no se encontraban parásitos vivos en el medio (Fig. 4).

Figura 4. Curvas de crecimiento de cepas de *T. rangeli* KP1- y KP1+ en medio de Warren puro



Al comparar las dos cepas en medio de Warren suplementado con 10% de SFB, en la figura 5, se puede analizar que ambas fueron capaces de crecer en este medio y mantenerse por un periodo de tiempo prolongado (más de 30 días), lo que indica que el medio suplementado con suero fetal bovino es suficiente para que *T. rangeli* pueda crecer y mantenerse en este medio. Por otro lado, la cepa *T. rangeli* JMZ16 (KP1-) tuvo mayor crecimiento que la cepa EV26 (KP1+) ya que llegó a 31 millones de parásitos a los 8 días de cultivo mientras que el pico máximo de crecimiento de la cepa KP1+ fue hasta los 22 días de cultivo alcanzando solo 12.7 millones de parásitos por ml. Ambas cepas del parásito lograron mantenerse con ciertos picos de crecimiento; sin embargo, la cepa KP1- creció mejor que la cepa KP1+, ya que mientras la fase de muerte de esta última se inició a los 35 días de cultivo, la de *T. rangeli* KP1- se inicia hasta los 43 días de crecimiento, logrando seguir creciendo por más días en este medio.

Figura 5. Curvas de crecimiento de cepas de *T. rangeli* KP1- y KP1+ en medio de Warren suplementado con 10% de SFB



Al analizar las curvas de crecimiento de ambas cepas de *T. rangeli* en este medio suplementado con 20% de SFB se puede observar que logran crecer y mantenerse por periodos prolongados en cultivo, tienen sus picos máximos de crecimiento durante los primeros 10 días de cultivo y una fase estacionaria a los 30 días de cultivo. El crecimiento de la cepa JMZ16 (KP1-) fue mayor, llegando a 31 millones por ml, comparado con la cepa EV26 (KP1+) que produjo 21 millones de parásitos por ml; sin embargo, el comportamiento de ambas cepas fue muy similar durante todo el periodo de crecimiento presentando varios picos durante los primeros 30 días de cultivo (Fig. 6).

En medio LIT con 20 % SFB las dos cepas de *T. rangeli* tuvieron un buen crecimiento, manteniéndose durante los primeros 30 días con varios picos de crecimiento y llegando a una fase estacionaria luego de 30 días de mantenimiento en cultivo. De nuevo, la cepa JMZ16 (KP1-) logró crecer mejor, ya que llegó a 26 millones de parásitos por ml a los 10 días de cultivo, mientras que la cepa EV26 (KP1+) logró un pico máximo de 16.2 millones por ml a los 22 días de cultivo. Ambas cepas mantuvieron un crecimiento estable durante el periodo en este medio (Fig. 7).

Figura 6. Curvas de crecimiento de *T. rangeli* KP1- y KP1+ en medio de Warren suplementado con 20% de SFB

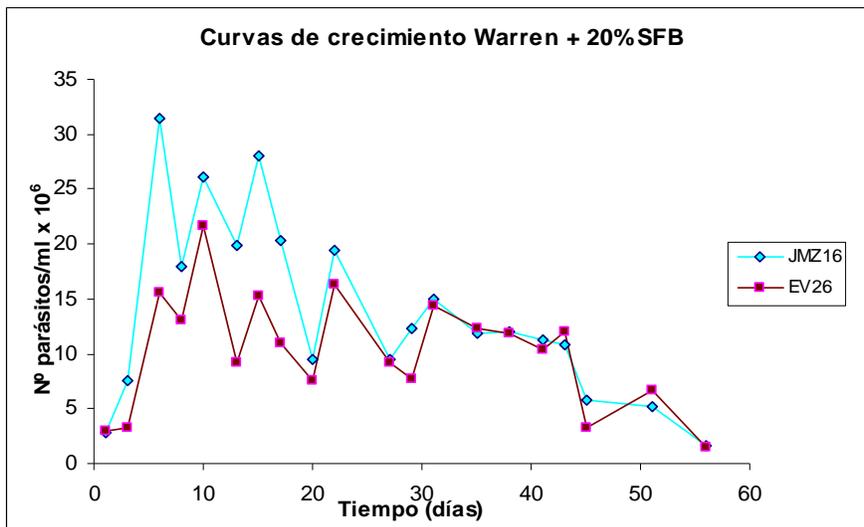
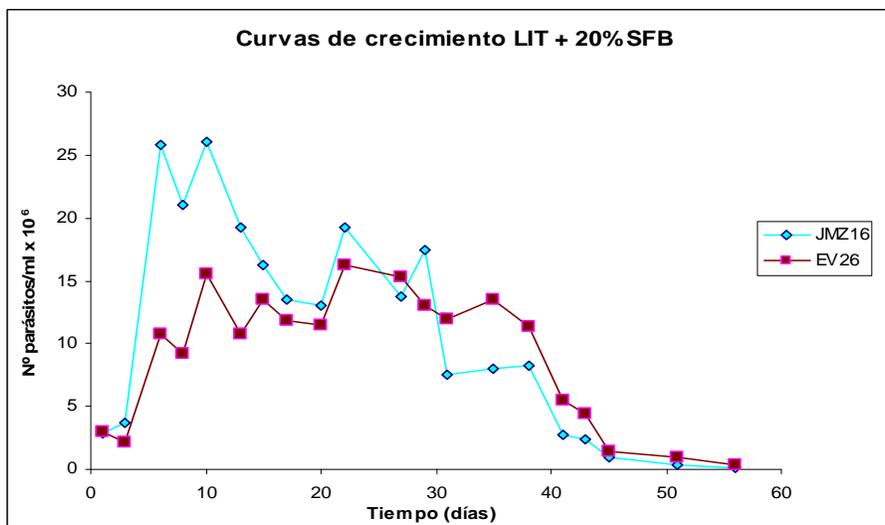


Figura 7. Curvas de crecimiento de las cepas *T. rangeli* KP1- y KP1+ en medio LIT suplementado con 20% de SFB



Al comparar ambos medios de cultivo se puede decir que el crecimiento de la cepa *T. rangeli* JMZ16 (KP1-) fue mayor en medio de Warren suplementado con 20% de SFB, ya que logra llegar a una concentración de 31.5 millones de parásitos por ml, mientras que en el medio LIT + 20% de SFB el pico fue de 26 millones de parásitos por ml. Durante el periodo de conteo, se observa que en ambos medios, la cepa presenta picos de crecimiento durante los primeros 15 días de cultivo y se mantiene por el mismo periodo de tiempo (aproximadamente 55-60 días), con un decrecimiento luego de 30 días de cultivo (Fig. 8).

Al observar el comportamiento de la cepa *T. rangeli* EV26 (KP1+) en estos medios de cultivo se determina una diferencia evidente en cuanto al crecimiento, ya que en medio de Warren suplemento con 20% SFB la cepa crece en mayor cantidad, llegando a 21.6 millones de parásitos por ml, mientras que en el medio LIT al 20% SFB alcanza 16.2 millones de parásitos por ml. En medio de Warren con 20% SFB la cepa se mantuvo con picos de crecimiento durante los primeros 40 días de cultivo, luego de este periodo empezó su decrecimiento; por otro lado, en medio LIT + 20% SFB la cepa se mantuvo creciendo durante los primeros 35 días y luego empezó a disminuir considerablemente (Fig. 9).

Figura 8. Curvas de crecimiento de la cepa *T. rangeli* JMZ16 (KP1-) en medios de Warren y LIT con 20% de SFB

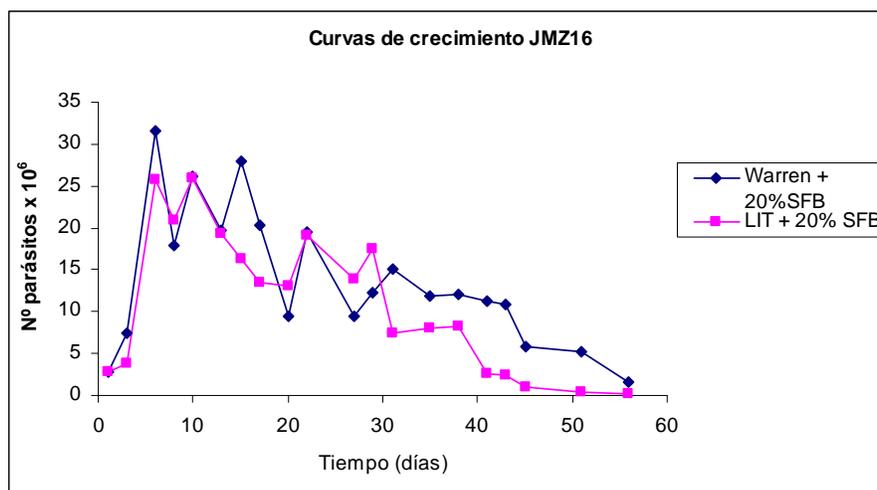
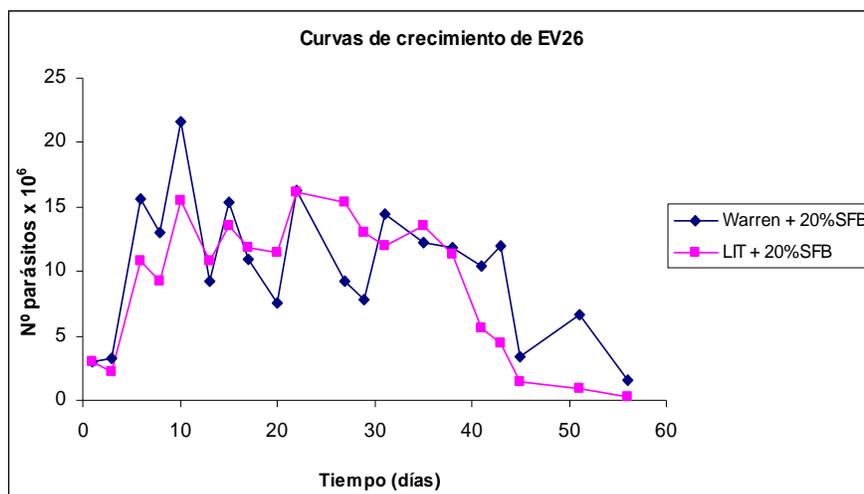


Figura 9. Curvas de crecimiento de la cepa *T. rangeli* EV26 (KP1+) en medios de Warren y LIT con 20% de SFB

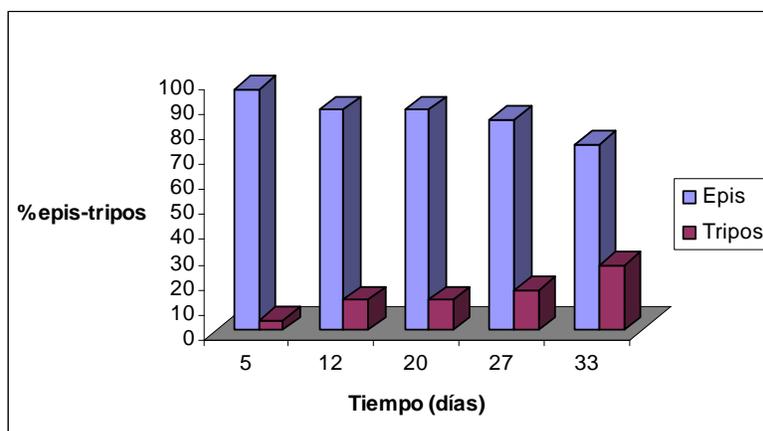


Cuadro 2. Datos de picos máximos de crecimiento de cepas *T. rangeli* de genotipos diferentes en diversos medios de cultivo monofásicos.

Medio	Días	Parásitos/ml (x 10 ⁶)	Fase decrecimiento (días)	Cepa
Warren puro	10	mueren	-	JMZ16 - EV26
Warren 10% SFB	8	31	40	JMZ16
	22	12,7	30	EV26
Warren 20% SFB	6	31,5	45-50	JMZ16
	10	21,6	40	EV26
LIT 20% SFB	10	26	43-50	JMZ16
	22	16,2	38	EV26

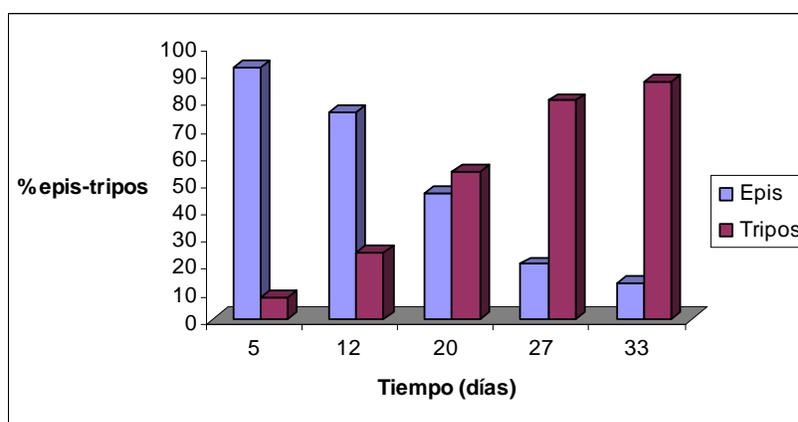
Se puede observar en el gráfico de la Figura 10 que las formas predominantes en cultivo para la cepa JMZ16 (KP1-) son los epimastigotos; el porcentaje de éstos si bien fue disminuyendo a través del tiempo, esa disminución es baja (20%). Las formas tripomastigotos aumentaron llegando de 5% a 26% al día 33.

Figura 10. Porcentaje de epimastigotos y tripomastigotos de la cepa *T. rangeli* JMZ16 (KP1-) en medio de cultivo LIT+20% SFB



En la figura 11 se observa que el porcentaje de epimastigotos en cultivo para la cepa EV26 (KP1+) fue predominante durante las dos primeras semanas de crecimiento; sin embargo, las formas tripomastigotos aumentaron gradativamente después del día 12 a expensas de los epimastigotos que disminuyeron y llegaron a ser las formas predominantes a los 33 días de cultivo, alcanzando un 87%.

Figura 11. Porcentaje de epis y tripos de la cepa *T. rangeli* EV26 (KP1+) en medio de cultivo LIT+ 20% SFB



Infección de cultivos celulares

En los experimentos *in vitro* usando células Vero no se logró encontrar células infectadas durante el periodo de observación, ni formas similares a los amastigotos, tanto en los casos que se usaron cultivos de parásitos viejos como en los experimentos con cultivos de reciente aislamiento. Durante los primeros días de interacción de los parásitos con las células no se observaron signos de división ni formación de vacuolas en las células; así mismo, solo se observaron parásitos alrededor de las células pero sin penetrar en ellas y luego de 48 horas de interacción solo se observaron formas poco móviles y la mayoría estaban muertas. A las 72 horas de interacción, las células se encontraron limpias, sin formas redondeadas y no se observaron flagelados transformándose en los típicos amastigotos.

Estudio del comportamiento de las dos cepas en insectos triatóminos.

Experimento 1: En este experimento, al inocular 1350 parásitos en cada insecto, con la cepa JMZ16 (KP1-), se pudo determinar que la parasitemia en hemolinfa se desarrolló y se mantuvo durante todo el periodo de observación solo en *R. pallescens*, mientras que en *T. bruneri* la parasitemia aumentó luego de 12 días post-infección pero no logró mantenerse por largo tiempo y en *P. geniculatus* no se produjo parasitemia en hemolinfa. Así mismo, se observó una alta mortalidad en las especies infectadas durante los primeros días de infección, mientras que los *P. geniculatus* tuvieron una baja mortalidad durante todo el periodo de observación (Cuadro 3).

Cuadro 3. Cantidad estimada de parásitos en hemolinfa de insectos infectados con la cepa JMZ16 (KP1-)

Fecha post-infección	Especie	Nº de ninfa* Cantidad estimada de parásitos														
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
5 días	<i>R. pallescens</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	M	M	M	M	M	M	M
	<i>T. bruneri</i>	++	+	+	-	-	+++	+++	+++	-	-	M	M	M	M	M
	<i>P. geniculatus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12 días	<i>R. pallescens</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	M							
	<i>T. bruneri</i>	+++	-	+++	++	+++	-	M	M	M	M					
	<i>P. geniculatus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
42 días	<i>R. pallescens</i>	+++	+++	M	M	M	M	M								
	<i>T. bruneri</i>	M	M	M	M	M	M									
	<i>P. geniculatus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	M	M	M	M	M	

M: ninfa muerta; *: el número de cada ninfa no corresponde necesariamente al mismo insecto en el examen siguiente, ya que se analizaron al azar.

Al finalizar el periodo de observación, a los 42 días post-infección, a los insectos que quedaron vivos se les extrajo las glándulas salivales; los 2 *R. pallescens* tenían parásitos en glándulas tanto dentro como fuera de ellas, mientras que los 9 *P. geniculatus* no presentaron parásitos en glándulas. Los *T. bruneri* no lograron sobrevivir más de 20 días, por lo que no fue posible revisar las glándulas salivales (Cuadro 9).

Al inocular *T. bruneri* y *P. geniculatus* con la cepa *T. rangeli* EV26 (KP1+) y compararla con los controles positivos (*R. prolixus*), se pudo notar que durante los primeros 12 días de infección la parasitemia en hemolinfa fue muy evidente tanto en *T. bruneri* como en *R. prolixus* mientras que en *P. geniculatus* el parásito no logró desarrollarse. Sin embargo, se notó que los *T. bruneri* fueron capaces de abortar la infección ya que a los 42 días post-infección no se encontraron parásitos en la hemolinfa de los 10 insectos que permanecieron vivos (Cuadro 4).

Cuadro 4. Cantidad estimada de parásitos en hemolinfa de insectos infectados con la cepa EV26 (KP1+)

Fecha post-infección	Especie	Nº de ninfa*														
		Cantidad estimada de parásitos														
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
5 días	<i>R. prolixus</i>	+++	+++	+	-	++	++	-	+++	-	-	+++	-	+++	+++	M
	<i>T. bruneri</i>	+++	+++	-	+++	+++	+	+	+++	+	-	+++	-	+++	+++	+++
	<i>P. geniculatus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12 días	<i>R. prolixus</i>	+++	++	+++	-	-	++	+	+++	-	+++	+++	+++	+++	M	
	<i>T. bruneri</i>	-	-	+++	+++	+++	++	+++	++	-	+++	+++	++	-	+++	++
	<i>P. geniculatus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
42 días	<i>R. prolixus</i>	+++	+++	+++	+++	+++	M	M	M	M	M	M	M	M		
	<i>T. bruneri</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	M	M	M	M	M
	<i>P. geniculatus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	M	M	M

M: muertos; *: el número de cada ninfa no corresponde al mismo insecto en el examen siguiente.

Luego del periodo de observación, se les extrajo las glándulas salivales a los insectos que quedaban vivos, de los 5 *R. prolixus*, 2 tenían glándulas positivas; mientras que los 10 *T. bruneri* y los 12 *P. geniculatus* se encontraron negativos en glándulas.

Experimento 2: En este experimento al inocular 3300 parásitos de la cepa JMZ16 (KP1-) y 3650 con la cepa EV26 (KP1+) en cada insecto, se pudo determinar que con la cepa KP1- solo tres especies (*R. pallescens*, *T. lecticularia* y *T. bruneri*) presentaron parásitos en la hemolinfa durante los primeros 8 días de infección, mientras que *R. prolixus*, *T. infestans* y *T. dimidiata* no presentaron parásitos. La parasitemia en *R. pallescens* y en *T. bruneri* se mantuvo elevada durante los primeros 15 días de infección pero luego disminuyó hasta el final de la infección, contrario a los *T. lecticularia* que presentaron parasitemias altas durante todo el periodo de observación (28 días) (Cuadro 5).

Las glándulas salivales de las 6 especies infectadas se revisaron entre los 20 y 28 días de infección y se logró encontrar parásitos en 6 de 7 *R. pallescens*, tanto dentro como fuera de la misma, con gran cantidad de formas metacíclicas; el otro insecto solo presentó unos pocos parásitos unidos a la glándula salival. En 6 insectos (*T. lecticularia*) revisados, 1 presentó unos pocos parásitos fuera de las glándulas, en la pared, en los otros 5 no se encontraron parásitos en las glándulas (Cuadro 9).

En las glándulas de 4 *T. bruneri*, 9 *T. dimidiata*, 4 *T. infestans* y 7 *R. prolixus* no se encontraron parásitos.

Cuadro 5. Cantidad estimada de parásitos en hemolinfa de diferentes especies de triatóminos inoculados con *T. rangeli* JMZ16 (KP1-)

Fecha post-infección	Especie	Nº de ninfa* Cantidad estimada de parásitos									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
4 días	<i>R. pallescens</i>	+	++	+++	++	+++	n.o	n.o	n.o	n.o	n.o
	<i>R. prolixus</i>	-	-	-	-	-	n.o	n.o	n.o	n.o	n.o
	<i>T. dimidiata</i>	-	-	-	-	-	n.o	n.o	n.o	n.o	n.o
	<i>T. infestans</i>	-	-	-	-	n.o	n.o	M	M		
	<i>T. lecticularia</i>	-	+	-	+	n.o	n.o	n.o	n.o		
	<i>T. bruneri</i>	+	+	+	+	+	n.o	n.o	n.o	n.o	n.o
8 días	<i>R. pallescens</i>	+++	++	++	+++	+++	n.o	n.o	n.o	n.o	n.o
	<i>R. prolixus</i>	-	-	-	-	-	n.o	n.o	n.o	n.o	n.o
	<i>T. dimidiata</i>	-	-	-	-	-	n.o	n.o	n.o	n.o	n.o
	<i>T. infestans</i>	-	-	-	-	-	M	M	M		
	<i>T. lecticularia</i>	++	+++	+++	++	n.o	n.o	n.o	M		
	<i>T. bruneri</i>	+++	++	++	+++	+++	n.o	n.o	n.o	n.o	M
12 días	<i>R. pallescens</i>	++	+++	+	+++	-	n.o	n.o	n.o	n.o	M
	<i>R. prolixus</i>	-	-	-	-	-	n.o	n.o	n.o	n.o	n.o
	<i>T. dimidiata</i>	-	-	-	++	-	n.o	n.o	n.o	n.o	n.o
	<i>T. infestans</i>	-	-	-	-	n.o	M	M	M		
	<i>T. lecticularia</i>	+++	+++	+++	++	n.o	n.o	n.o	M		
	<i>T. bruneri</i>	+++	+++	+++	+++	+++	n.o	n.o	n.o	M	M
16 días	<i>R. pallescens</i>	+	+++	+++	++	++	n.o	n.o	M	M	M
	<i>R. prolixus</i>	-	-	-	-	-	n.o	n.o	n.o	n.o	M
	<i>T. dimidiata</i>	-	-	-	-	+	n.o	n.o	n.o	n.o	M
	<i>T. infestans</i>	-	-	-	-	n.o	M	M	M		
	<i>T. lecticularia</i>	++	+++	+	++	n.o	n.o	n.o	M		
	<i>T. bruneri</i>	+++	++	+++	++	++	n.o	n.o	M	M	M
20 días	<i>R. pallescens</i>	-	++	++	+++	+	n.o	n.o	M	M	M
	<i>R. prolixus</i>	-	-	-	-	-	n.o	n.o	n.o	M	M
	<i>T. dimidiata</i>	-	++	-	-	-	n.o	n.o	n.o	n.o	M
	<i>T. infestans</i>	-	-	-	-	M	M	M	M		
	<i>T. lecticularia</i>	+++	+++	+++	++	n.o	n.o	n.o	M		
	<i>T. bruneri</i>	++	+	++	++	+	n.o	n.o	M	M	M
24 días	<i>R. pallescens</i>	-	+	+++	-	-	n.o	n.o	M	M	M
	<i>R. prolixus</i>	-	-	-	-	-	n.o	n.o	n.o	M	M
	<i>T. dimidiata</i>	++	-	-	-	+	n.o	n.o	n.o	n.o	M
	<i>T. infestans</i>	-	-	-	-	n.o	M	M	M		
	<i>T. lecticularia</i>	+++	+++	+++	+++	n.o	n.o	n.o	M		
	<i>T. bruneri</i>	++	++	+	+	n.o	n.o	M	M	M	M
28 días	<i>R. pallescens</i>	-	-	++	gs	gs	gs	gs	M	M	M
	<i>R. prolixus</i>	-	-	-	-	-	-	-	M	M	M
	<i>T. dimidiata</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	M
	<i>T. infestans</i>	-	-	-	M	M	M	M	M		
	<i>T. lecticularia</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++	M	M		
	<i>T. bruneri</i>	++	++	++	+++	gs	M	M	M	M	M

M: ninfa muerta; gs: extracción de glándulas salivales; n.o: hemolinfa no observada; *: el número de cada ninfa no corresponde al mismo insecto en el examen siguiente.

Con la cepa de *T. rangeli* KP1+, se determinó que durante los primeros 8 días de infección, *R. prolixus*, *R. pallescens* y *T. lecticularia* presentaron parásitos en su hemolinfa, cuya cantidad fue aumentando durante los primeros 15 días de infección.

Los *R. prolixus* presentaron una parasitemia alta durante todo el periodo de infección, en *T. bruneri*, la parasitemia se presentó hasta los 12 días de infección y se mantuvo siempre baja durante todo el periodo de observación. *T. dimidiata* presentó pocos insectos con parásitos en la hemolinfa y se mantuvieron con baja parasitemia durante los 30 días post-infección, mientras que *T. infestans* solo presentó un insecto con baja parasitemia a los 8 días de infectados pero no logró mantenerse (Cuadro 6).

Al realizar la extracción de las glándulas salivales (entre los 25 y 28 días de infección), se determinó que de 6 *R. prolixus* 2 tenían parásitos fuera de la glándula; se lograron distinguir epismastigotos y tripomastigotos alrededor, pero no se encontraron parásitos dentro de la glándula ni presencia de metacíclicos. En los otros 4 no se encontraron parásitos ni dentro ni fuera de ella.

Se logró la extracción de las glándulas de 4 *R. pallescens* y se encontraron llenas de parásitos, incluyendo metacíclicos, tanto dentro como fuera de ellas. De los 6 *T. lecticularia* que quedaban vivos, 2 presentaron parásitos fuera de la glándula unidos a ciertas zonas de la misma, pero dentro de la glándula no se encontraron parásitos ni formas similares a metacíclicos. De los 5 *T. bruneri*, solo 1 insecto presentó parásitos fuera de la glándula, unidos en ciertos sectores pero dentro no se encontraron formas del parásito.

Los 7 *T. infestans* y los 8 *T. dimidiata* se encontraron negativos en glándulas salivales (Cuadro 9).

Cuadro 6. Cantidad estimada de parásitos en hemolinfa de diferentes especies de triatóminos inoculados con *T. rangeli* EV26 KP1+

Fecha post-infección	Especie	Nº de ninfa*									
		Cantidad estimada de parásitos									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
4 días	<i>R. pallescens</i>	+++	+++	+++	+	+	n.o	n.o	n.o	n.o	n.o
	<i>R. prolixus</i>	-	-	-	-	-	n.o	n.o	n.o	n.o	n.o
	<i>T. dimidiata</i>	-	-	-	-	+	n.o	n.o	n.o	n.o	n.o
	<i>T. infestans</i>	+	-	-	-	-	n.o	n.o	n.o		
	<i>T. lecticularia</i>	-	-	-	+	+	n.o	n.o	n.o		
	<i>T. bruneri</i>	-	-	-	-	-	n.o	n.o	n.o	n.o	n.o
8 días	<i>R. pallescens</i>	++	++	+++	+	+	n.o	n.o	n.o	n.o	n.o
	<i>R. prolixus</i>	+++	++	++	+++	+++	n.o	n.o	n.o	n.o	M
	<i>T. dimidiata</i>	-	-	-	-	-	n.o	n.o	n.o	n.o	n.o
	<i>T. infestans</i>	+	-	-	-	-	n.o	n.o	n.o		
	<i>T. lecticularia</i>	++	++	+++	+++	n.o	n.o	n.o	n.o		
	<i>T. bruneri</i>	-	-	-	-	-	n.o	n.o	n.o	n.o	M
12 días	<i>R. pallescens</i>	+++	+++	++	+	+++	n.o	n.o	n.o	M	M
	<i>R. prolixus</i>	+++	+++	+++	+++	+++	n.o	n.o	n.o	M	M
	<i>T. dimidiata</i>	++	-	-	-	-	n.o	n.o	n.o	n.o	n.o
	<i>T. infestans</i>	-	-	-	-	-	n.o	n.o	n.o		
	<i>T. lecticularia</i>	+++	+++	++	+++	n.o	n.o	n.o	n.o		
	<i>T. bruneri</i>	+++	-	-	-	-	n.o	n.o	M	M	M
16 días	<i>R. pallescens</i>	++	+++	+++	+	+++	n.o	n.o	M	M	M
	<i>R. prolixus</i>	+++	+++	+++	+++	+++	n.o	n.o	M	M	M
	<i>T. dimidiata</i>	-	-	-	-	-	n.o	n.o	n.o	n.o	n.o
	<i>T. infestans</i>	-	-	-	-	n.o	n.o	n.o	n.o		
	<i>T. lecticularia</i>	+	++	+	++	n.o	n.o	n.o	n.o		
	<i>T. bruneri</i>	-	-	+	-	++	n.o	n.o	M	M	M
20 días	<i>R. pallescens</i>	-	-	+++	++	+	n.o	M	M	M	M
	<i>R. prolixus</i>	+++	++	+++	+++	++	n.o	M	M	M	M
	<i>T. dimidiata</i>	-	-	-	-	++	n.o	n.o	n.o	n.o	n.o
	<i>T. infestans</i>	-	-	-	-	n.o	n.o	n.o	n.o		
	<i>T. lecticularia</i>	++	+++	++	++	n.o	n.o	n.o	M		
	<i>T. bruneri</i>	++	++	++	++	-	n.o	n.o	M	M	M
24 días	<i>R. pallescens</i>	++	+	++	++	++	n.o	M	M	M	M
	<i>R. prolixus</i>	+++	-	+	+++	+++	n.o	M	M	M	M
	<i>T. dimidiata</i>	+++	-	-	-	-	n.o	n.o	n.o	n.o	n.o
	<i>T. infestans</i>	-	-	-	-	n.o	n.o	n.o	n.o		
	<i>T. lecticularia</i>	+++	+++	++	+++	n.o	n.o	n.o	M		
	<i>T. bruneri</i>	-	++	+	+	-	n.o	n.o	M	M	M
28 días	<i>R. pallescens</i>	-	+	++	++	-	++	+	+++	+++	M
	<i>R. prolixus</i>	+++	+++	+++	+++	+++	gs	M	M	M	M
	<i>T. dimidiata</i>	-	-	-	+++	-	-	-	++	-	M
	<i>T. infestans</i>	-	-	-	-	-	-	-	M		
	<i>T. lecticularia</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	M		
	<i>T. bruneri</i>	-	-	-	++	+	M	M	M	M	M

M: ninfa muerta; gs: extracción de glándulas salivales; n.o: hemolinfa no observada; *: el número de cada ninfa no corresponde al mismo insecto en este examen.

Experimento 3: En este experimento, se inocularon 4200 parásitos de la cepa JMZ16 (KP1-) y 4000 parásitos de la cepa EV26 (KP1+) en cada insecto. Con la cepa JMZ16 (KP1-) solo los *R. pallescens* presentaron una parasitemia moderada durante todo el periodo de observación (24 días), mientras que solo 2 *T. lecticularia* presentaron una gran cantidad de parásitos en su hemolinfa luego de 15 días de infectados. Todas las otras especies no lograron infectarse (Cuadro 7).

Al analizar las glándulas salivales, se determinó que de 10 *R. pallescens*, 6 presentaron gran cantidad de metatripomastigotos. De los 4 *R. prolixus* que quedaban vivos ninguno presentó parásitos en sus glándulas, esta misma situación se dio en 6 *T. lecticularia*, 8 *T. bruneri*, 5 *T. dimidiata*, 5 *P. geniculatus* y en 4 *T. infestans* revisados, ya que en ninguna de estas especies se presentaron parásitos ni dentro ni fuera de las glándulas (Cuadro 9).

Con la cepa EV26 (KP1+) se lograron obtener parasitemias moderadas en *R. pallescens* a los 6 días de infectados; en cambio, en los *R. prolixus* no se logró obtener parásitos en la hemolinfa durante todo el periodo de observación (24 días). Por otro lado, los *T. bruneri* presentaron pocos parásitos a los 6 días post-infección que se fue incrementando hasta presentar una parasitemia muy alta a los 15 días de infectados. Los *T. lecticularia* presentaron parásitos después de 15 días de infectados, pero siempre la parasitemia fue moderada. Las especies *T. dimidiata*, *T. infestans* y *P. geniculatus* no lograron infectarse con esta cepa de *T. rangeli* (Cuadro 8).

Cuando se examinaron las glándulas salivales de los insectos que quedaron vivos, se determinó que los 4 *R. prolixus* estaban negativos, mientras que 3 de 10 *R. pallescens* presentaron parásitos en sus glándulas, tanto epimastigotos como tripomastigotos en gran proporción dentro y fuera de ellas, además de metatripomastigotos.

De los 6 *T. bruneri*, solo 2 insectos presentaron parásitos unidos a la superficie glandular, pero no se encontraron metatripomastigotos dentro o fuera de ellas.

En las demás especies, no se logró obtener glándulas salivales infectadas con esta cepa de *T. rangeli* (Cuadro 9).

Cuadro 7. Cantidad estimada de parásitos en la hemolinfa de diferentes especies de insectos triatóminos infectados con *T. rangeli* JMZ16 (KP1-)

Fecha post-infección	Especie	Nº de ninfa*									
		Cantidad estimada de parásitos									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
3 días	<i>R. pallescens</i>	++	+	+++	++	-	n.o	n.o	n.o	n.o	n.o
	<i>R. prolixus</i>	-	-	-	-	-	n.o	n.o	n.o	n.o	n.o
	<i>T. dimidiata</i>	-	-	-	-	-	n.o	n.o	n.o	n.o	n.o
	<i>T. infestans</i>	-	-	-	-	-	n.o	n.o	n.o	n.o	n.o
	<i>T. lecticularia</i>	-	-	-	-	-	n.o	n.o	n.o	n.o	n.o
	<i>T. bruneri</i>	-	-	-	-	-	n.o	n.o	n.o	n.o	n.o
	<i>P. geniculatus</i>	-	-	-	-	-	n.o	n.o	n.o	n.o	n.o
6 días	<i>R. pallescens</i>	++	+++	++	+	+	n.o	n.o	n.o	n.o	n.o
	<i>R. prolixus</i>	-	-	-	-	-	n.o	n.o	n.o	n.o	n.o
	<i>T. dimidiata</i>	-	-	-	-	-	n.o	n.o	n.o	n.o	n.o
	<i>T. infestans</i>	-	-	-	-	-	n.o	n.o	n.o	n.o	n.o
	<i>T. lecticularia</i>	-	-	-	-	-	n.o	n.o	n.o	n.o	n.o
	<i>T. bruneri</i>	-	-	-	-	-	n.o	n.o	n.o	n.o	n.o
	<i>P. geniculatus</i>	-	-	-	-	-	n.o	n.o	n.o	n.o	n.o
9 días	<i>R. pallescens</i>	-	+	+	+	++	n.o	n.o	M	M	M
	<i>R. prolixus</i>	-	-	-	-	-	n.o	n.o	M	M	M
	<i>T. dimidiata</i>	-	-	-	-	-	n.o	n.o	n.o	n.o	n.o
	<i>T. infestans</i>	-	-	-	-	-	n.o	n.o	n.o	n.o	M
	<i>T. lecticularia</i>	-	-	-	-	-	n.o	n.o	n.o	n.o	n.o
	<i>T. bruneri</i>	-	-	-	-	-	n.o	n.o	n.o	n.o	n.o
	<i>P. geniculatus</i>	-	-	-	-	-	n.o	n.o	n.o	M	M
15 días	<i>R. pallescens</i>	+	-	-	+	+	+	M	M	M	M
	<i>R. prolixus</i>	-	-	-	-	M	M	M	M	M	M
	<i>T. dimidiata</i>	-	-	-	-	-	-	-	M	M	M
	<i>T. infestans</i>	-	-	-	-	-	-	M	M	M	M
	<i>T. lecticularia</i>	-	+++	-	-	+++	n.o	n.o	M	M	M
	<i>T. bruneri</i>	-	-	-	-	-	n.o	n.o	n.o	n.o	n.o
	<i>P. geniculatus</i>	-	-	-	-	-	n.o	M	M	M	M
21 días	<i>R. pallescens</i>	+++	+	++	+	g.s	g.s	M	M	M	M
	<i>R. prolixus</i>	-	-	-	-	M	M	M	M	M	M
	<i>T. dimidiata</i>	-	-	-	-	-	n.o	n.o	M	M	M
	<i>T. infestans</i>	-	-	-	-	M	M	M	M	M	M
	<i>T. lecticularia</i>	-	++	+++	-	-	-	-	M	M	M
	<i>T. bruneri</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	M
	<i>P. geniculatus</i>	-	-	-	-	-	M	M	M	M	M
24 días	<i>R. pallescens</i>	g.s	g.s	g.s	g.s	g.s	g.s	M	M	M	M
	<i>R. prolixus</i>	g.s	g.s	g.s	g.s	M	M	M	M	M	M
	<i>T. dimidiata</i>	g.s	g.s	g.s	g.s	g.s	M	M	M	M	M
	<i>T. infestans</i>	g.s	g.s	g.s	g.s	M	M	M	M	M	M
	<i>T. lecticularia</i>	g.s	g.s	g.s	g.s	g.s	g.s	M	M	M	M
	<i>T. bruneri</i>	g.s	g.s	g.s	g.s	g.s	g.s	g.s	g.s	M	M
	<i>P. geniculatus</i>	g.s	g.s	g.s	g.s	g.s	M	M	M	M	M

M: ninfa muerta; g.s: extracción de glándulas salivales; n.o: hemolinfa no observada; *el número de cada ninfa no corresponde al mismo insecto en el examen siguiente.

Cuadro 8. Cantidad estimada de parásitos en la hemolinfa de diferentes especies de insectos triatóminos infectados con *T. rangeli* EV26 (KP1+)

Fecha post-infección	Especie	Nº de ninfa*									
		Cantidad estimada de parásitos									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
3 días	<i>R. pallescens</i>	-	-	-	-	++	n.o	n.o	n.o	n.o	n.o
	<i>R. prolixus</i>	-	-	-	-	-	n.o	n.o	n.o	n.o	n.o
	<i>T. dimidiata</i>	-	-	-	-	-	n.o	n.o	n.o	n.o	n.o
	<i>T. infestans</i>	-	-	-	-	-	n.o	n.o	n.o	n.o	n.o
	<i>T. lecticularia</i>	-	-	-	-	-	n.o	n.o	n.o	n.o	n.o
	<i>T. bruneri</i>	-	-	-	-	-	n.o	n.o	n.o	n.o	n.o
	<i>P. geniculatus</i>	-	-	-	-	-	n.o	n.o	n.o	n.o	n.o
6 días	<i>R. pallescens</i>	+	++	+	++	+	n.o	n.o	n.o	n.o	n.o
	<i>R. prolixus</i>	-	-	-	-	-	n.o	n.o	n.o	n.o	n.o
	<i>T. dimidiata</i>	-	-	-	-	-	n.o	n.o	n.o	n.o	n.o
	<i>T. infestans</i>	-	-	-	-	-	n.o	n.o	n.o	n.o	n.o
	<i>T. lecticularia</i>	-	-	-	-	-	n.o	n.o	n.o	n.o	n.o
	<i>T. bruneri</i>	+	-	+	+	-	n.o	n.o	n.o	n.o	n.o
	<i>P. geniculatus</i>	-	-	-	-	-	n.o	n.o	n.o	n.o	n.o
9 días	<i>R. pallescens</i>	+	-	++	++	+	n.o	n.o	n.o	M	M
	<i>R. prolixus</i>	-	-	-	-	-	n.o	M	M	M	M
	<i>T. dimidiata</i>	-	-	-	-	-	n.o	n.o	n.o	n.o	n.o
	<i>T. infestans</i>	-	-	-	-	-	n.o	n.o	n.o	n.o	M
	<i>T. lecticularia</i>	-	-	-	-	++	n.o	n.o	n.o	n.o	n.o
	<i>T. bruneri</i>	-	++	+	+	+	n.o	n.o	n.o	n.o	n.o
	<i>P. geniculatus</i>	-	-	-	-	-	n.o	n.o	n.o	n.o	M
15 días	<i>R. pallescens</i>	-	++	++	-	M	M	M	M	M	M
	<i>R. prolixus</i>	-	-	-	-	M	M	M	M	M	M
	<i>T. dimidiata</i>	-	-	-	-	-	n.o	n.o	n.o	n.o	n.o
	<i>T. infestans</i>	-	-	-	-	-	-	M	M	M	M
	<i>T. lecticularia</i>	++	+	-	+	-	n.o	n.o	n.o	n.o	M
	<i>T. bruneri</i>	-	+++	+++	+++	+++	n.o	n.o	n.o	n.o	M
	<i>P. geniculatus</i>	-	-	-	-	-	n.o	n.o	n.o	n.o	M
21 días	<i>R. pallescens</i>	+	+	g.s	g.s	M	M	M	M	M	M
	<i>R. prolixus</i>	-	-	-	-	M	M	M	M	M	M
	<i>T. dimidiata</i>	-	-	-	-	-	-	-	n.o	n.o	n.o
	<i>T. infestans</i>	-	-	-	-	-	M	M	M	M	M
	<i>T. lecticularia</i>	+	+++	-	-	++	+	M	M	M	M
	<i>T. bruneri</i>	+++	+++	++	+++	++	-	++	M	M	M
	<i>P. geniculatus</i>	-	-	-	-	-	-	M	M	M	M
24 días	<i>R. pallescens</i>	g.s	g.s	g.s	g.s	M	M	M	M	M	M
	<i>R. prolixus</i>	g.s	g.s	g.s	g.s	M	M	M	M	M	M
	<i>T. dimidiata</i>	g.s	g.s	g.s	g.s	g.s	g.s	g.s	M	M	M
	<i>T. infestans</i>	g.s	g.s	g.s	g.s	M	M	M	M	M	M
	<i>T. lecticularia</i>	g.s	g.s	g.s	g.s	g.s	g.s	M	M	M	M
	<i>T. bruneri</i>	g.s	g.s	g.s	g.s	g.s	g.s	M	M	M	M
	<i>P. geniculatus</i>	g.s	g.s	g.s	g.s	g.s	M	M	M	M	M

M: ninfa muerta; g.s: extracción de glándulas salivales; n.o: hemolinfa no observada; *el número de cada ninfa no corresponde al mismo insecto en el examen siguiente.

En el cuadro 9 se observa que la cepa JMZ16 (KP1-) solo logra completar su ciclo biológico en su vector natural *R. palleescens*, ya que en otras especies como *T. bruneri* o *T. lecticularia* donde este parásito pudo establecerse en la hemolinfa de la mayoría de los insectos infectados no pudo llegar a penetrar las glándulas salivales. Por otro lado, con la cepa EV26 (KP1+), hubo un cierto número de insectos de *R. palleescens* con glándulas positivas, mientras que en su vector natural *R. prolixus*, solo 4 de 15 insectos presentaron parásitos en sus glándulas salivales, a pesar de que la mayoría de los insectos infectados presentaron parásitos en su hemolinfa.

Cuadro 9. Número acumulativo de insectos infectados con *T. rangeli* (KP1- y KP1+) en hemolinfa (del 3° al 28 día) y glándulas salivales (del 15 al 30 día).

Especie	<i>T. rangeli</i> JMZ16 (KP1-)*				<i>T. rangeli</i> EV26 (KP1+)*			
	Hemolinfa	%	Glándulas salivales	%	Hemolinfa	%	Glándulas salivales	%
<i>R. palleescens</i>	35/35	100	15/19	79	20/20	100	7/14	50
<i>R. prolixus</i>	0/20	0	0/11	0	25/35	71	4/15	26
<i>T. dimidiata</i>	3/20	15	0/14	0	3/20	15	0/15	0
<i>T. infestans</i>	0/18	0	0/8	0	2/18	11	0/11	0
<i>T. lecticularia</i>	10/18	55	0/12	0	12/18	66	0/12**	0
<i>T. bruneri</i>	25/35	71	0/12	0	35/35	100	0/21**	0
<i>P. geniculatus</i>	0/25	0	0/14	0	0/25	0	0/15	0

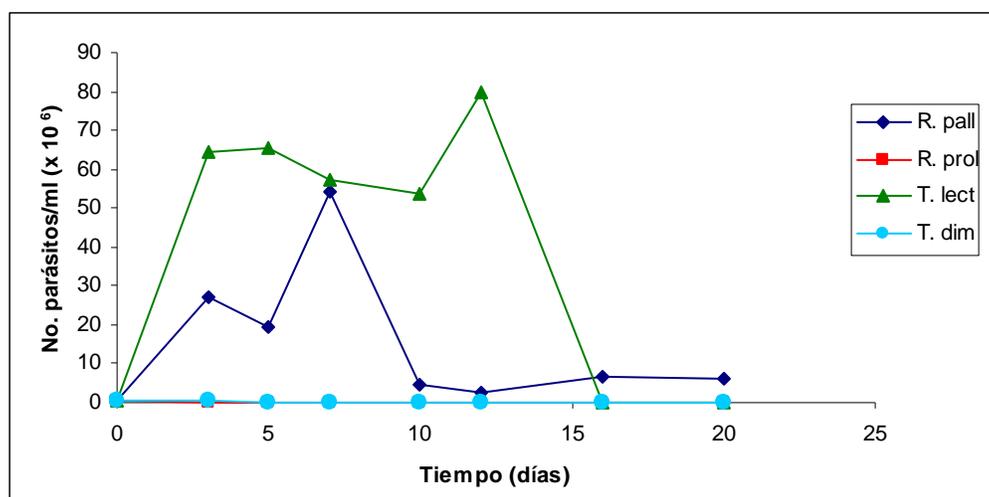
* N° de positivos/total revisados

**Se encontraron parásitos fuera de la glándula, unidos a ciertas zonas de la superficie pero no logran penetrar en ella para completar el ciclo.

Experimento 4: En este experimento, se contó la parasitemia en 4 especies de insectos triatóminos con ambas cepas de *T. rangeli* KP1- y KP1+. Se pudo notar que con la cepa JMZ16 (KP1-) la parasitemia es muy alta en *R. palleescens* con un pico máximo de 54.2 millones de parásitos por ml a los 7 días de infectados, mientras que luego de este periodo disminuye y se mantiene muy baja durante los siguientes 10 días de infección. Por otro lado, en *T. lecticularia*, la parasitemia aumenta en tan solo 3 días de infección y llega a un

pico máximo de 80 millones de parásitos por ml a los 12 días de infección. No se logró continuar el recuento luego de este periodo ya que los insectos que quedaban aún parasitados murieron rápidamente. En el caso de *R. prolixus* no se encontraron parásitos en la hemolinfa y en algunos *T. dimidiata* se contaron menos de 100 mil parásitos por ml durante los primeros 7 días de infectados y luego de este periodo la parasitemia desapareció (Figura 12).

Figura 12. Cuantificación de la parasitemia en hemolinfa de 4 especies de triatóminos infectados con cepa JMZ16 (KP1-)

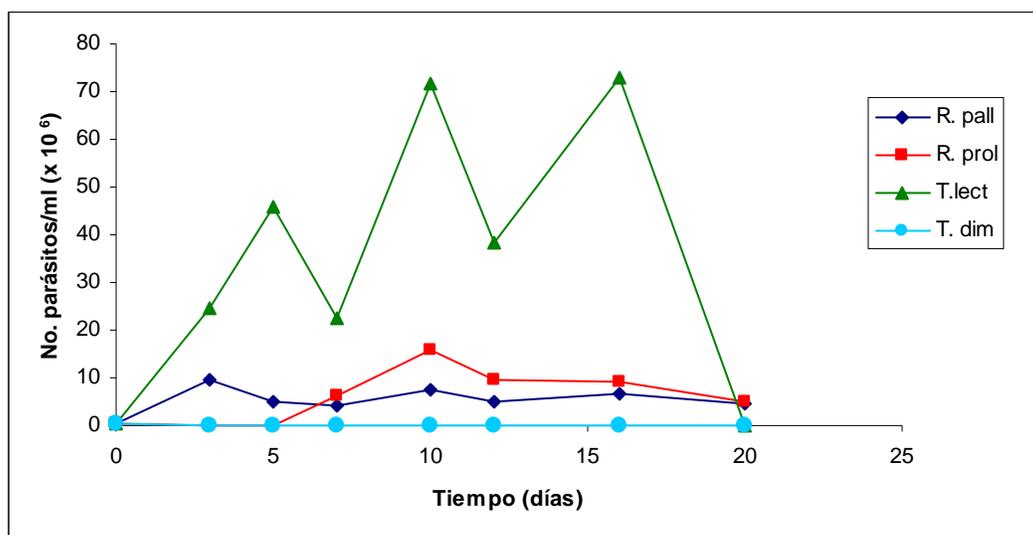


La parasitemia en estas mismas especies con la cepa *T. rangeli* (KP1+) fue muy alta en los *T. lecticularia*, presentando varios picos de crecimiento durante todo el periodo de recuento, llegó a un máximo de 73 millones de parásitos por ml a los 16 días de infectados y luego de este periodo los pocos insectos que quedaron murieron por lo que no se pudo continuar el recuento. Por otro lado, la parasitemia en *R. prolixus* empezó a aumentar luego de 5 días de infectados y llegó al máximo de parasitemia a los 10 días con 15,7 millones de parásitos por ml; luego de este periodo, la parasitemia empezó a disminuir considerablemente y se mantuvo baja durante todo el periodo de conteo posterior.

Los *R. pallens* presentaron un pico máximo de parasitemia de 9.7 millones de parásitos por ml en tan solo 3 días de infectados pero luego empezó a disminuir y se mantuvo con

pocas variaciones durante todo el periodo de conteo. Algunos *T. dimidiata* presentaron una parasitemia muy baja de menos de 100 mil parásitos por ml durante los primeros 7 días de conteo, pero luego de este periodo no se presentó parasitemia en la hemolinfa de estos insectos (Figura 13).

Figura 13. Cuantificación de la parasitemia en hemolinfa de 4 especies de triatóminos infectados con cepa EV26 KP1+



Estudio de la infección en ratones con ambas cepas

De un total de 60 ratones inoculados con ambas cepas de *T. rangeli* en 3 experimentos (15 ratones Swiss y 15 Balb/c, para cada cepa de *T. rangeli*), con parásitos mantenidos en el laboratorio por 2 años, y con inóculos entre 17 y 142 x 10⁶ parásitos, ninguno de ellos mostró tripomastigotos en sangre durante 30 días de observación.

En los 3 experimentos realizados con parásitos de las mismas cepas, pero de reciente aislamiento a partir de ratones infectados, en los que también se infectaron 60 ratones, (15 Swiss y 15 Balb/c para cada cepa) tanto los Swiss como los Balb/c presentaron parásitos en sangre durante los 30 días de observación (Cuadro 10-12).

Las parasitemias en algunos casos fueron muy bajas (1 parásito en varios campos de 400x), aunque, al infectar con inóculos de 13 y 18 x 10⁶ parásitos por ratón, las parasitemias se mantuvieron moderadas (2-4 parásitos/campo 400x) durante los primeros 15 días de

infección y luego de este periodo empezaron a bajar (1 parásito en varios campos) hasta desaparecer al mes de infectados.

Con la cepa JMZ16 las tasas de infección en los ratones Swiss, en promedio fueron de 87% y en los Balb/c fueron de un 80%; con la cepa EV26, las tasas de infección fueron del 60% en los ratones Swiss y del 53% en los Balb/c (Cuadro 13).

Cuadro 10. Experimento #1 en ratones usando cepas *T. rangeli* de reciente aislamiento de ratones infectados.

Condiciones experimento	Cepa <i>T.rangeli</i>	
	JMZ16	EV26
Inóculo	13,4 x 10 ⁶	14,0x 10 ⁶
Peso ratones	Swiss: 11,7 g Balb/c: 10,1 g	Swiss: 12,9 g Balb/c: 10,1 g
Edad ratones	3 semanas	3 semanas
Edad cultivos <i>T. rangeli</i> *	1.5 meses	1.5 meses
Tasa infección (# infectados/total)	Swiss: 100% (5/5) Balb/c: 60% (3/5)	Swiss: 100% (5/5) Balb/c: 80% (4/5)

* Tercer pase en cultivo

Cuadro 11. Experimento #2 en ratones usando cepas *T. rangeli* de reciente aislamiento de ratones infectados

Condiciones experimento	Cepa <i>T.rangeli</i>	
	JMZ16	EV26
Inóculo	6,7 x 10 ⁶	6,3 x 10 ⁶
Peso ratones	Swiss: 15,5 g Balb/c: 11,4g	Swiss: 13,9 g Balb/c:11,7g
Edad ratones	3.5 semanas	3.5 semanas
Edad cultivos <i>T. rangeli</i> *	2 meses	2 meses
Tasa infección (# infectados/total)	Swiss: 80% (4/5) Balb/c: 100% (5/5)	Swiss: 60% (3/5) Balb/c: 0 % (0/5)

* Cuarto pase en cultivo

Cuadro 12. Experimento #3 en ratones usando cepas *T. rangeli* de reciente aislamiento de ratones infectados.

Condiciones experimento	Cepa <i>T.rangeli</i>	
	JMZ16	EV26
Inóculo	18,3 x 10 ⁶	19,8x 10 ⁶
Peso ratones	Swiss: 25,8 g Balb/c: 20,6 g	Swiss:24,5g Balb/c: 20,3 g
Edad ratones	4 semanas	4 semanas
Edad cultivos <i>T. rangeli</i> *	3 meses	3 meses
Tasa infección (# infectados/total)	Swiss: 80% (4/5) Balb/c: 80% (4/5)	Swiss: 20% (1/5) Balb/c: 80 % (4/5)

* Sexto pase en cultivo

Cuadro 13. Valores acumulativos de la infección de ratones Balb/c y Swiss en 3 experimentos con 2 cepas de *T. rangeli* de genotipos diferentes

Raza de ratón	Cepa de <i>T. rangeli</i> (genotipo)	Resultado (infectados/total)	Tasa de infección
Swiss	JMZ16 (KP1-)	13/15	87%
Balb/c		12/15	80%
Swiss	EV26 (KP1+)	9/15	60%
Balb/c		8/15	53%

Se analizó estadísticamente la diferencia de susceptibilidad entre razas de ratones a cada cepa de *T. rangeli* usada y se obtuvo con la cepa JMZ16 (KP1-) un valor p=0.66 y con la cepa EV26 (KP1+) un valor p=0.73, con lo que se comprueba que no hay una diferencia significativa en cuanto a la susceptibilidad de las razas de ratón a cada cepa de *T. rangeli*.

Estudio morfométrico de cepas de *T. rangeli*

En el cuadro 14 se puede observar que las dos cepas de *T. rangeli* presentan diferencias en sus medidas, se demuestra que el parásito KP1+ es más grande que el KP1- y que presenta un flagelo y un índice PN/NA mayor (Cuadro 14).

Cuadro 14. Morfometría de 2 cepas de *T. rangeli*, de genotipos diferentes, en sangre de ratón Swiss. Las cifras representan el promedio en micrómetros de 30 ejemplares medidos \pm la desviación estándar

Cepa	Medidas						
	P-K	K-N	P-N	N-A	Índice PN/NA	Largo flagelo	Largo total
JMZ16 (KP1-)	6,53 \pm 1,98	9,83 \pm 1,76	16,43 \pm 2,37	9,70 \pm 2,04	1,77 \pm 0,46	8,60 \pm 2,13	34,60 \pm 3,56
EV26 (KP1+)	8,13 \pm 2,66	8,73 \pm 1,74	16,83 \pm 2,97	8,40 \pm 2,25	2,14 \pm 0,64	11,43 \pm 3,49	37,40 \pm 3,99

P-K: del extremo posterior al cinetoplasto; K-N: del cinetoplasto al núcleo; P-N: del extremo posterior al núcleo; N-A: del núcleo al extremo anterior.

Se analizaron estadísticamente las medidas de longitud total del parásito y del índice PN/NA y se obtuvieron valores de $p= 0.0056$ y $p= 0.04$ respectivamente, con lo que se demuestra que hay diferencias significativas en ambas cepas.

DISCUSIÓN

Una de las características más importantes de *T. rangeli* es la heterogeneidad entre cepas, lo que nos permitió designar dos cepas genéticamente diferentes (D' Alessandro y Saravia, 1999; Guhl y Vallejo, 2003). Las diferencias en cuanto a su capacidad para adaptarse a una especie de vector determinada, así como su comportamiento biológico en vertebrados y medios de cultivo, son aspectos poco conocidos entre cepas de genotipos diferentes.

Por ello, dos cepas de *T. rangeli* con genotipos diferentes fueron motivo de este estudio a nivel biológico, para establecer sus posibles similitudes y diferencias en cuanto a su comportamiento bajo condiciones *in vivo* e *in vitro*.

En cuanto a su capacidad de crecimiento en medios de cultivo, muchos son los que se han descritos en la literatura, entre ellos, el NNN, Geiman, Johnson, Kelser, LIT y medio de Eagle, los dos últimos suplementados con suero fetal bovino (D' Alessandro, 1972, 1976; D' Alessandro y Saravia, 1992). Takle y Young (1988) reportaron un crecimiento óptimo (2.5×10^6 parásitos por ml) luego de 8 días de cultivo en medio de Eagle con 20% de SFB y D' Alessandro (1972, 1976) afirma que el medio de LIT es el más utilizado para el crecimiento en grandes cantidades de este parásito.

Existe, además, un medio líquido monofásico libre de proteínas, el cual podría, según algunos autores, ser útil para el crecimiento de *T. rangeli*. Este medio fue inicialmente modificado por Warren (1957) para el crecimiento de *T. cruzi* y posteriormente fue utilizado por Zeledón (1959) como medio diferencial entre *T. cruzi* y *T. rangeli*, ya que este último no creció bien en este medio según este último autor. No obstante, se presenta una controversia en cuanto a su utilidad ya que contrario a Zeledón (1959), Minter-Goedbloed y Oliveira (1976) sostienen que este medio puro permitió crecer y mantener una cepa de *T. rangeli* durante varios pasajes. Datos de nuestro laboratorio de Zoonosis demuestran que de 16 cepas de *T. rangeli* y 11 cepas de *T. cruzi*, de distinto origen, 15 de las primeras no logran crecer en este medio, mientras que *T. cruzi* sí lo hace aunque algunas cepas no crecen más allá del tercero o cuarto pase en el medio (Zeledón et al., datos no publicados).

El medio de Warren sin SFB presenta la desventaja, de que es un medio escaso en nutrientes, que no está suplementado con vitaminas y aminoácidos como lo está el medio LIT, por lo que no es un medio apto para el crecimiento de *T. rangeli* (Zeledón, 1959). Con

estos resultados se confirmó lo afirmado por Zeledón (1959) ya que las dos cepas utilizadas independientemente del genotipo no fueron capaces de crecer en este medio. Sin embargo, se confirmó, que al adicionarle suero fetal, éste le proporciona los nutrientes necesarios para el desarrollo del parásito, ya que ambas cepas lograron crecer en grandes cantidades, aún cuando se varió la concentración de suero fetal; incluso alcanzaron mayores picos de crecimiento comparadas con el medio LIT con 20% de SFB.

Al comparar el crecimiento de ambas cepas, se determinó que la cepa JMZ16 (KP1-) pudo crecer casi dos veces más que la cepa EV26 (KP1+) en todos los medios utilizados. Así mismo, tarda más tiempo en llegar a su fase de decrecimiento, a pesar de que sus picos máximos llegan a darse en menos de 12 días de mantenimiento en cultivo mientras que EV26 logra llegar hasta los 22 días.

Estos resultados demuestran que el medio de Warren suplementado con SFB no solo permitió demostrar diferencias de comportamiento entre las dos cepas, sino que además, permitió el crecimiento de gran cantidad de flagelados, los cuales, se mantuvieron vivos por un periodo prolongado. Presenta la ventaja, además, de ser un medio relativamente barato, el cual no requiere la adición de gran cantidad de componentes suplementarios, y es fácil de preparar, no solo por el poco tiempo que requiere, sino porque no necesita de una preparación minuciosa como lo requiere el LIT.

Otra diferencia mostrada por las dos cepas fue en cuanto a la proporción epimastigotos/tripomastigotos en medio LIT con 20% de SFB, pues se pudo comprobar que la capacidad entre ambas cepas para transformarse de epimastigotos a tripomastigotos bajo las condiciones de este medio varió notablemente. En la cepa JMZ16 (KP1-) la forma de epimastigotos predomina todo el tiempo en cultivo ya que se observan pocas formas de tripomastigotos a los cinco días de cultivo y el porcentaje de éstos se mantiene muy bajo llegando solo a un 26% a los 33 días de mantenimiento, mientras que, con la cepa EV26 (KP1+), si bien las formas predominantes durante los primeros días de cultivo son los epimastigotos, éstos empiezan a disminuir conforme los tripomastigotos van apareciendo, siendo éstas últimas las formas predominantes a los 33 días de cultivo. Esto permite determinar que si bien en la literatura se reporta a los epimastigotos como formas predominantes en cultivo (D' Alessandro, 1976; Añez, 1982a; D' Alessandro y Saravia, 1999), algunas cepas de *T. rangeli*, como la EV26 (KP1+) pueden, en medio LIT,

transformarse en formas de tripomastigotos en un corto tiempo. Esto, sin embargo, podría ser una característica propia de las cepas aquí empleadas y sería necesario explorar este fenómeno con otras cepas para saber si es una condición fortuita o consistente.

Cuando se inocularon células Vero con ambas cepas de *T. rangeli*, usando tanto cepas de reciente aislamiento, capaces de infectar ratones, como cepas mantenidas *in vitro* por un tiempo prolongado, se observó otra similitud entre ellas, ya que no se logró determinar infección con ninguna pues, no se identificaron formas intracelulares en división ni formas similares a amastigotos. Estos resultados concuerdan con lo expuesto por Eger-Mangrich et al., (2001), quienes no encontraron formas intracelulares luego de 24 horas de interacción célula-parásito, usando también células Vero. Por ello, se podría concluir que estas cepas en células Vero no logran transformarse en formas tisulares que puedan dividirse dentro de las células.

En contraposición con estos datos, Osorio et al., (1995), lograron infectar células humanas con una cepa de *T. rangeli* colombiana y obtuvieron formas indistinguibles a amastigotos, además de formas redondas con un corto flagelo dentro de las células, aparentemente transformándose en amastigotos, por lo que no se podría descartar la posibilidad de este estado intracelular del parásito.

Al evaluar la susceptibilidad a la infección de siete especies de triatóminos con las dos cepas de *T. rangeli*, se comprobó que existen diferencias entre especies de insectos según la cepa utilizada.

Se comprobó que la cepa KP1- se logró desarrollar solo en la hemolinfa de los 35 *R. pallenscens*, vector natural de este parásito, mientras que en 15 de 19 insectos se desarrolló en las glándulas salivales y se evidenció la metaciclogénesis en todos los insectos disecados.

Con *R. prolixus*, ningún insecto presentó parásitos en su hemolinfa, lo que permite sugerir que las cepas de *T. rangeli* KP1- no logran desarrollarse en esta especie, ya sea por el alto grado de adaptación que presentan las cepas de *T. rangeli* a sus hospederos invertebrados, la capacidad de los insectos de producir ciertos péptidos antimicrobianos (AMPs) o el aislamiento geográfico de los diversos tipos de este flagelado. Estos péptidos, son producidos en el cuerpo gordo o en los hemocitos del insecto y son liberados a la hemolinfa para que contribuyan a la interacción del parásito con el vector, ya sea regulando su número

o matando directamente los flagelados de cepas genéticamente incompatibles (Zeledón et al., 1963; Zeledón, 1965; Zeledón y Blanco, 1965; Machado et al., 2001; López et al., 2003; Boulanger et al., 2006; Marquez et al., 2006).

Por otro lado, la cepa KP1+ se desarrolló en la hemolinfa de 25 *R. prolixus* de un total de 35 infectados y logró completar su ciclo, llegando a glándulas salivales, solo en 4 de 15 insectos analizados, a pesar de que la parasitemia en la hemolinfa siempre fue alta y se mantuvo durante todo el curso de la infección, el parásito no logró establecerse sino hasta los 8 días, ya que no se encontraron flagelados durante los primeros 4 días. Esto hace pensar que la cepa KP1+ aquí usada, aunque logró desarrollarse bien en insectos del grupo *prolixus* requería de más tiempo para lograr establecerse en la hemolinfa de su hospedero natural y atravesar la membrana de la glándula salival y completar la metacicloogénesis.

En los 20 *R. palleescens* infectados con esta cepa KP1+, se presentaron altas parasitemias en la hemolinfa de todos los insectos desde los 4 días de infectados, las cuales se mantuvieron durante todo el periodo de observación. Al analizar las glándulas salivales de 14 de estos insectos se encontró que 7 *R. palleescens* presentaron parásitos en sus glándulas salivales tanto dentro como fuera de la misma; sin embargo, la cantidad de metacíclicos era mucho menor a las formas encontradas en esta misma especie infectada con la cepa KP1-. Estos resultados deben confirmarse ya que solo se ha reportado el desarrollo de cepas KP1+ en el intestino de *R. colombiensis* pero no en la hemolinfa y glándulas salivales, mientras que las cepas KP1- también se han encontrado en forma natural solo en el intestino de *R. prolixus* pero no en sus glándulas (Vallejo et al., 2002; Vallejo et al., 2003; Guhl y Vallejo, 2003).

Con ambas cepas de *T. rangeli*, se comprobó que logran establecerse en la hemolinfa de especies del género *Triatoma* como *T. lecticularia* y *T. bruneri*. En *T. lecticularia*, las parasitemias fueron muy altas y se mantuvieron así durante todo el periodo de observación; no obstante, solo se logró encontrar dos de 18 insectos infectados con la cepa KP1+ con pocos parásitos unidos a ciertas zonas de la superficie externa de la glándula, pero, dentro de la misma no se encontraron formas del parásito. Por otro lado, con la cepa KP1- ninguno de los 18 insectos presentó glándulas salivales con flagelados. Estos resultados concuerdan con los datos de D` Alessandro (1972) quien obtiene por infección experimental, altas parasitemias en la hemolinfa de *T. lecticularia*, pero las glándulas salivales se mantienen libres de flagelados.

Por su parte en el caso de *T. bruneri*, no se ha reportado en la literatura infección experimental ni natural con cepas de *T. rangeli*. Sin embargo, nuestros resultados demuestran por primera vez que con ambas cepas, la infección puede darse en la hemolinfa de una manera moderada, pero que no logran establecerse en las glándulas salivales y completar así su ciclo de vida en esta especie. No obstante, en el caso de la cepa EV26 (KP1+), se presentaron 3 de 21 insectos disecados con parásitos unidos a ciertas zonas de la superficie glandular, pero no lograron identificarse metatrimastigotos. Probablemente, la superficie glandular de estas especies carece de los carbohidratos receptores presentes en la glándula de *Rhodnius* que les sirven para la unión y posterior entrada del parásito a la glándula, o que son poseedoras de la proteína trypsinasa que lisa los parásitos no permitiendo que se establezcan en ellas (Basseri et al., 2002; Amino et al., 2002; Azambuja y García, 2005).

Los *T. dimidiata* infectados con ambas cepas, presentan una infección transitoria, abortan la infección en la hemolinfa tempranamente y sus glándulas se mantienen libres de parásitos; estos resultados concuerdan con los datos de infecciones experimentales en la literatura, donde se ha logrado infectar la hemolinfa de *T. dimidiata* pero no se han obtenido glándulas salivales positivas al parásito; sin embargo, reportes como el de Marinkelle (1968) ó Guhl y Vallejo (2003) quienes logran obtener un porcentaje de infección en las glándulas de estos insectos, no permiten descartar por el momento la posible capacidad vectorial de estas especies en una determinada región geográfica.

Por otro lado, los *T. infestans* no logran infectarse con la cepa KP1-, mientras que con la cepa KP1+ solo dos de 18 insectos presentan flagelados en la hemolinfa, pero también logran eliminar el parásito tempranamente, mientras que la glándulas salivales se mantienen libres de infección. Estos resultados demuestran que aparentemente los *T. infestans* logran infectarse con la cepa KP1+, aunque presentan cierta resistencia, ya que los factores tripanolíticos de la hemolinfa logran eliminar el parásito haciendo a estos insectos poco susceptibles a ciertas cepas de *T. rangeli*, como lo demuestran Zeledón y Monge (1966) al infectar *T. infestans* por xenodiagnóstico, con una cepa de *T. rangeli* y determinan que se da un aumento en las células fagocíticas de estos insectos que, al parecer, causan la disminución del parásito y, por ende, ocasionan solo una infección temporal.

Así mismo, varios son los trabajos en la literatura que demuestran esta resistencia de *T. infestans* a cepas de *T. rangeli*. Zeledón et al., (1964) usando cepas de *T. rangeli* de Venezuela y Costa Rica, demostraron que esta especie pierde la infección tempranamente, tanto en el intestino como en la hemolinfa. Además, Zeledón y Blanco (1965), usando una cepa venezolana, demuestran que en *T. infestans* los parásitos desaparecen del intestino después de un tiempo y, que este insecto presenta cierta inmunidad celular que impide la proliferación del tripanosoma en la hemolinfa.

Dados estos resultados, se podría considerar que *T. infestans* no podría ser un vector de *T. rangeli*. Sin embargo, Grewal (1969), reporta 2 insectos infectados por xenodiagnóstico, positivos a una cepa de *T. rangeli*, y afirma, que estos insectos presentaron metacíclicos en el contenido de las glándulas salivales y que además, fueron capaces de infectar ratones. Por otro lado, D'Alessandro (1972) reportó un insecto de 38 *T. infestans* infectados por inoculación intracelómica, que presentó parásitos en sus glándulas salivales, pero no se demostró transmisión por picadura. Estos datos, no permiten descartar la capacidad vectorial de esta especie, por lo que se requerirían más experimentos para lograr confirmar si algunas cepas de *T. rangeli* pueden completar su ciclo de vida en este insecto.

Los *P. geniculatus* no lograron infectarse con ninguna de las dos cepas utilizadas; ningún insecto presentó parásitos en hemolinfa, durante todo el periodo de observación y sus glándulas salivales estuvieron libres de flagelados. En la literatura no se tienen reportes de infecciones experimentales y solo se menciona una infección intestinal natural en Venezuela (Tejero y Pifano, 1964), la cual, no garantiza una posible capacidad vectorial de este insecto. Por ello y con base en nuestros resultados, se podría considerar a esta especie como refractaria a la infección por *T. rangeli*.

Algunos autores afirman que las características biológicas de cepas de *T. rangeli* en el hospedero invertebrado pueden variar según la edad de la cepa y la forma en que se mantienen bajo condiciones de laboratorio por periodos prolongados, lo que podría ocasionar pérdida de virulencia para sus hospederos invertebrados y vertebrados (Zeledón, 1954; Tobie, 1964; D'Alessandro y Saravia, 1992).

Al cuantificar la parasitemia en la hemolinfa de 4 especies de triatóminos, con la cepa JMZ16 KP1-, se pudo notar que los *T. lecticularia* desarrollan una parasitemia mayor

comparada con las otras especies, incluso con *R. pallescens*, el cual es el vector natural de las cepas de *T. rangeli* KP1-.

En ambas especies se observó un aumento de los flagelados en la hemolinfa durante los primeros días de infección, pero en *R. pallescens*, la parasitemia empezó a disminuir considerablemente a partir de los 10 días, quizás porque en esta especie *T. rangeli* tiene la capacidad de llegar a las glándulas salivales y atravesar su membrana para dar paso a la metacicloogénesis en pocos días. En cambio en los *T. lecticularia*, los flagelados parecen tener la capacidad de evadir los factores tripanolíticos de la hemolinfa y si bien logran reproducirse y mantenerse en grandes cantidades durante un tiempo prolongado, no son capaces de desarrollarse en las glándulas de estos insectos, es decir, no completan el ciclo.

En el caso de *T. dimidiata*, solo algunos insectos presentaron parásitos en su hemolinfa, por lo que las parasitemias siempre se mantuvieron menores a 10×10^4 parásitos por ml durante los primeros 7 días de infección y luego de este periodo la parasitemia desapareció, quizás debido a que el sistema inmune del insecto se activa al inicio de la infección y logra eliminar el parásito.

Los *R. prolixus* no presentaron parásitos en su hemolinfa ya que las cepas de *T. rangeli* KP1- no logran desarrollarse en estos insectos. En la literatura se han encontrado cepas KP1- en el intestino de *R. prolixus*, pero no logran invadir la hemolinfa, y posiblemente antes de que los flagelados puedan escapar del tracto intestinal para completar su ciclo, el sistema inmune logra eliminarlos por completo (Vallejo et al., 2002).

Por otro lado, al cuantificar la parasitemia de estas mismas especies con la cepa *T. rangeli* KP1+, se observó una situación similar en la especie *T. lecticularia*; las parasitemias siempre se mantuvieron altas, incluso mayores que las producidas en su vector natural *R. prolixus*. En este último, *T. rangeli* logró desarrollarse en grandes cantidades en la hemolinfa durante los primeros 10 días, luego de este periodo la parasitemia fue disminuyendo, probablemente debido a la capacidad de esta cepa de parásito de migrar a glándulas salivales para desarrollarse y completar su ciclo en este insecto.

Por otro lado, los *R. pallescens* también presentaron parásitos en su hemolinfa, aunque se considera que las cepas *T. rangeli* KP1+ no logran desarrollarse en la hemolinfa de insectos del “grupo pallescens”, se pudo notar que esta cepa en particular logra, aunque en muy

bajas cantidades, mantenerse por más de 15 días en la hemolinfa, evadiendo, los factores tripanolíticos y los mecanismos del sistema inmune de los insectos.

En los *T. dimidiata*, la parasitemia siempre se mantuvo muy baja durante los primeros 7 días de infección, luego de este periodo, de igual manera que con la cepa KP1-, el insecto logra eliminar el parásito y aborta la infección tempranamente.

En la literatura, no se han reportado datos de conteo de parásitos en hemolinfa de especies como *T. lecticularia* y *T. dimidiata*, por lo que nuestros datos no pueden ser comparados; sin embargo, en el género *Rhodnius* solamente Zeledón et al., (1964), reportaron parasitemias en *R. pallescens* y *R. neglectus* de 58 y 45 x 10⁶ parásitos por ml respectivamente; con una cepa panameña y con una cepa de *T. rangeli* costarricense, reportaron parasitemias de 106, 18 y 130 x 10⁶ parásitos por ml en *R. pallescens*, *R. neglectus* y *R. prolixus*. Aunque nuestras cifras son más bajas que los reportados por estos autores, coinciden en que en especies del género *Rhodnius*, las cepas de *T. rangeli* logran desarrollarse en grandes cantidades, lo que les permite completar su ciclo de vida en el vector.

Cuando se estudió la capacidad de infección de las cepas de *T. rangeli*, mantenidas por más de dos años en cultivo, en ratones, se demostró que, con ambas cepas, ningún ratón presentó parasitemias, a pesar de que los inóculos fueran altos, en algunos casos, mayores a 100 x 10⁶ parásitos para cada ratón, probablemente por pérdida de virulencia.

Estos resultados respaldan lo afirmado por D'Alessandro (1976) y otros autores, los cuales, indican que el mantenimiento no cíclico de los parásitos en condiciones *in vitro* puede provocar la pérdida de virulencia de los parásitos (Grewal, 1969; Hoare, 1972), lo cual hace, que sean incapaces de establecerse en la sangre de los vertebrados.

Por otro lado, al usar las mismas cepas de reciente aislamiento de ratones, se lograron infectar las dos razas de ratones y aunque se varió la edad y los inóculos en cada experimento, la parasitemia se presentó en la mayoría de los ratones inoculados. En ambas cepas de ratones el nivel de la parasitemia siempre fue bajo y se comprobó la presencia de flagelados en la sangre desde las 24 horas post-infección y se mantuvieron así por un mes aproximadamente. Hoare (1972), afirma que las parasitemias pueden aparecer desde las 10 a 14 horas post-infección y duran de 3 a 4 semanas aproximadamente.

Poco se sabe sobre el ciclo de vida de *T. rangeli* en el hospedero vertebrado, aunque no se conoce su desarrollo dentro del mismo, se sabe que el nivel de parasitemia en vertebrados siempre es bajo y el periodo prepatente es variable pero corto; además, de que el pico de la parasitemia ocurre entre la 1° y 2° semana post-infección (Grewal, 1969; Hoare, 1972; D'Alessandro, 1976; D'Alessandro y Saravia, 1999). Los resultados obtenidos en este estudio respaldan estas afirmaciones, ya que los parásitos se detectaron en sangre entre las 24 y 72 horas y aumentaron a la 2° semana de infección.

Por otro lado, en la literatura se reporta un rango de infección completa en ratones inoculados con cultivo de entre el 11 y el 92%, sin embargo, nuestros resultados reflejan un rango de infección alto para la cepa JMZ16 (KP1-) del 87% y del 80% y para la cepa EV26 (KP1+) un rango moderado de 60% y 53% para ratones Swiss y Balb-C respectivamente. Estos resultados sugieren que la cepa EV26 (KP1+) podría perder con mayor rapidez su capacidad de infección al mantenerla en cultivo, por un periodo moderado, mientras que la cepa JMZ16 (KP1-) logra, quizás, mantener su virulencia aún luego de tres meses de mantenimiento no cíclico en laboratorio.

Así mismo, al analizar estadísticamente la susceptibilidad de ambas razas de ratones usadas en este estudio, se pudo determinar que no presentan una diferencia significativa para ninguna de las dos cepas de *T. rangeli*; esto indica que ambas razas de ratones fueron igualmente susceptibles a la infección por cada cepa utilizada.

Al comparar la infección con cepas de *T. rangeli* recién aisladas con la infección usando cepas mantenidas por largo tiempo en cultivo, se demuestra que el mantenimiento cíclico de cepas *T. rangeli* es más eficiente para que estos parásitos no pierdan sus características biológicas, entre ellas, su capacidad de infección.

Vallejo et al., (1986), demostraron que una cepa colombiana de *T. rangeli* mantenida a través de pasajes semanales durante 14 meses, perdió la capacidad de infectar ratones luego de 10 meses de mantenimiento en cultivo, mientras que la misma cepa mantenida cíclicamente durante 3 años, conservó su infectividad y siempre produjo tripomastigotos infectantes en glándulas salivales de *Rhodnius prolixus* y evidentes parasitemias en ratones inoculados.

Esto permite demostrar, que al usar las cepas recién aisladas, se garantiza una infección, que aunque sea baja, refleja datos importantes sobre el curso de la parasitemia en el hospedero vertebrado.

Por otro lado, al analizar la morfometría de ambas cepas de *T. rangeli*, se determinó que existe una diferencia en la longitud total de los parásitos y al analizarla estadísticamente, se obtuvo una diferencia significativa, tanto en el tamaño como en el índice extremo posterior al núcleo/núcleo al extremo anterior (PN/NA). Estos resultados concuerdan con lo expuesto por Vallejo (2007), quien afirma que cepas de *T. rangeli* aisladas de diferentes especies de *Rhodnius* e inoculadas en ratones, muestran cierto grado de pleomorfismo, lo cual plantea interrogantes sobre la sistemática y la taxonomía de los flagelados.

CONCLUSIONES

El crecimiento de cepas de *T. rangeli* de genotipos diferentes, en medios de cultivo monofásicos, demostró que ambas cepas no logran crecer en medio de Warren sin SFB, pero que con la adición de SFB crecen de forma muy similar a la del medio LIT con SFB.

Ambas cepas de *T. rangeli* fueron incapaces de infectar células VERO, aunque se usaron cepas mantenidas en laboratorio por más de dos años y cepas de reciente aislamiento, pero en ningún caso se observaron formas intracelulares del parásito.

Los resultados de infecciones en siete especies de insectos triatóminos, con ambas cepas, demostraron que la cepa KP1- logró completar su ciclo de vida en la especie *R. pallescens* y no en *R. prolixus*, mientras que la cepa KP1+ completó su ciclo tanto en *R. pallescens* como en *R. prolixus*, lo cual es la primera vez que se observa en relación con *R. pallescens*.

Ambas cepas de *T. rangeli* lograron infectar la hemolinfa de *T. lecticularia* y *T. bruneri* (esta última infectada por primera vez), dando parasitemias muy altas, pero no fueron capaces de completar el ciclo biológico; la cepa KP1+ logró infectar *T. infestans* pero la parasitemia fue transitoria mientras que la cepa KP1- no fue capaz de hacerlo.

Las infecciones en ratones, demostraron que las cepas mantenidas en laboratorio por más de dos años, pierden la capacidad de virulencia; mientras que cepas de reciente aislamiento logran infectar ratones y dan parasitemias moderadas durante más de un mes, lo que demuestra que el mantenimiento cíclico en insectos de cepas de *T. rangeli* es eficiente para que los parásitos no pierdan su capacidad de infectar vertebrados.

El estudio morfométrico determina que ambas cepas son estadísticamente diferentes en cuanto a su longitud total y el índice PN/NA, lo que podría ser usado como criterio de diferenciación entre cepas KP1- y KP1+

Los estudios *in vitro* e *in vivo* demuestran claras diferencias entre KP1- y KP1+ y algunas características biológicas esperadas para cada cepa fueron opuestas.

RECOMENDACIONES

- Dado que la cepa KP1+ logró completar su ciclo biológico en *R. pallescens*, se deben llevar a cabo más infecciones experimentales para confirmar la posible capacidad de esta cepa, para establecerse en las glándulas salivales de este insecto.
- Para confirmar lo anterior sería importante tipificar el genotipo (KP1- ó KP1+) directamente en las formas que se encuentran en las glándulas salivales.
- Se deben realizar mayores estudios comparativos con otras cepas de *T. rangeli* de genotipos diferentes, para establecer diferencias biológicas entre ellas.
- Se deben realizar estudios morfométricos con más cepas KP1- y KP1+, ya que este estudio reflejó que existen diferencias significativas (lo cual debe ser confirmado) en cuanto a las características morfológicas de ambas cepas del parásito.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Amino, R; Martins, M.R; Procopio, J; Hirata, I.Y, Juliano, M.A y Schenkman, S. 2002 Tryalisin, a novel pore-forming protein from saliva of hematophagous insects activated by limited proteolysis. J. Biol. Chem. 277: 6207-6213

Añez, N. 1981. Studies on *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920. I. Deposition, migration and growth of *T. rangeli* in two mammals. Parasitol Topics, a presentation volume to Profesor P.C.C Garnham. Special publication of the Society of Protozoologists, Kansas, USA. Allen Press, pp. 19-25

Añez, N. 1982a. Studies on *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920. IV. A reconsideration of its systematic position. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 77: 405-415.

Añez, N. 1982b. Studies on *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920. III. Direct transmission of *Trypanosoma rangeli* between triatomine bugs. Ann. Trop. Med. Parasitol. 76: 641-647

Añez, N. 1983a. Studies on *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920. V. Developmental pattern in the alimentary canal of *Rhodnius prolixus*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 78: 183-191

Añez, N. 1983b. Studies on *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920. VI. Developmental pattern in the haemolymph of *Rhodnius prolixus*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 78: 413-419

Añez, N. 1984. Studies on *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920. VII. Its effect on the survival of infected triatomine bugs. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 74: 249-255

Añez, N & East, J. S. 1984. Studies on *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920. II. Its effect on feeding behaviour of triatomine bugs. Acta Trop. 41: 93-95

Añez, N; Velandia, J y Rodríguez, M. 1985. Estudios sobre *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920. VIII. Respuesta a las reinfecciones en dos mamíferos. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 80: 149-153.

Añez, N; Nieves, E y Cazorla, D. 1987. Studies on *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920. IX. Course of infection in different stages of *Rhodnius prolixus*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 82: 1-6.

Azambuja, P y García, E. 2005. *Trypanosoma rangeli* interactions within the vector *Rhodnius prolixus*- A mini review. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 100: 567-572

Basseri, H.R; Tew, I.F y Ratcliffe N .A. 2002. Identification and distribution of carbohydrate moieties on the salivary glands of *Rhodnius prolixus* and their possible involvement in attachment/invasion by *Trypanosoma rangeli*. Exp. Parasitol. 100: 226-234

Boulanger, N; Bulet, P y Lowenberger, C. 2006. Antimicrobial peptides in the interactions between insects and flagellate parasites. Trends. Parasitol. 22: 262-268

Coura, J.R; Fernández, O; Arboleda, M; Barret, T.V; Carrara, N; Degrave, W y Campbell, D.A. 1996. Human infection by *Trypanosoma rangeli* in the Brazilian Amazon. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 90: 278-279

Chagas, C. 1909. Nova tripanozomíaze humana. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 1: 159-218

D' Alessandro, A. 1963. The life cycle of *Trypanosoma rangeli* in triatomid bugs as it occurs in nature. Bull. Tulane Univ. Med. Fac. 23:21-30

D' Alessandro, A. 1972. New experimental vectors of Colombian *Trypanosoma rangeli*. J. Med. Ent. 9: 187-195

D' Alessandro, A. 1976. Biology of *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli* Tejera, 1920. In: Lumsden W y Evans, D A. (Eds.). Biology of the Kinetoplastida. 1: 328-403, Academic Press Inc, London.

D' Alessandro, A y Saravia, N. 1992. *Trypanosoma rangeli*. Parasitic protozoa, 2nd edition, 2: 1-54, Academic Press, Inc. San Diego, California.

D' Alessandro, A y Saravia, N. 1999. *Trypanosoma rangeli*. In: Protozoal Diseases, H, M. Gilles (ed.), pp.398-412., Oxford University Press Inc. New York.

Deane, LM. 1958a. Encontro de tripanosoma do tipo rangeli em gambas da espécie *Didelphis marsupialis marsupialis*, no Estado do Pará. Rev. Brasil. Malariol. D. Trop. 10: 451-458

Deane, LM. 1958 b. Novo hospedeiro de tripanosomas dos tipos cruzi e rangeli encontrado no Estado de Pará: o marsupial *Metachirops opossum opossum*. Rev. Brasil. Malariol. D. Trop. 10: 531-541

De León, J.R. 1949. El *Trypanosoma rangeli* observado en seres humanos en Guatemala. Publicaciones del Instituto de Investigación de Ciencias Biológicas (Guatemala). 3: 1-34

De León, J.R. 1959. Estado actual de la enfermedad de Chagas en Guatemala. Resumen epidemiológico. Rev. Goiania. Med. 5: 445-455

de Oliveira, M.A y de Souza, W. 2001. An electron microscopic study of penetration by *Trypanosoma rangeli* into midgut cells of *Rhodnius prolixus*. J. Inv. Pathol. 77: 22-26

de Oliveira, M.A y de Souza, W. 2003. Further morphological studies on the behavior of *Trypanosoma rangeli* in the hemocytes of *Rhodnius prolixus*. Parasitol. Inte. 52: 299-307

de Stefani Marquez, D; Rodríguez-Ottaiano C; Oliveira, R.M; Pedrosa, A.L; Cabrine-Santos, M; Lages-Silva, E y Ramírez, L.E. 2006. Susceptibility of different triatominae species to *Trypanosoma rangeli* experimental infection. *Vect. Borne Zoonot. Dis.* 6: 50-56

Dias F.B.S; Diotaiuti, L; Romanha, A.J; Bezerra, C.M; Marques de Meneses Machado, E. 2007. First report on the occurrence of *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920 in the state of Ceará, Brazil, in naturally infected triatomine *Rhodnius nasutus* Stal, 1859 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 102: 643-645

Eger- Mangrich, I, Oliveira, M. A, Grisard, E.C, De Souza, W y Steindel, M. 2001. Interaction of *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920 with different cell lines *in vitro*. *Parasitol. Res.* 87: 505-509

Ellis, DS, Evans, DA y Stanford, S. 1980. The penetration of the salivary glands of *Rhodnius prolixus* by *Trypanosoma rangeli*. *Z. Parasitenk.* 62: 63-74

Gómez, I. 1967. Nuevas observaciones acerca de la acción patógena del *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920 sobre *Rhodnius prolixus* Stal, 1859. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.* 9: 5-10

Gómez, S.A.O, Feder, D, Thomas, N.E.S, García, E.S y Azambuja, P. 1999. *Rhodnius prolixus* infected with *Trypanosoma rangeli*: *In vivo* and *In vitro* experiments. *J. Inv. Pathol.* 73: 289-293

Grewal, M.S. 1969. Studies on *Trypanosoma rangeli*, a South American human trypanosome. *Res. Bull. Punjab Univ.* 20: 449-486

Grisard, E.C, Campbell, D.A y Romanha, A. J. 1998. Mini-exon gene sequence polymorphism among *Trypanosoma rangeli* isolated from distinct geographical regions. *Parasitology.* 118: 375-382

Grisard, E.C, Steindel, M, Guarneri, A.A, Eger-Mangrich, I, Campbell, D.A y Romanha, A.J. 1999. Characterization of *Trypanosoma rangeli* strains isolated in Central and South America: an overview. 94: 203-209

Groot, H. 1953. Comportamiento del *Trypanosoma ariarii* en el *Rhodnius prolixus*. II Localización en las glándulas salivales. Mem 1º Congr. Interam. Hig, La Habana pp: 729-734

Groot, H; Renjifo, S y Uribe, C. 1951. *Trypanosoma ariarii*, n. sp, from man, found in Colombia. Am. J. Trop. Med. 31: 673-691

Groot, H, Osorno, E y Escobar, S. 1953. Comportamiento del *Trypanosoma ariarii* en el *Rhodnius prolixus*. I Localización en la hemolinfa. Mem 1º Congr. Interam. Hig, La Habana pp: 720-728

Groot, H y San Martín, C. 1953. Comportamiento del *Trypanosoma ariarii* en el *Rhodnius prolixus*. III Nota preliminar sobre su aspecto morfológico en la hemolinfa y en las glándulas salivales. Mem 1º Congr. Interam. Hig, La Habana pp: 734-745

Guhl, F y Vallejo, G. A. 2003. *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli* Tejera, 1920 an update review. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 98: 435-442

Guhl, F; Jaramillo, C; Carranza, J. C y Vallejo, G. A. 2002. Molecular characterization and diagnosis of *Trypanosoma cruzi* and *T. rangeli*. Arch. Med. Res. 33: 362-370

Hoare, C.A. 1972. The Trypanosomes of Mammals: A Zoological Monograph, 314 pp., Blackwell, Oxford.

Koerich, L.B; Emmanuel-Machado, P; Santos, K; Grisard, E.C y Steindel, M. 2002. Differentiation of *Trypanosoma rangeli*: high production of infective trypomastigote forms in vitro. Parasitol. Res. 88: 21-25

López, L; Morales, G; Ursic, R; Wolff, M; Lowenberger, C. 2003. Isolation and characterization of a novel insect defensin from *Rhodnius prolixus*, a vector of Chagas disease. Ins. Bioch. Mol. Biol. 33: 439-447

Maia Da Silva, F; Rodrigues, A.C; Campaner, M; Takata, C.S.A, Brigido, M.C; Junqueira, A.C.V; Coura, J.R; Takeda, G.F; Shaw, J.J y Teixeira, M.M.G. 2004. Randomly amplified polymorphic DNA analysis of *Trypanosoma rangeli* and allied species from human, monkeys and other sylvatic mammals of the Brazilian Amazon disclosed a new group and a species-specific marker. Parasitology. 128: 283-294

Maia Da Silva, F; Junqueira, A.C.V; Campaner, M; Rodrigues, A.C; Crisante, G; Ramirez, L.E; Caballero, C.E; Monteiro, F.A; Coura, J.R; Añez, N y Texeira, M.M.G. 2007. Comparative phylogeography of *Trypanosoma rangeli* and *Rhodnius* (Hemiptera: Reduviidae) supports a long coexistence of parasite lineages and their sympatric vectors. Mol. Ecol. 16: 3361-3373

Macedo, MM; Vallejo, GA; Chiari, E y Pena, SDJ. 1993. DNA fingerprinting reveals relationships between strains of *Trypanosoma rangeli* and *Trypanosoma cruzi*. In: Pena, SDJ., Chakraborty, R., Eppelen, JT., Jeffreys, AJ. (Eds.). DNA Fingerprinting: State of the Science. Birkhauser Verlag. Basel, Switzerland, pp 321-329.

Machado, P.E, Eger-Mangrich, I; Rosa, G; Koerich, L.B; Grisard, E.C y Steindel, M. 2001. Differential susceptibility of triatomines of the genus *Rhodnius* to *Trypanosoma rangeli* strains from different geographical origins. Intl. J. Parasitol. 31: 632-634

Marinkelle, C. J. 1968. *Triatoma dimidiata capitata*, a natural vector of *Trypanosoma rangeli* in Colombia. Rev. Biol. Trop. 15: 203-205

Meirelles, R.M.S, Henriques-Pons, A, Soares, M.J y Steindel, M. 2005. Penetration of the salivary glands of *Rhodnius domesticus* Neiva & Pinto, 1923 (Hemiptera: Reduviidae) by *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920 (Protozoa: Kinetoplastida) Parasitol. Res. 97: 259-269

Mello, C.B, García, E.S, Ratcliffe, N.A y Azambuja, P. 1995. *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*: Interplay with hemolymph components of *Rhodnius prolixus*. J. Inv. Pathol. 65: 261-268

Mello, C.B; García, E.S; Ratcliffe, N.A y Azambuja, P. 1995. *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*: Interplay with hemolymph components of *Rhodnius prolixus*. J. Inv. Pathol. 65: 261-268

Miles, M.A; Arias, J.R; Valente, A.S; Naiff, R.D; De Souza, A.A; Povoá, M.M; Lima, J. A. N y Cedillos, R. A. 1983. Vertebrate hosts and vectors of *Trypanosoma rangeli* in the Amazon Basin of Brasil. Ann. Trop. Med. Hyg. 32: 1251-1259

Minter-Goedbloed, E y Santos Oliveira, M.L. 1976. Growth characteristics of *Trypanosoma rangeli*. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 70: 89

Ormerod, W.E. 1967. The effect of *Trypanosoma rangeli* on the concentration of amino acids in the hemolymph of *Rhodnius prolixus*. J. Inv. Pathol. 9: 247-255

Osorio, Y. Travi, B.L. Palma, G.I y Saravia, N.G. 1995. Infectivity of *Trypanosoma rangeli* in a promonocytic mammalian cell line. J. Parasitol. 8: 687-693

Recinos, R.F; Kirchhoff, L.V y Donelson, J.E. 1994. Characterization of kinetoplast DNA minicircles in *Trypanosoma rangeli*. Mol. Bioch. Parasitol. 63: 59-67

Ribeiro, J.M; Schneider, M; Isaias, I; Jurberg, J; Galvao, C y Guimaraes, J.A. 1998. Role of salivary antihemostatic components in blood feeding by triatomine bugs (*Heteroptera*). J. Med. Entomol. 35: 559-613

Soares, R.P.P; Montijo,N.J; Romanha, A. J; Diotaiuti, L y Pereira, M.H. 1998. Salivary heme proteins distinguish *Rhodnius prolixus* from *Rhodnius robustus* (*Hemiptera: Reduviidae: Triatominae*). Acta Trop. 71: 285-291

Sousa, O. E y Johnson, C.M. 1971. Frequency and distribution of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* in the Republic of Panamá. Am. J. Trop. Med. Hyg. 20: 405-410

Sousa, O. E; Rossan, R.N y Baerg, D.C. 1974. The prevalence of trypanosomes and microfilariae in Panamanian monkeys. Am. J. Trop. Med. Hyg. 23: 862-868

Takle, G.B; Young, A. 1988. A simple semi-defined culture medium for the growth of *Trypanosoma rangeli*. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 82: 247

Tanoura, K; Yanagi, T; Matta de García, V y Kambara, H. 1999. *Trypanosoma rangeli*-In vitro metacyclogenesis and fate of metacyclic trypomastigotes alter to mice and fibroblast cultures. J. Euk. Microbiol. 46: 43-48

Tejera, E. 1920. Un nouveau flagelle de *Rhodnius prolixus*, *Trypanosoma* (ou *Crithidia*) *rangeli* n.sp. Bull. Soc. Pathol. Exot. 527-530

Tejero, F; Galli, N y Urdaneta-Morales, S. 1988. *Trypanosoma* (*Herpetosoma*) *rangeli* Tejera, 1920: Influence of host weight, size of inoculum, and route of infection upon experimental parasitemia. Rev. Soc. B. Med. Trop. 21: 135-138

Tobie, E.J. 1964. Increased infectivity of a cyclically maintained strain of *Trypanosoma rangeli* to *Rhodnius prolixus* and mode of transmission by invertebrate host. J. Parasitol. 50: 593-598

Tobie, E. J. 1970. Observations on the development of *Trypanosoma rangeli* in the hemocoel of *Rhodnius prolixus*. J. Inv. Pathol. 15: 118-125

Urdaneta-Morales, S y Tejero, F. 1985. *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli* Tejera, 1920: Mouse model for high, sustained parasitemia. J. Parasit. 7: 409-414

Urrea, D.A; Carranza, J.C; Cuba-Cuba, C.A; Gurgel-Gonçalves, R; Guhl, F; Schofield, C.J; Triana, O y Vallejo, G.A. 2004. Molecular characterisation of *Trypanosoma rangeli* strains isolated from *Rhodnius ecuadoriensis* in Peru, *R. colombiensis* in Colombia and *R. pallescens* in Panama, supports a co-evolutionary association between parasites and vectors. Infec. Gen. Evol. 5: 123-129

Vallejo, G.A. 2007. Relación *Trypanosoma rangeli*-Triatómino: Aspectos epidemiológicos y taxonómicos. XVIII Congreso Latinoamericano de Parasitología. Isla Margarita, Venezuela, Octubre. Bol. Malariol. Sal. Amb. 47: 91-92

Vallejo, G. A; Marinkelle, C. J.; Guhl, F y Sanchez. 1986. Mantenimiento en el laboratorio de *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli* Tejera, 1920. Rev. Biol. Trop. 34:75-81.

Vallejo, G.A; Macedo, A.M; Chiari, E y Pena, S.D.J. 1994. Kinetoplast DNA from *Trypanosoma rangeli* contains two distinct classes of minicircles with different size and molecular organization. Mol. Bioch. Parasitol. 67: 245-253

Vallejo, G.A; Guhl, F; Chiari, E; Macedo, A. 1999. Species specific detection of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* in vector and mammalian hosts by polymerase chain reaction amplification of kinetoplast minicircle DNA. Acta Trop. 72 : 203-212.

Vallejo, G.A; Guhl F; Carranza J.C; Lozano L.E; Sánchez J.L; Jaramillo J.C, Galtero D; Castañeda N; Silva J.C y Steindel M. 2002. kDNA markers define two major *Trypanosoma rangeli* lineages in Latin-America. Acta Trop. 81: 77-82

Vallejo, GA; Guhl, F; Carranza, J.C; Moreno, J; Triana, O & Grisard, E.C. 2003. Parity between kinetoplast DNA and mini-exon gene sequences supports either clonal evolution or speciation in *Trypanosoma rangeli* strains isolated from *Rhodnius colombiensis*, *R. pallescens* and *R. prolixus* in Colombia. *Infect. Genet. Evol.* 3: 39-45

Vizioli, J y Salzet, M. 2002. Antimicrobial peptides versus parasitic infections?. *Trends Parasitol.* 18: 475-476

Warren, L.G. 1957. *In vitro* studies on the metabolism of *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909. Doctoral Dissertation, School of Hygiene and Public Health, The Johns Hopkins University.

Warren, L.G. 1960. Metabolism of *Schizotrypanum cruzi* Chagas. I Effect of culture age and substrate concentration on respiratory rate. *J. Parasitol.* 46: 529-539

Watkins, R. 1971. *Trypanosoma rangeli*: Effect on excretion in *Rhodnius prolixus*. *J. Inv. Pathol.* 17: 67-71

Whitten, M.M; Mello, CB; Gomes, SA; Nigam, Y; Azambuja, P; García, ES y Ratcliffe, NA. 2001. Role of superoxide and reactive nitrogen intermediates in *Rhodnius prolixus* (Reduviidae)/*Trypanosoma rangeli* interactions. *Exp. Parasitol.* 98: 44-57

Zeledón, R. 1954. *Trypanosomiasis rangeli*. *Rev. Biol. Trop.* 2:231-268.

Zeledón, R. 1956. Hallazgo de formas evolutivas de *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1919, en glándulas salivales de *Rhodnius prolixus* Stal, 1859, salvadoreños. *Rev. Biol. Trop.* 4: 1-8

Zeledón, R. 1959. Differentiation of *Trypanosoma rangeli* and *Schizotrypanum cruzi* in a liquid medium, with notes on the nutrition of hemoflagellates. *J. Parasitol.* 45: 652

Zeledón, R. 1965. *Trypanosoma rangeli* en glándulas salivales de *Rhodnius pallescens* de Panamá. Rev. Biol. Trop. 13: 157-159

Zeledón, R. 1970. *Trypanosoma rangeli*, a review. Sect II, Part I 2nd. Intl. Congr. Parasitol. J. Parasitol. 56: 377

Zeledón, R. 1998. Infection of the insect host by *Trypanosoma cruzi*. 7. In: Atlas of Chagas' Disease vectors in the Americas (R.U. Carcavallo, I. Galíndez Girón, J. Jurberg & H. Lent, eds) Editora Fiocruz, Río de Janeiro. 7: 271-287

Zeledón, R y Vieto, P.L. 1958. Comparative study of *Schizotripanum cruzi* Chagas, 1909 and *S. Vespertilionis* (Battaglia, 1904) from Costa Rica. J. Parasitol. 44: 499-502

Zeledón, R; De Monge, E y Pérez, C.L. 1963. Relaciones huésped parásito en *Tripanosomiasis rangeli*. 7th Inter. Congr. Trop. Med. & Malaria,. Río de Janeiro, Brazil. pp. 139

Zeledón, R; De Monge, E; Morúa, E y Blanco, E. 1964. Host-parasite relationships in *rangeli* trypanosomiasis. Proc. 1st. Intl. Congr. Parasitol. Roma. 1964. pp. 334-335

Zeledón, R y Blanco, E. 1965. Relaciones huésped-parásito en *Trypanosomiasis rangeli* I. Infección intestinal y hemolinfática comparativa de *Rhodnius prolixus* y *Triatoma infestans*. Rev Biol Trop. 13: 143-158.

Zeledón, R y Monge, E. 1966. Natural immunity of the bug *Triatoma infestans* to the protozoan *Trypanosoma rangeli*. J Invert Pathol. 8: 420-424