

CAPACIDAD VECTORIAL DE *Rhodnius colombiensis* PARA TRANSMITIR *Trypanosoma cruzi* I y *T. cruzi* II

VECTORIAL CAPACITY OF *Rhodnius colombiensis* TO TRANSMIT *Trypanosoma cruzi* I and *T. cruzi* II

Laura Alejandra Roa Culma¹, Xiomara Alexandra Gaitán¹, Yurani Eresbey Granada², Jairo Alfonso Clavijo³, Marta Teixeira⁴, Marleny Montilla⁵, Gustavo Adolfo Vallejo⁶, Julio César Carranza*⁶.

- ¹. Programa de Biología, Universidad del Tolima. Laboratorio de Investigaciones en Parasitología Tropical. Ibagué, Tolima. Colombia. lauraalroa@hotmail.com, alexag2004@hotmail.com.
- ². Programa de Licenciatura en ciencias Naturales, Universidad del Tolima, Laboratorio de Investigaciones en Parasitología Tropical. Ibagué, Tolima. Colombia. eresbey2@yahoo.com.
- ³. Departamento de Matemáticas y Estadística, Facultad de Ciencias, Universidad del Tolima, Ibagué, Tolima. Colombia. jairo_clavijo@hotmail.com.
- ⁴. Instituto de Ciencias Biomédicas. Universidad de São Paulo, Brasil. mmgteix@icb.usp.br.
- ⁵. Laboratorio de Parasitología, Instituto Nacional de Salud. Bogotá, D.C. Colombia. marlenymm@hotmail.com, mmontilla@ins.gov.co.
- ⁶. Laboratorio de Investigaciones en Parasitología Tropical. Universidad del Tolima. gvallejo@ut.edu.co, jcarranza@ut.edu.co.

Recibido: Agosto 30 de 2013

Aceptado: Septiembre 23 de 2013

*Correspondencia del autor. Laboratorio de Investigaciones en Parasitología Tropical (LIPT), Facultad de Ciencias, Universidad del Tolima, Barrio Santa Helena; Ibagué. Teléfono: 57- (8) 2771212 - ext 9348.

Email: jcarranza@ut.edu.co.

RESUMEN

En infecciones naturales, *Rhodnius colombiensis* presenta altas prevalencias de *Trypanosoma cruzi*, convirtiéndose en un vector importante en la dinámica de transmisión de la enfermedad de Chagas en la región central de Colombia. En el presente trabajo se evaluó la capacidad vectorial del insecto infectado con *T. cruzi* I y *T. cruzi* II, bajo diferentes fuentes de alimentación. Se alimentaron ninfas de tercer y quinto estadio sobre ratones infectados con *T. cruzi* I y *T. cruzi* II. Las ninfas de quinto estadio fueron disectadas cada dos semanas durante diez semanas. Los parásitos de la ampolla rectal fueron coloreados y contados microscópicamente. Las ninfas de tercer estadio fueron realimentadas con diferentes fuentes sanguíneas. La ampolla rectal de los insectos fue disectada y los parásitos contados en cámara de Neubauer. Los resultados mostraron que la parasitosis de *T. cruzi* II se mantuvo en el vector a lo largo de las semanas evaluadas, aun cuando los insectos se mantuvieron en ayuno prolongado. En los insectos realimentados, se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la cantidad de parásitos observados dependiendo de la fuente de alimento, siendo mayor el número de formas en los insectos alimentados con sangre de ratón que aquellos alimentados con sangre de gallina. Además, el número total de tripomastigotes metacíclicos no presentó diferencias estadísticamente significativas entre *T. cruzi* I y *T. cruzi* II. Con esto se concluyó que *R. colombiensis* permite el desarrollo de ambos linajes del parásito.

Palabras claves: *Trypanosoma cruzi*, *Rhodnius colombiensis*, metaciclogénesis

ABSTRACT

In natural infections, *Rhodnius colombiensis* has high prevalences of *Trypanosoma cruzi*, becoming an important vector in the dynamic of transmission of Chagas disease in the central region of Colombia. In this study we evaluated the vectorial ability of insects infected with *T. cruzi* I and *T. cruzi* II, under different source of meals. Nymphs from third and fifth instar were fed on infected mice with *T. cruzi* I and *T. cruzi* II. Fifth instar nymphs were dissected every two weeks, during ten weeks and parasites from rectal ampulla were stained and counted microscopically. Third instar nymphs were fed several times with different sources of blood; the parasites from rectal ampulla were counted in Neubauer camera. The results showed that *T. cruzi* II remained in the vector along the evaluated weeks, even in insects submitted to long fasting. In insects fed several times, we found statistically significant differences in the number of parasites observed depending on the food source, being greater the number of parasites in insects fed with mouse blood than with hen blood. In addition, the total number of metacyclic trypomastigotes showed no statistically significant differences between *T. cruzi* I and *T. cruzi* II. In short, *R. colombiensis* allows developing of both lineages of parasite.

Key words: *Trypanosoma cruzi*, *Rhodnius colombiensis*, metacyclogenesis.

INTRODUCCIÓN

Trypanosoma cruzi es considerado un parásito policlonal, el cual presenta diferentes propiedades biológicas entre sus poblaciones (1, 2). Varios autores han reportado vectores y pacientes infectados al menos con dos clones genéticamente diferentes (3, 4).

La principal fuente de transmisión del parásito es a través de las heces contaminadas de los vectores, las cuales pueden infectar la piel y las mucosas de los hospederos, sin embargo, se han presentado algunos brotes de transmisión por vía oral que involucran como fuente de infección a los alimentos contaminados a partir de deyecciones del triatomino, los cuales invaden las casas atraídos por la luz o para buscar alimento (5). En las investigaciones de transmisión de *T. cruzi* por vía oral no se han identificado las especies de vectores, sin embargo se sospecha que estén involucrados triatominos de origen silvestre.

T. cruzi I y *T. cruzi* II son los dos mayores linajes filogenéticos del parásito distribuidos en el continente americano (6, 7). Tradicionalmente el linaje de Tc I se encuentra circulando principalmente en el ciclo doméstico y silvestre de países de Centroamérica y el norte de Suramérica; por otro lado, el linaje Tc II se asocia con el ciclo doméstico de países del cono sur (Brasil, Argentina y Chile) (8).

A pesar del predominio del linaje Tc II en países del cono sur, se ha reportado la presencia de este linaje en Colombia en vectores domésticos y silvestres, mamíferos silvestres y pacientes chagásicos (9- 12).

También se ha planteado que los vectores pueden actuar como filtros biológicos seleccionando la subpoblación del parásito a transmitir mediante mecanismos específicos como factores inmunes intestinales, enzimas digestivas y factores líticos entre otros (13- 16).

Por otro lado, la capacidad vectorial del insecto puede medirse mediante el estudio de la metaciclógenesis del parásito, la cual puede influir en la transmisión selectiva de las subpoblaciones. Este es un proceso biológico que ocurre en la ampolla rectal del vector donde se da la transformación del estadio epimastigote a tripomastigote metacíclico, que es la forma infectiva para el humano (13). A su vez, ésta se encuentra relacionada con diferentes eventos como la relación coevolutiva parásito-vector ó el estado nutricional del insecto, la fuente de alimentación del vector, entre otros eventos. De acuerdo con esto último, se ha planteado que los factores del complemento de la sangre de las aves ocasiona la muerte de los parásitos en el estómago del vector, lo que no ocurre con la sangre de mamíferos (17).

Aún hace falta conocimiento acerca del desarrollo y transmisión de los diferentes genotipos del parásito por parte de vectores silvestres, como es el caso de *Rhodnius colombiensis* asociado a palmas de vino (*Attalea butyraceae*) en los departamentos de Tolima, Huila, Cundinamarca, Caldas y Boyacá en la región central de Colombia. Esta especie ha adquirido importancia epidemiológica debido a su alta prevalencia de infecciones tanto por *T. cruzi*, como por *T. rangeli*, aún mayores que las mismas especies domiciliadas y a la frecuencia con que este vector invade los domicilios humanos (18, 19).

De acuerdo a lo anterior, en el presente trabajo se es-

tudió el desarrollo de *T. cruzi* I y *T. cruzi* II en *R. colombiensis*, bajo diferentes condiciones de alimentación para lograr ampliar el conocimiento acerca de los mecanismos de desarrollo y transmisión de los distintos linajes del parásito.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron las cepas *T. cruzi* I (MHOM/C0/04/MG) aislada de humano por el Instituto Nacional de Salud de Colombia y *T. cruzi* II (Y) aislada de humano y cedida por el Instituto de Ciencias Biomédicas de la Universidad de São Paulo- Brasil. Estas cepas fueron inoculadas en ratones ICR-CD1 de 21 días de nacidos libres de infección, realizando pases periódicos de ratón a ratón cada 15 días.

Se utilizaron ninfas N3 y N5, procedentes de colonias de *R. colombiensis* establecidas a partir de individuos colectados en el municipio de Coyaima (Tolima). Una vez establecida la parasitemia en los ratones, se realizó una caracterización molecular de los genotipos de las cepas mediante PCR de la región intergénica del gen miniexon siguiendo la metodología de Souto et al. (1996) (20). Este procedimiento fue realizado al comienzo y al final de los experimentos.

Se evaluó la metacicloogénesis *in vivo* de *T. cruzi* I y *T. cruzi* II en insectos mantenidos en ayuno, para lo cual se utilizaron 30 ninfas de quinto estadio de *R. colombiensis* libres de infección y mantenidas en ayuno durante 20 días. Las ninfas se alimentaron sobre ratones infectados con *T. cruzi* I y Tc II.

Con el fin de determinar el número de parásitos ingeridos por cada insecto, antes del experimento se realizó un conteo en cámara de Neubauer de tripomastigotes sanguíneos, además las ninfas fueron pesadas antes y después de la alimentación sobre ratones infectados.

La ampolla rectal de los insectos infectados fue disecada en las semanas 2, 4, 6, 8 y 10. Cada ampolla rectal fue homogenizada y lavada a 6000 rpm durante 5 minutos. Finalmente, cada muestra se resuspendió en 100µl de solución salina y se realizó un extendido en placas portaobjeto con 40µl de homogenizado por placa.

Las placas fueron fijadas con metanol y coloreadas con Giemsa (May-Grunwald-Giemsa) por 40 minutos, luego fueron lavadas con agua y secadas a temperatura ambiente. El colorante Giemsa (MERCK) debió ser filtrado y diluido 1:10 con buffer PBS.

Posteriormente, se hizo observación microscópica directa de 200 campos por placa coloreada con el fin de determinar el número de parásitos y estadio en la ampolla rectal del insecto durante las semanas evaluadas. Para el estudio de la metacicloogénesis *in vivo* en insectos realimentados, se utilizaron 168 ninfas de tercer estadio de *R. colombiensis* libres de infección y mantenidas en ayuno por 20 días. Se organizaron dos grupos de 84 ninfas cada uno. El grupo A fue alimentado sobre ratones infectados con *T. cruzi* I. El grupo B fue alimentado sobre ratones infectados con *T. cruzi* II. 42 ninfas del grupo A y 42 del grupo B fueron realimentadas sobre gallinas cada 20 días hasta alcanzar el cuarto estadio, las 42 ninfas restantes de cada grupo fueron realimentadas sobre ratones libres de infección, hasta alcanzar el cuarto estadio.

Luego de 60 días de reposo, sin alimento, de los grupos A y B se extrajeron 35 ninfas realimentadas sobre gallinas y un número igual de ninfas realimentadas sobre ratón; se realimentaron una vez más con la misma fuente de alimento. De cada grupo, A y B se dejaron 7 sin realimentar.

Del grupo A y B, se realizaron 10 subgrupos de 7 ninfas cada uno, diferenciando los 5 grupos realimentados sobre gallina y los 5 realimentados sobre ratón. Cada subgrupo fue disectado a los días 2, 4, 6, 8, 10 respectivamente, posterior a la última realimentación. Paralelamente, las 14 ninfas restantes de las primeras infecciones, del grupo A y del grupo B, se disectaron al día siguiente al ayuno de 60 días.

Durante la disección, se extrajo la ampolla rectal de cada uno de los insectos durante los días mencionados. Cada ampolla rectal se homogenizó en 100 µl de solución salina 0.9% y se realizó conteo en cámara de Neubauer, calculando el número de parásitos por mililitro, diferenciándolos en epimastigotes o tripomastigotes metacíclicos.

Para establecer si hay paralelismo o coincidencia entre los perfiles de los estadios morfológicos del *T. cruzi* durante el experimento, se realizó un diseño estadístico de análisis de perfiles para dos muestras utilizando ESM-plus versión 8.2. Además, se realizó una T-Student para muestras independientes con el fin de encontrar el nivel de significancia entre muestras.

RESULTADOS

De acuerdo con la caracterización molecular se observó un producto de amplificación de 350 pb obtenido a partir de ADN extraído de las cepas de *T. cruzi* I (MHOM/C0/04/MG) y otro de 300 pb, el cual fue obtenido de la cepa *T. cruzi* II (Y). Adicionalmente, los genotipos TcI y TcII fueron verificados por PCR-RFLP del ITS1 (26).

En cuanto a los resultados del estudio de la metaciclo-génesis del linaje Tc II en insectos bajo condiciones de ayuno, este genotipo logra desarrollarse en el vector *R. colombiensis*. De acuerdo al análisis de perfiles para dos muestras al comparar el estadio epimastigote y tripomastigote metacíclico de Tc II obtenidos a partir de ampolla rectal de *R. colombiensis* durante las semanas 2, 4, 6, 8, 10 post-infección, según la prueba T² de Hotelling para dos muestras independientes, se obtuvo un

valor $p=0.14633000$, lo que nos indica que los perfiles de ambos estadios son paralelos, presentando un comportamiento uniforme. Por otro lado la prueba T-Student que evalúa la coincidencia de los perfiles, presentó un valor $p=0.57430000$, indicando que los perfiles de los dos estadios son coincidentes, sugiriendo similitudes en su desarrollo.

Al comparar estos resultados con los obtenidos por (Granada, Y., 2012. Metaciclo-génesis de una cepa de *Trypanosoma cruzi* I en *Rhodnius prolixus* Silvestre, *Rhodnius prolixus* doméstico y *Rhodnius colombiensis* de Colombia (Tesis, Pregrado Biología), Universidad del Tolima. Ibagué), quien infectó esta misma especie de vector con el linaje Tc I, se observan diferencias significativas con un valor $p= 0.0001$, siendo mayor la cantidad de formas pertenecientes al genotipo TcI comparado con Tc II (Figura 1).

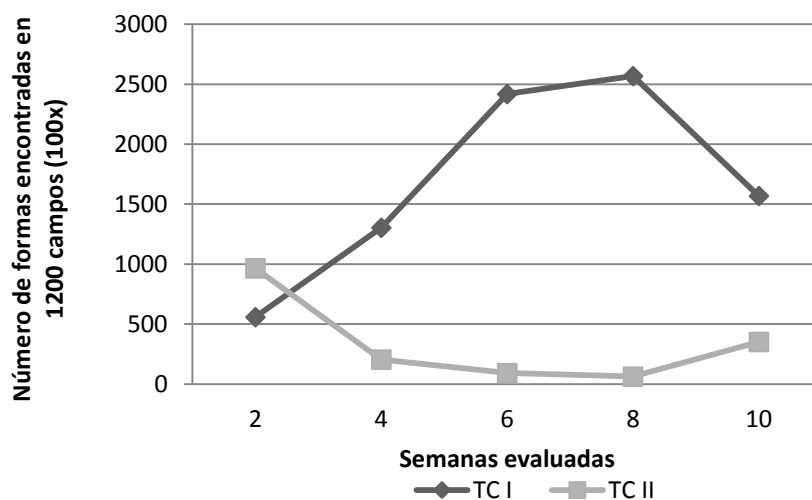


Figura 1. Comparación del total de formas de *T. cruzi* I y *T. cruzi* II en ampolla rectal de *R. colombiensis*

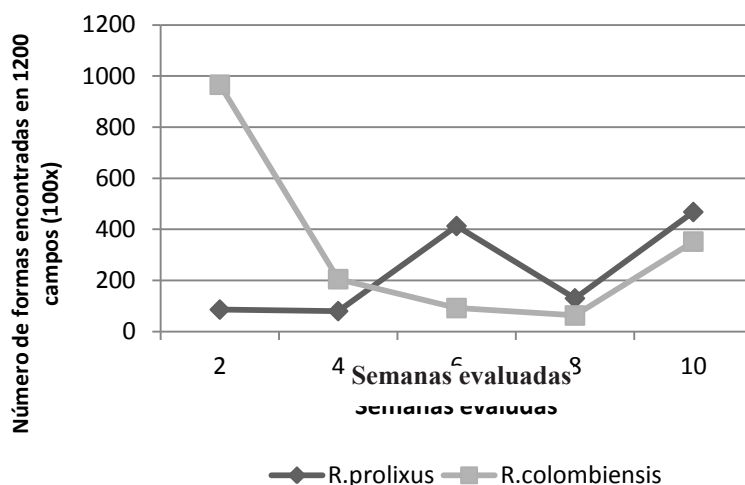


Figura 2. Comparación del total de formas de *T. cruzi* II en ampolla rectal de *R. colombiensis* y *R. prolixus*

De igual forma, comparando el desarrollo del genotipo TcII se observó que entre *Rhodnius prolixus* y *R. colombiensis*, no se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas ($p=0,4665$) en el total de formas encontradas en ampolla rectal, durante un periodo de ayuno de 10 semanas (Figura 2) (Gaitán, X., 2013. Estudio de la metacicloogénesis *in vivo* de TcI y TcII en *Rhodnius prolixus* (domiciliado) bajo condiciones de ayuno prolongado y realimentación. (Tesis, Pregrado Biología), Universidad del Tolima. Ibagué).

Por otra parte, los resultados del estudio de la metacicloogénesis de *T. cruzi I* y *T. cruzi II* en insectos realimentados con sangre de gallina y sangre de ratón; al comparar el total de formas del genotipo TcI en insectos

realimentados con sangre de gallina y sangre de ratón, de acuerdo con la prueba T-Student, el valor $p=0,0355$ nos indica que hay diferencias estadísticamente significativas según la fuente de alimentación para insectos infectados con este genotipo, siendo mayor en los insectos realimentados con sangre de ratón (Figura 3).

De acuerdo a la prueba T-Student, comparando el total de formas del genotipo TcII en insectos realimentados con diferentes fuentes sanguíneas se obtuvo un valor $p=0,1260$, indicando que no hay diferencias estadísticamente significativas según la fuente de alimentación con sangre de gallina o sangre de ratón en insectos infectados con el genotipo TcII (Figura 4).

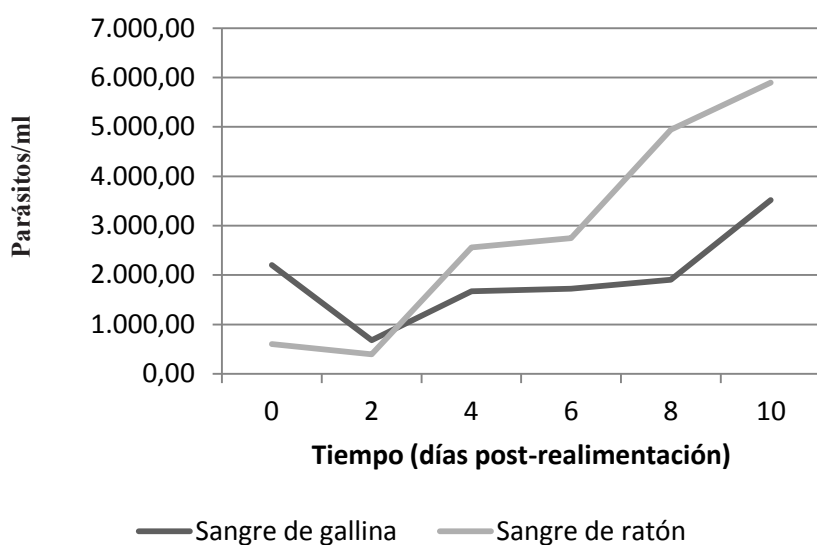


Figura 3. Comparación del promedio de formas del genotipo TcI de insectos realimentados con sangre de gallina y sangre de ratón.

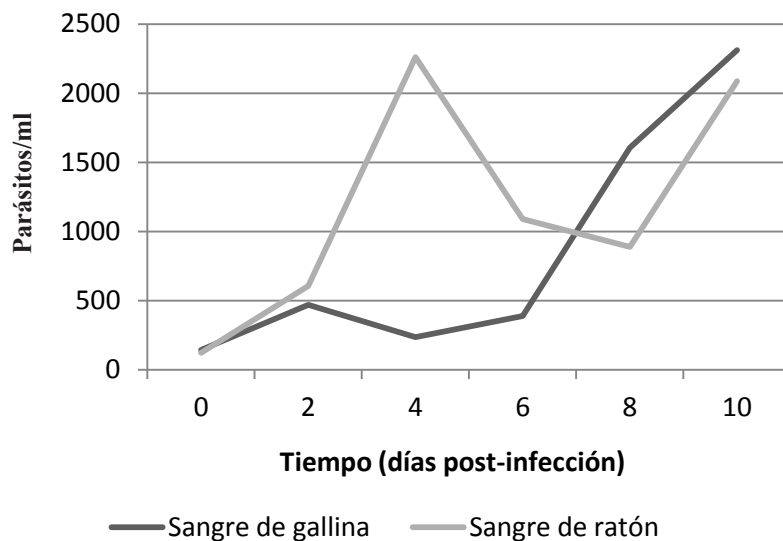


Figura 4. Comparación del promedio de formas del genotipo TcII de insectos realimentados con sangre de gallina y sangre de ratón

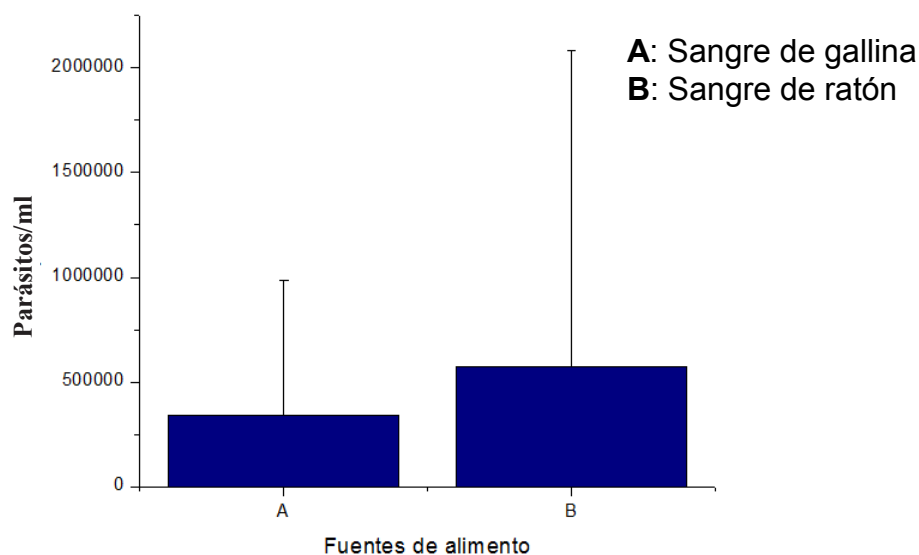


Figura 5. Comparación de formas totales encontradas en insectos realimentados con sangre de gallina y sangre de ratón.

Al comparar las medias del total de formas encontradas, tanto del linaje Tc I como Tc II, se encontraron diferencias estadísticamente significativas con un $p=0.0099067695$ con respecto a la fuente de alimentación proporcionada a los insectos, ya que se encontró mayor número de parásitos en aquellos insectos cuya fuente de alimentación era sangre de ratón, comparado con los insectos realimentados con sangre de gallina (Figura 5).

Al comparar el estadio tripomastigote metacíclico de los genotipos Tc I y Tc II encontrados en ampolla rectal de *R. colombiensis* realimentados con sangre de gallina y sangre de ratón, según la prueba T-Student nos indica que no existe diferencia estadísticamente significativa

entre los linajes obtenidos de ampolla rectal de *R. colombiensis* independientemente de la fuente de realimentación (Figura 6).

DISCUSIÓN

A pesar de lo reportado por algunos autores de la inhabilidad tanto de clones como de la cepa parental de Tc II, para infectar experimentalmente especies del género *Rhodnius* (9), en el presente trabajo se obtuvo de forma efectiva el desarrollo de este genotipo del parásito en la especie *R. colombiensis*, resaltando que los experimentos se realizaron bajo condiciones naturales de infección de los insectos, alimentados sobre mamíferos infectados. De acuerdo con lo anterior, esta especie ha

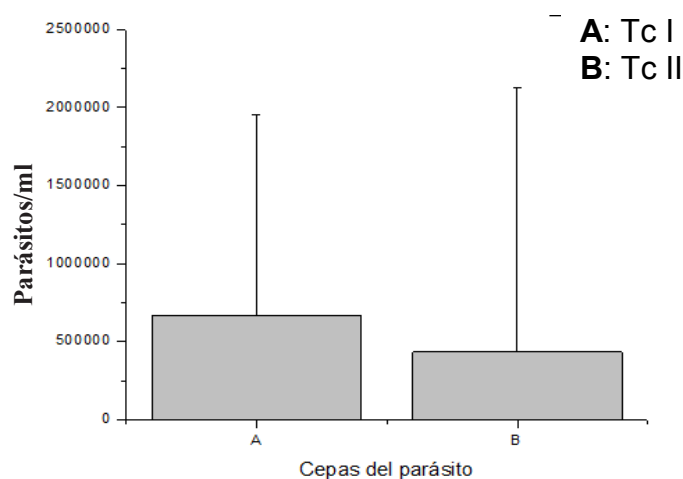


Figura 6. Comparación de la forma tripomastigote del linaje Tc I y Tc II encontrados en *R. colombiensis* realimentados tanto con sangre de gallina, como de ratón.

sido reportada infectada naturalmente con ambos genotipos del parásito TcI y TcII, destacándose un predominio del linaje TcI en las muestras analizadas (21).

Lo anterior se confirmó al comparar el desarrollo de los genotipos TcI y TcII en *R. colombiensis*, donde se obtuvo diferencias estadísticamente significativas observándose una mayor cantidad de formas pertenecientes al genotipo TcI (Granada, Y., 2012. Metaciclologénesis de una cepa de *Trypanosoma cruzi* I en *Rhodnius prolixus* Silvestre, *Rhodnius prolixus* doméstico y *Rhodnius colombiensis* de Colombia (Tesis, Pregrado Biología), Universidad del Tolima. Ibagué). Lo que podría estar influenciado por la acción de diferentes factores inmunológicos presentes en el vector (22).

Varios autores han reportado la capacidad de supervivencia y desarrollo del parásito en insectos en periodo de ayuno. Kollien y Schaub (1998) (23), reportaron que los insectos murieron de hambre después de 200 días de su última alimentación, presentando flagelados vivos en el recto. En el presente trabajo se estudió el desarrollo del parásito hasta el día 70, sin mortalidad de los insectos, demostrando que *R. colombiensis* puede permanecer bajo condiciones de inanición y permitir a su vez el desarrollo del parásito, lo que implicaría mayores posibilidades de la transmisión del mismo a sus futuros hospedadores.

Según Schaub (1989) (24), la metaciclologénesis comienza durante las semanas uno y dos después de colonizar el recto y los porcentajes aumentan con prolongados periodos de infección. En el presente trabajo, evaluando la infección con el linaje Tc II sobre insectos bajo condiciones de ayuno, se observa a partir de la semana dos, presencia de tripomastigotes metacíclicos hasta la décima semana evaluada, observando durante las primeras semanas un descenso en la cantidad de formas hasta la semana seis donde comienzan a aumentar. A pesar de que se observan estas diferencias en el transcurso de la parasitosis del vector, estas no son significativas, demostrando que las cantidades del parásito no varían estadísticamente a lo largo del tiempo. Esto podría ocurrir debido a que existe una tendencia en la estabilización numérica en la población de flagelados a lo largo del tracto intestinal de los triatomíneos, ya sea por disponibilidad de nutrientes, de espacio en el intestino o cuando las poblaciones de *T. cruzi* se adaptan al vector (25).

Por otro lado, basándonos en lo propuesto por diferentes autores, en relación con el estado nutricional de los in-

sectos, éste puede afectar el desarrollo del parásito. En el presente estudio utilizando insectos infectados y realimentados, se observó que con el transcurrir del tiempo el número de parásitos en el recto fue aumentando gradualmente, casi cuatro veces la densidad poblacional en el día 10. Esto puede deberse a una modificación drástica de las condiciones nutricionales en el tracto digestivo del insecto después de la ingesta sanguínea, con un aumento en los metabolitos favoreciendo el desarrollo del parásito.

Al comparar las fuentes de alimentación de los insectos, se observó una mayor cantidad de formas tanto del genotipo Tc I como Tc II en insectos realimentados con sangre de ratón, sugiriendo que esta fuente sanguínea favorece el desarrollo y diferenciación del parásito en una mayor proporción comparado con la sangre de las aves, en la cual se observó un retraso del desarrollo del parásito.

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los tripomastigotes de los linajes TcI y TcII, sumando la cantidad de formas encontradas en insectos realimentados con sangre de gallina y sangre de ratón. Esto podría deberse al efecto que genera la realimentación del insecto, brindando condiciones nutricionales favorables para el desarrollo del parásito en el vector.

Debido a la detección de infecciones en humanos con *T. cruzi* II y a aparición de brotes de infección oral de *T. cruzi* sin la identificación del vector involucrado, los resultados aquí mostrados, no descartan la posibilidad de la participación de *R. colombiensis* como un posible vector de este genotipo en Colombia o en brotes de transmisión oral de *T. cruzi sensu lato*.

CONCLUSIONES

En contraste con otros estudios, el linaje Tc II logra desarrollarse en *R. colombiensis* alimentados sobre ratones infectados permitiendo la supervivencia del parásito incluso en insectos bajo condiciones de inanición, sugiriendo que este vector podría estar involucrado en la transmisión de este linaje.

La realimentación del vector genera un efecto positivo en la metaciclologénesis de los parásitos, observándose que la sangre de mamífero indujo el desarrollo y diferenciación en mayores cantidades, comparado con el efecto presentado con la sangre de ave, donde se evi-

denció una menor cantidad de formas metacíclicas.

La mayor capacidad vectorial de *R. colombiensis* para transmitir *T. cruzi* I, comparada con la baja capacidad para transmitir *T. cruzi* II en infecciones experimentales, es concordante con el predominio de *T. cruzi* I observado en estudios previos en infecciones naturales de este vector, de forma tal que no sería posible descartar la presencia de *T. cruzi* II el cual podría estar presente en muy bajas proporciones en infecciones mixtas con *T. cruzi* I.

Los resultados de este trabajo en unión con estudios previos, sugieren que *R. colombiensis* tiene una elevada capacidad para transmitir TcI silvestre lo cual podría involucrarlo en la transmisión oral de *T. cruzi*.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por el Departamento Colombiano de Ciencia, Tecnología e Innovación (COLCIENCIAS) (proyecto No. 110551929038) y el Fondo de Investigaciones de la Universidad del Tolima. Agradecimientos a Yazmín Suárez Quevedo por el apoyo técnico en algunas fases del trabajo.

BIBLIOGRAFÍA

1. Macedo, A., Pena, S. Genetic variability of *Trypanosoma cruzi*: implications for the pathogenesis of Chagas disease. *Parasitology Today*, 1998; (14)3, 119-124.
2. Macedo, A., Oliveira R., Peña S. Chagas disease: role of parasite genetic variation in pathogenesis. *Expert Reviews in Molecular Medicine*. Consultado 5 Marzo de 2002, en <http://www-ermm.cbuc.cam.ac.uk/02004118h.htm>
3. Andrade, L., Machado, C., Chiari, E., Pena, S., Macedo, A. Differential tissue distribution of diverse clones of *Trypanosoma cruzi* in infected mice. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 1999; 100, 163-172.
4. Pinto, A., Lana, M., Britto, C., Basstrenta, B., Tibayrenc, M. Experimental *Trypanosoma cruzi* bi-clonal infection in *Triatoma infestans*: detection of distinct clonal genotypes using kinetoplast DNA probes. *International Journal for Parasitology*, 2000; 30, 843-8.
5. Hernández, L., Ramírez, A., Cucunubá, Z., Zambrano, P. Brote de Chagas agudo en Lebrija, Santander 2008. Artículo Institucional. Año 4 Número 1. Consultado 1 Enero de 2009, en http://www.saludsantander.gov.co/web/index.php?option=com_docman&task=doc_download&gid=5&Itemid=7.
6. Bernabé, Ch., Neubauer, K., Solari, A. & Tibayrenc, M. *Trypanosoma cruzi*: presence of two major phylogenetic lineages and of several lesser discrete typing units (DTUs) in Chile and Paraguay. *Acta Tropica*, 2001; 78, 127-137.
7. De Freitas, J., Pinto, L., Pimienta, J., Bastos, L., Goncalves, V., Teixeira, S., Chiari E., Junqueira A., Fernandes O., Macedo A., Machado C., Pena S. Ancestral genomes, sex, and the population structure of *Trypanosoma cruzi*. *PLoS Pathogens*, 2006; 2(3), 226-235.
8. Miles, M., Feliciangeli, D., Rojas, A., 2003. American tripanosomiasis (Chagas' disease) and the role of molecular epidemiology in guiding control strategies. *British Medical Journal*, 326,1444. Consultado 25 de Junio de 2003, en <http://dx.doi.org/10.1136/bmj.326.7404.1444>
9. Mejía-Jaramillo, A., Peña, V., Triana, O. *Trypanosoma cruzi*: Biological characterization of lineages I and II supports the predominance of lineage I in Colombia. *Experimental Parasitology*, 2009; 121, 83-91.
10. Mantilla, J., Zafra G., Macedo, A., González, C. Mixed infection of *Trypanosoma cruzi* I and II in a Colombian cardiomyopathic patient. *Human Pathology*, 2010; 41, 610-613.
11. Zafra, G., Mantilla, J., Jácome, J., Macedo, A., González C. Direct analysis of genetic variability in *Trypanosoma cruzi* populations from tissues of colombian chagasic patients. *Human Pathology*, 2011; 42, 1159-1168.
12. Carranza J., Vallejo, G., Lozano, L., Jaramillo, J., Guhl, F. & Jaramillo, C. "Detección de *Trypanosoma cruzi* II en vectores naturalmente infectados en áreas endémicas de Colombia". En G. Vallejo, J. Carranza, J. Jaramillo (Eds.) *Biología, Epidemiología y Control de la Tripanosomiosis Americana y Leishmaniosis* (48-53). Ibagué: Lito-ediciones Tolima. 2000.

13. García, E. & Azambuja, P. Development and interactions of *Trypanosoma cruzi* within the insect vector. *Parasitology today*, 1991; (7)9, 240-244.
14. Azambuja, P., Feder, D., Mello, CB., Gomes, S. & García, E. Immunity in *Rhodnius prolixus*: Trypanosomatid-vector interactions. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 1999; 94(1), 219-222.
15. Vallejo, G., F. Guhl, G.A. Schaub. *Triatominae–Trypanosoma cruzi/T. rangeli*: Vector–parasite interactions. *Acta Tropica*, 2009; 110, 137–14.
16. Cuervo, P., Cupolillo, E., Segura, I., Saravia, N. & Fernandes, O. Genetic diversity of Colombian sylvatic *Trypanosoma cruzi* isolates revealed by the ribosomal DNA. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 2002; 97(6), 877–880.
17. Schaub, G. Direct transmission of *Trypanosoma cruzi* between vectors of Chagas' disease. *Acta Tropica*, 1988; 45, 11-19.
18. Arévalo, A., Carranza, J., Guhl F. & Vallejo G. Patrones electroforéticos de hemoproteínas salivares (nitroforinas) de *Rhodnius colombiensis* y *Rhodnius prolixus* (Hemíptera, Reduviidae, Triatominae). *Biomédica*, 2007; 27(1), 137-142.
19. Pereira, A & Pérez, M., (2003). Tripanosomiosis, enfermedad de Chagas y enfermedad del sueño. *OFFARM*. 2003; 22 (2):104-111.
20. Souto, R., Fernandes, O., Macedo, A., Campbell, D., Zingales, B., (1996). DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 1996; 83, 141-152.
21. Vallejo, G., Guhl, F., Carranza, J., Herrera, C., Urrea, D., Falla, A., Zabala, D., Villa, L. *Trypanosoma cruzi* population variability in Colombia: posible co-evolution in different vector species. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 2009; 42,2.
22. García, E., Ratcliffé, N., Whitten, M., Gonzalez, M., Azambuja, P. Exploring the role of insect host factors in the dynamics of *Trypanosoma cruzi*-*Rhodnius prolixus* interactions. *Journal of Insect Physiology*, 2007; 53,11-21.
23. Kollien, A., Schaub, G. *Trypanosoma cruzi* in the rectum of the bug *Triatoma infestans*: effects of blood ingestion by the starved vector. *American Journal Tropical Medicine Hygiene*, 1998; 59(1), 166-170.
24. Schaub, G. *Trypanosoma cruzi*: Quantitative studies of development of two strains in small intestine and rectum of the vector *Triatoma infestans*. *Experimental Parasitology*, 1989; 68, 260-273.
25. Alvarenga, N. & Bronfen, E. Metaciclo genese do *Trypanosoma cruzi* como parâmetro de interacao do parasita com o triatomineo vetor. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 1997; 30(3), 247-250.
26. Marcili, A., Lima, L., Cavazzana, M. Jr., Junqueira, A. C. V., Veludo, H. H., Da silva, F. M., Campaner, M., Paiva, F., Nunes, V. L. B., Teixeira, M. M. G. A new genotype of *Trypanosoma cruzi* associated with bats evidenced by phylogenetic analyses using SSU rDNA, cytochrome b and Histone H2B genes and genotyping based on ITS1 rDNA. *Parasitology*, 2009; 136(6), 641-655.