

RESPUESTA INMUNE DIFERENCIAL DE TRIATOMINOS CONTRA *Trypanosoma cruzi* Y *T. rangeli*.

TRIATOMINE DIFFERENTIAL IMMUNE RESPONSE AGAINST
Trypanosoma cruzi and *T. rangeli*.

Daniel Zabala^{1*}, Julio C. Carranza¹, Daniel A. Urrea¹,
Felipe Guhl², Nicolás Jaramillo³, Marta M. Teixeira⁴, Gustavo A. Vallejo¹.

¹ Laboratorio de investigaciones en Parasitología Tropical (LIPT). Facultad de Ciencias. Universidad del Tolima. dzabala@ut.edu.co, jccm27@gmail.com, daurrea@ut.edu.co, gvallejo@ut.edu.co.

² Centro Investigación en Microbiología y Parasitología Tropical (CIMPAT), Universidad de los Andes. fguhl@uniandes.edu.co

³ Corporación de Patologías Tropicales, Grupo de Chagas, Universidad de Antioquia. nicolas.jaramillo@siu.udea.edu.co.

⁴ Departamento de Parasitología, Universidad de São Paulo (Brasil). mmgteix@icb.usp.br.

Recibido: Agosto 23 de 2010

Aceptado: Marzo 14 de 2011

*Correspondencia del autor . Laboratorio de investigaciones en Parasitología Tropical (LIPT).
Facultad de Ciencias. Universidad del Tolima. E- mail: dzabala@ut.edu.co

RESUMEN

Previos estudios han revelado una respuesta diferencial de los triatominos frente a la invasión de *Trypanosoma cruzi* y *T. rangeli*, debido a que la respuesta inmune del insecto favorece o limita el desarrollo de algunos genotipos del parásito. Recientes estudios han mostrado la existencia de factores tripanolíticos en la hemolinfa de *Rhodnius prolixus* que lisan la subpoblación KP1 (-) de *T. rangeli*, pero no la subpoblación KP1(+). Con el objetivo de verificar la presencia de factores tripanolíticos en otros triatominos, se incubó la hemolinfa de *R. robustus*, *R. stali*, *R. pallescens* II, *R. colombiensis*, *Triatoma dimidiata*, *T. infestans* y *T. maculata* con diferentes subpoblaciones de *T. cruzi* y *T. rangeli*. Se extrajeron 120 µl de hemolinfa de cada vector y se mezclaron con 120 µl de suspensión de parásitos a una concentración de 9×10^6 parásitos/ml. Como control negativo se utilizó medio LIT. Se efectuaron recuentos en hemocitómetro cada 2 horas durante 10 horas. Los resultados mostraron la presencia de factores tripanolíticos en la hemolinfa de *R. prolixus*, *R. robustus* y *R. stali* que actuaron contra *T. rangeli* KP1 (-), *T. cruzi* II y *T. cruzi* V. Se observó aglutinación de los epimastigotes de *T. cruzi* III al incubarlos con la hemolinfa de *R. colombiensis*, *Periplaneta americana* y *Conocephalus sp.* Estos resultados sugieren que los factores tripanolíticos de *R. prolixus* serían los responsables de que este vector no esté involucrado en la transmisión de *T. cruzi* II y V en Colombia, Venezuela y en los países centroamericanos.

Palabras claves: factores tripanolíticos, inmunidad innata, triatominos, *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma rangeli*, *Rhodnius prolixus*, *Rhodnius robustus*, *Rhodnius stali*, *Rhodnius colombiensis*.

ABSTRACT:

Previous studies have shown a differential response of triatomines towards the invasion of *Trypanosoma cruzi* and *T. rangeli* due to the fact that the immune response of the insect facilitates or limits the development of some parasite genotypes. Also, it has been evidenced the existence of trypanolytic factors in the hemolymph of *Rhodnius prolixus* that lyse the subpopulation KP1 (-) of *T. rangeli*, but not the subpopulation KP1 (+). The objective was to verify the presence of trypanolytic factors in other triatomine species; consequently, the hemolymph of *R. robustus*, *R. stali*, *R. pallescens* II, *R. colombiensis*, *T. dimidiata*, *T. infestans* and *T. maculata* were incubated with different subpopulations of *T. cruzi* and *T. rangeli*. One hundred and twenty μ l of hemolymph were extracted from each vector and mixed with 120 μ l parasite suspension at a concentration of 9×10^6 parasites/ml. As a negative control, LIT medium was used. Hemocytometer counts were performed every 2 hours during a 10-hour period. The results showed the presence of trypanolytic factors in the hemolymph of *Rhodnius prolixus*, *R. stali* and *R. robustus* against *T. rangeli* KP1 (-), *T. cruzi* II and *T. cruzi* V. There was agglutination in *T. cruzi* III epimastigotes at the moment of been incubated with the hemolymph of *R. colombiensis*, *Periplaneta americana* and *Conocephalus sp.* These results suggest that trypanolytic factors of *R. prolixus* would be responsible for the fact that this species is not involved in the transmission of *T. rangeli* KP1 (-) and *T. cruzi* II and V in Colombia, Venezuela and Central American countries.

Keywords: trypanolytic factors, inmunidad innata, triatominos, *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma rangeli*, *Rhodnius prolixus*, *Rhodnius robustus*, *Rhodnius stali*, *Rhodnius colombiensis*.

INTRODUCCION:

Trypanosoma cruzi y *T. rangeli* son parásitos que están involucrados en la epidemiología de la enfermedad de Chagas, la cual es uno de los mayores problemas de salud pública en América Latina (1). Ambos parásitos comparten distribución geográfica, ciclos de transmisión y características bioquímicas por lo que pueden generar reacciones serológicas cruzadas en el diagnóstico de la infección (2).

T. cruzi circula en un elevado número de vertebrados, induciendo diferentes y variadas manifestaciones clínicas de la enfermedad de Chagas y mostrando gran diversidad de características biológicas y bioquímicas (3). Esta variabilidad es atribuida a la diversidad genética entre los aislados del parásito (4), de manera que se observan diferencias en la tasa de crecimiento, la patogenicidad, el tropismo por los tejidos y la sensibilidad a drogas antiparasitarias (5,6). Igualmente *T. rangeli* presenta polimorfismos biológicos, bioquímicos y moleculares en cepas aisladas de diferentes regiones geográficas (7-9).

Los análisis de isoenzimas, del DNA ribosomal y del gen miniexon en *T. cruzi*, han permitido identificar seis DTUs (Discret Taxonomic Units) reconocidas como *T. cruzi* I-VI (10), adicionalmente dentro de *T. cruzi* I se han identificado 4 haplotipos asociados a los ciclos de transmisión del parásito en diferentes regiones geográficas (11,12). Por otro lado, los análisis de kDNA y del gen miniexon han mostrado 2 grupos evolutivos de *T. rangeli* denominados KP1(+) y KP1(-) (13,14). Previos estudios han mostrado la existencia de un factor tripanolítico en la hemolinfa de *R. prolixus*, que actúa selectivamente contra *T. rangeli* KP1(-) pero no contra *T. rangeli* KP1 (+) (15). La hemolinfa de las especies del género *Rhodnius* constituye un ambiente importante para que se complete el ciclo de *T. rangeli* con formación de tripomastigotes infectantes a nivel de las glándulas salivares. Por otro lado, la mayoría de las sustancias químicas relacionadas con la respuesta inmune de los insectos, son liberados en la hemolinfa (16). De conformidad con lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue verificar si la hemolinfa de diferentes especies del género *Rhodnius* y *Triatoma* poseen factores

tripanolíticos contra diferentes genotipos de *T. rangeli* y de *T. cruzi*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas de *T. rangeli*. Se emplearon las cepas “P53” caracterizada como KP1(-), aislada de glándulas salivares de *R. colombiensis* en Coyaima (Tolima-Colombia) y la cepa “Durán” caracterizada como KP1(+) de origen humano, aislada en el departamento de Cundiamaraca-Colombia). Los parásitos fueron cultivados en medio NNN suplementado con LIT, incubados a 28 °C y con pasaje cíclico a través de medio de cultivo-ratón-triatomino de acuerdo con la metodología planteada por Vallejo et al., (1986)(17).

Cepas de *T. cruzi*. Se emplearon las cepas R-col 02, aislada de la ampolla rectal de *R. colombiensis* en Coyaima (Tolima-Colombia) y la cepa 1321, ambas caracterizadas como *T. cruzi* I. Adicionalmente se emplearon las cepas 34E caracterizada como *T. cruzi* II, la cepa 845, caracterizada como *T. cruzi* III y las cepas 967 y 167 caracterizadas como *T. cruzi* V. Los parásitos fueron cultivados en medio NNN suplementado con LIT, incubados a 28 °C y repicados cada 15 días a medios de cultivo frescos.

Caracterización molecular. Se efectuó la caracterización molecular de las cepas estudiadas para identificar los correspondientes genotipos, utilizando reacciones de PCR con los iniciadores S35/S36/KP1L (13); TCC/TC1/TC2 (18) para identificar los dos grandes grupos de *Trypanosoma cruzi* (I y II) y finalmente los iniciadores D71/D72 (19) que permiten determinar los genotipos de *T. cruzi* I-VI.

Triatominos. Se emplearon insectos del 5° estado ninfal correspondientes a *Triatoma infestans*, *T. dimidiata*, *T. maculata*, *Rhodnius pallescens*, *R. colombiensis*, *R. ecuadoriensis*, *R. stali*, *R. robustus* y *R. prolixus* tanto doméstico como silvestre. Como grupos externos se utilizaron insectos del orden Orthoptera (*Conocephalus sp*) y Dictyoptera (*Periplaneta americana*).

Recolección de la hemolinfa. Las ninfas fueron alimentadas con sangre de gallina y siete días después de la alimentación se extrajo la hemolinfa y se centrifugó a 14000 g por 3 minutos, para remover hemocitos y restos celulares.

Incubación de la hemolinfa con los tripanosomátidos. 120 µl de hemolinfa y 120 µl de parásitos resuspendidos en medio LIT a una concentración de 9×10^6 parásitos/ml fueron incubados durante 10 horas a temperatura ambiente. Como control negativo, se utilizó medio LIT. El recuento de parásitos se realizó en cámara de Neubauer cada dos horas durante diez horas. Se efectuaron 3 réplicas para cada experimento.

Análisis estadístico: Los resultados fueron analizados mediante ANOVA, con la prueba TUKEY por diferencias de medias de los tratamientos a través del software operativo Openstat versión 2007 (www.statpages.org/miller/openstat) con una significancia estadística de $P < 0.05$ y la graficación se realizó a través del programa Infostat (2004).

RESULTADOS

Incubación de la hemolinfa vs. *T. rangeli* KP1(-) y KP1(+). Los resultados corroboran la acción tripanolítica que posee la hemolinfa de *R. prolixus* reportada por Pulido et al., (2008)(15) y Vallejo et al., (2009)(20). Se observaron fenómenos líticos contra las formas de cultivo de *T. rangeli* KP1(-) y al cabo de 10 horas se observó la desaparición de los parásitos con diferencias estadísticamente significativas con respecto al control utilizado (figura 1).

En el presente trabajo se encontró la presencia de factores tripanolíticos en la hemolinfa de otros vectores triatominos. 10 horas después de la incubación de la hemolinfa de *R. robustus* vs la cepa P53 KP1(-), se observó disminución del número de parásitos y diferencias estadísticamente significativas $P < 0.05$ con respecto al control negativo LIT a partir de la hora 2. El efecto no se observó en la incubación de esta hemolinfa vs la subpoblación KP1(+) experimento en la cual no se observó disminución del número de formas (Figura 2).

Se comprobó que la hemolinfa de *R. prolixus*, *R. robustus* y *R. stali*, presentó actividad tripanolítica contra las cepas de *T. rangeli* KP1(-) (Figuras 1,2,3).

La incubación de la hemolinfa de *R. pallescens*, *R. colombiensis*, *R. ecuadoriensis*, *T. dimidiata*, *T. infestans* y *T. maculata* no mostró actividad tripanolítica contra ninguna subpoblación de *T. rangeli*.

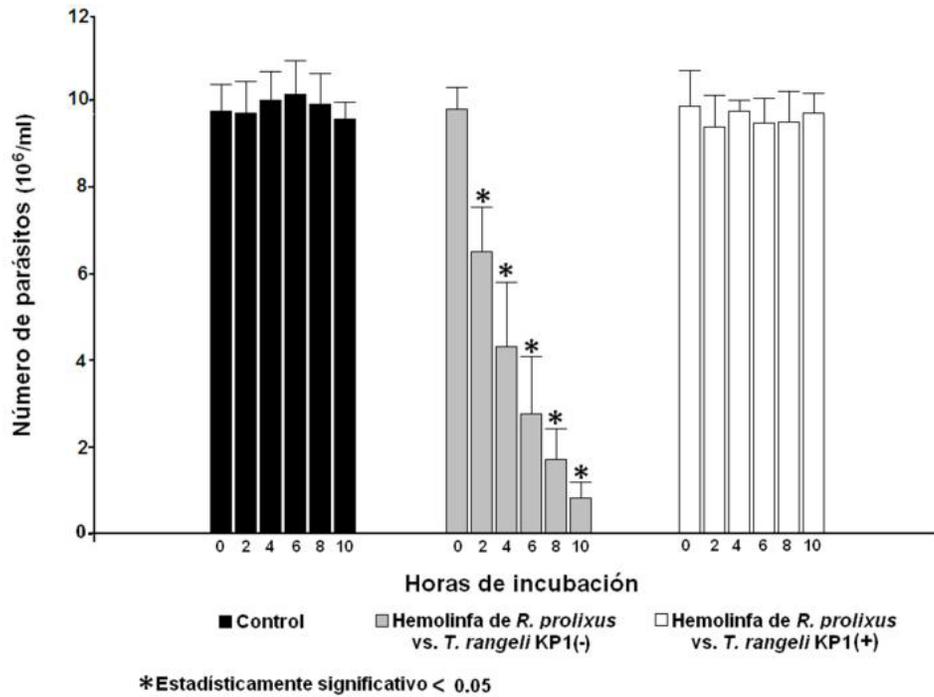


Figura 1: Incubación de la hemolinfina de *R. prolixus* vs *T. rangeli* KP1 (-) y KP1(+).

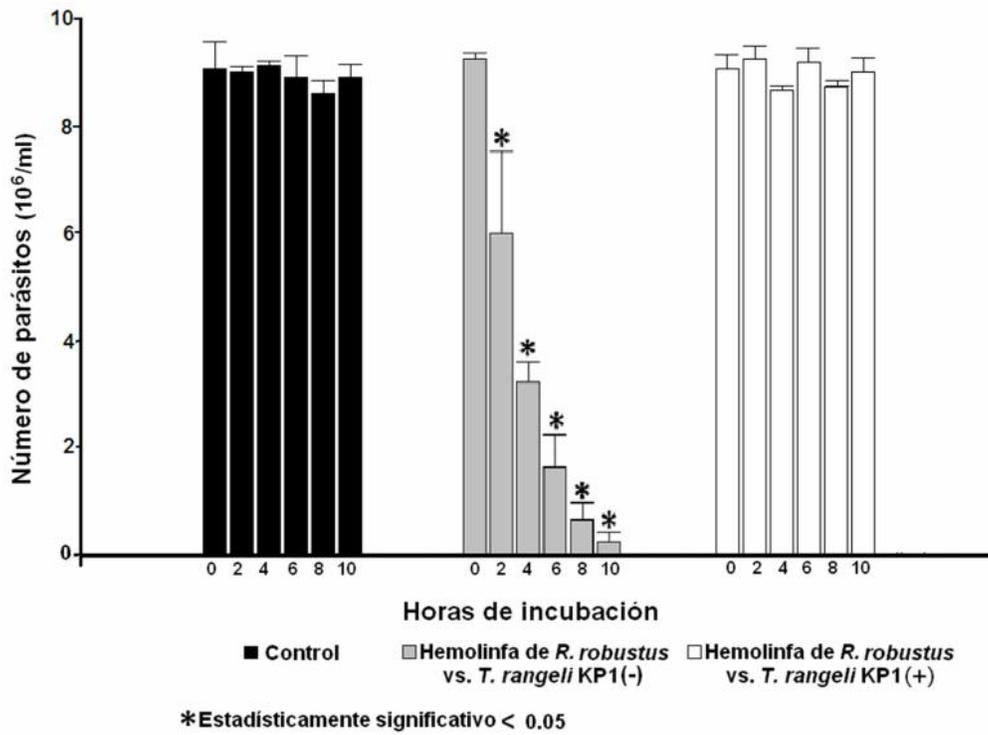


Figura 2: Incubación de la hemolinfina de *Rhodnius robustus* vs *T. rangeli* KP1(-) y KP1(+)

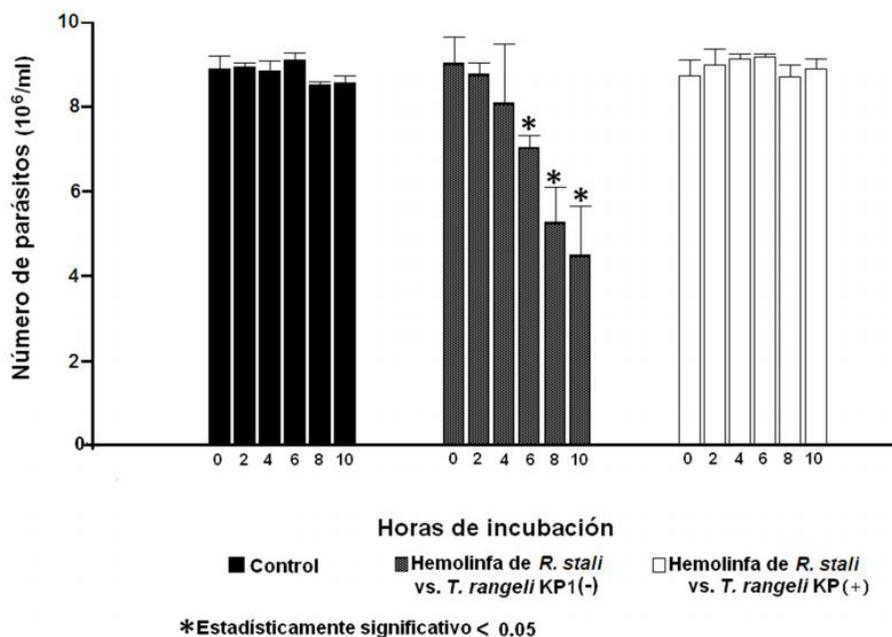


Figura 3: Incubación de la hemolinfa de *Rhodnius stali* vs *T. rangeli* KP1(-) y KP1 (+).

Incubación de la hemolinfa vs. *T. cruzi*. Ninguna de las hemolinfas ensayadas presentó actividad tripanolítica contra *T. cruzi* I; sin embargo, las hemolinfas de *R. prolixus*, *R. robustus* y *R. stali* presentaron actividad tripanolítica contra *T. cruzi* II (Figuras 4,5). Las hemolinfas de *R. prolixus* doméstico y silvestre, presentaron actividad tripanolítica contra *T. cruzi* II (figura 6). Adicionalmente la hemolinfa de *R. prolixus* doméstico presentó actividad tripanolítica contra *T. cruzi* V (Figura 7). Se observaron fenómenos de aglutinación cuando se incubó la hemolinfa de *R. colombiensis* con *T. cruzi* III y cuando se incubó la hemolinfa de *P. americana* con *T. cruzi* II. La tabla 1, muestra en resumen los resultados obtenidos al incubar la hemolinfa de los diferentes triatomos con las subpoblaciones de *T. cruzi* y *T. rangeli*.

DISCUSIÓN

Los genotipos de *T. rangeli* KP1(+) y KP1(-) son transmitidos por las 16 especies del género *Rhodnius* hasta ahora descritas en América Latina (21). Estas especies de *Rhodnius* se han agrupado en dos linajes filogenéticos, denominados linaje “pictipes”, constituido por las especies de la cordillera de los Andes, las cuales son *R. pallescens* I y II, *R. colombiensis* y *R. ecuadoriensis* I y II, y el linaje “robustus” constituido por las especies localizadas al oriente de la cordillera de los Andes *R. prolixus*, *R. robustus* I, II, III, IV y V, *R. neglectus*, *R. nasutus* y *R. domesticus* (22). Estudios morfológicos,

bioquímicos y moleculares han soportado la divergencia evolutiva de estos dos linajes de *Rhodnius* y se espera que la interacción de los linajes de *Rhodnius* con las subpoblaciones de *T. rangeli* y de *T. cruzi* presenten divergencias similares.

En nuestros experimentos la hemolinfa de *R. robustus* mostró la presencia del factor tripanolítico contra la subpoblación KP1(-) de *T. rangeli* pero no contra *T. rangeli* KP1(+); este comportamiento ya se había observado en la hemolinfa de *R. prolixus* (15), lo cual respalda la hipótesis que la subpoblación KP1(+) estaría asociada al grupo “robustus”, esperándose que un comportamiento similar sea observado en *R. neglectus*, *R. nasutus* y *R. domesticus*.

La presencia de un factor tripanolítico en la hemolinfa de triatomos del grupo “robustus” indica que los vectores están adaptados a la infección de *T. rangeli* KP1(+), puesto que ellos permiten el establecimiento y la producción de formas infectantes del parásito a nivel de glándulas salivares, mientras que existe una respuesta inmune para evitar la invasión de las formas de *T. rangeli* KP1(-), las cuales son eliminadas completamente de la hemolinfa. Por otro lado, en infecciones experimentales, se ha observado la supervivencia de las

Tabla 1: Presencia de factores inmunes en las especies estudiadas.

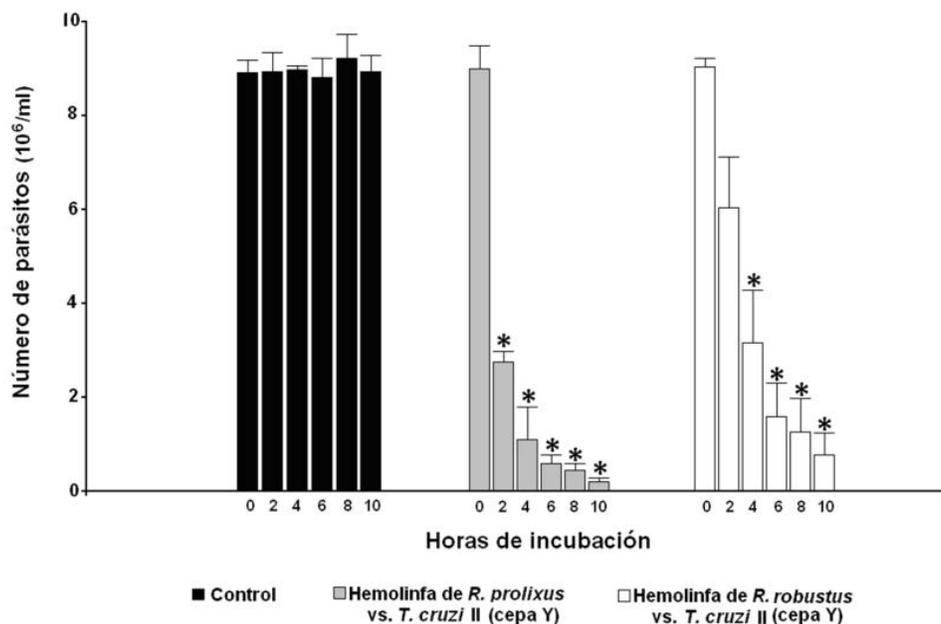
TRIATOMINO	<i>T. rangeli</i>		<i>T. cruzi</i>					
	KP1-	Kp1+	<i>T. cruzi</i> I		Tc V	Tc II	Tc III	
	P53	Durán	Rcol 02	Dm28c	Tc 167	967	34E(Y)	845
<i>R. prolixus</i> doméstico	+	-	-	-	+	+	+	-
<i>R. prolixus</i> silvestre	+	-	-	-	-	-	+	-
<i>R. robustus</i>	+	-	-	-	-	-	+	-
<i>R. stali</i>	+	-	-	-	-	-	+	-
<i>R. colombiensis</i>	-	-	-	-	-	-	-	AGL
<i>R. pallescens</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>R. ecuadoriensis</i>	-	-	NE	NE	NE	NE	NE	NE
<i>T. dimidiata</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>T. maculata</i>	-	-	-	NE	NE	NE	NE	NE
<i>T. infestans</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Conocephalus sp</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Periplaneta americana</i>	-	-	-	-	AGL	AGL	AGL	AGL

NE = Experimento no efectuado.

AGL = Aglutinación.

(+) = Presencia de factores tripanolíticos.

(-) = Ausencia de factores tripanolíticos.



*Estadísticamente significativo P < 0.05

Figura 4: Incubación de la hemolinf de *R. prolixus* y *R. robustus* vs *Trypanosoma cruzi* II.

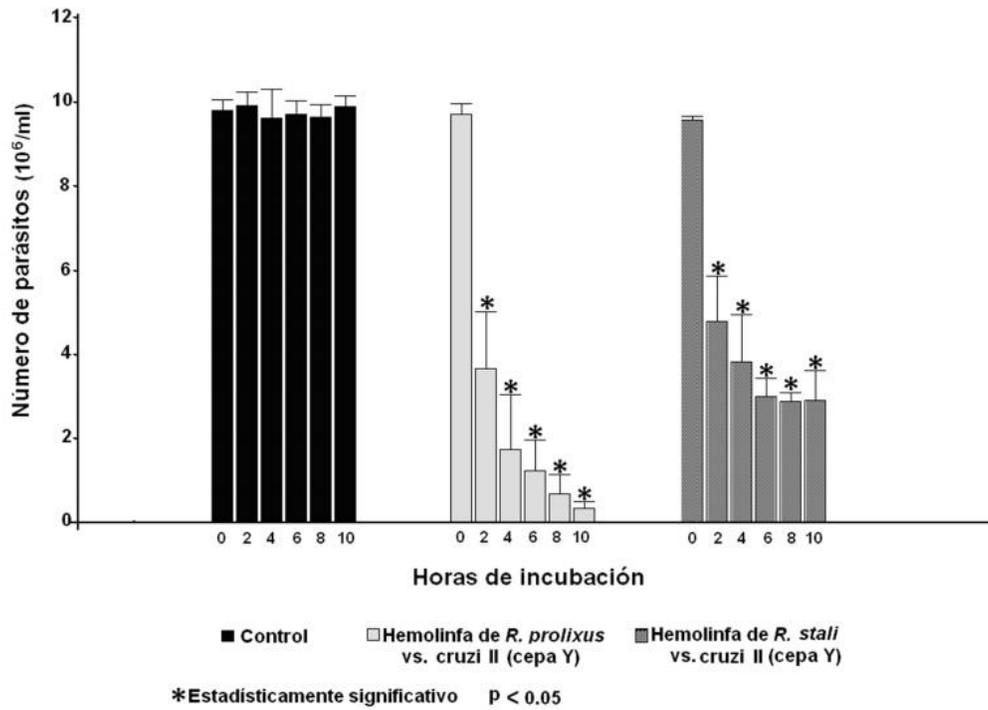


Figura 5: Incubación de la hemolinf de *R. prolixus* y *R. stali* vs *T. cruzi* II

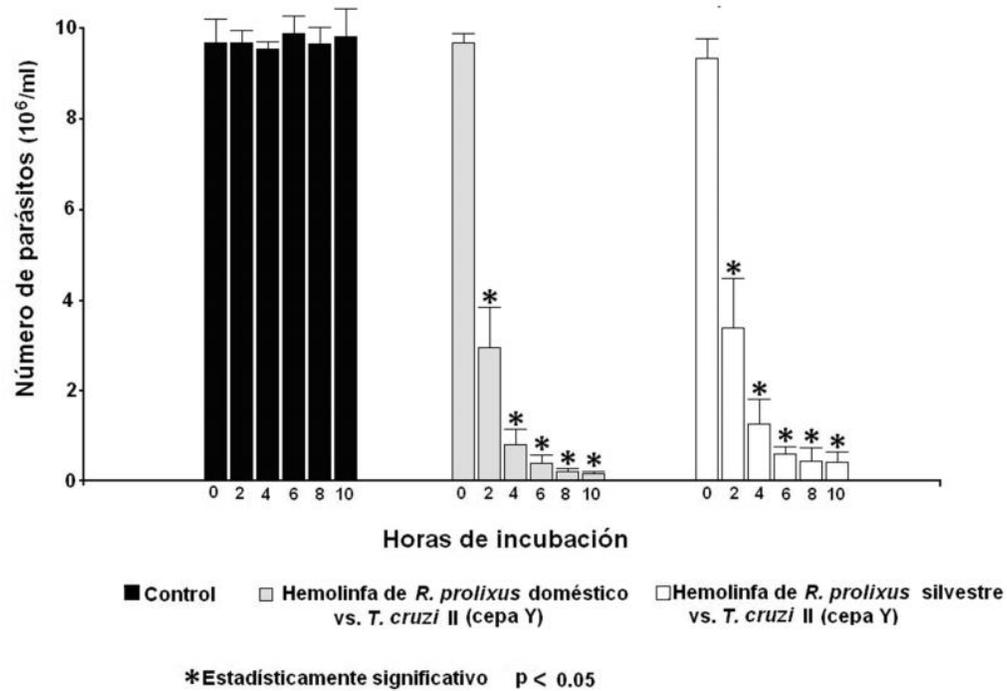


Figura 6: Incubación de la hemolinf de *R. prolixus* doméstico y *R. prolixus* silvestre vs *T. cruzi* II

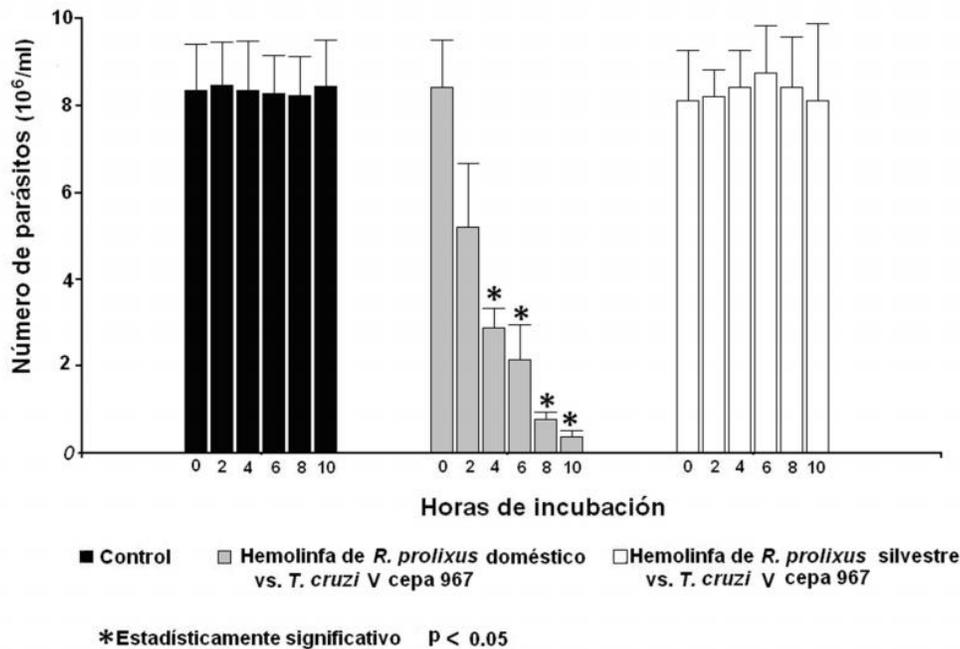


Figura 7: Incubación de la hemolinfina de *R. prolixus* doméstico y silvestre vs *T. cruzi* V

cepas KP1(+) en la hemolinfina del grupo “pallenscens” (*R. pallenscens*, *R. colombiensis* y *R. ecuadoriensis*), indicando la ausencia de factores tripanolíticos contra esta subpoblación en la hemolinfina de estas especies, y una posible restricción del desarrollo de las formas KP1(+) a nivel de glándulas salivares, pues hasta ahora no se han encontrado insectos del grupo “pallenscens” infectados naturalmente con la subpoblación KP1(+).

La presencia de factores tripanolíticos en la hemolinfina de *R. prolixus* doméstico y silvestre, *R. robustus* y *R. stali* en contra *T. cruzi* II y *T. cruzi* V, reportados en este trabajo, podría indicar que las cepas de *T. rangeli* KP1(-), *T. cruzi* II y *T. cruzi* V poseen blancos moleculares similares sobre los cuales actúa el factor tripanolítico de estos triatominos. Sin embargo, también existe la posibilidad de que en la hemolinfina de insectos del grupo

“robustus”, exista más de un factor o proteína tripanolítica que actúan independientemente contra cada una de las subpoblaciones de los parásitos. Confirmar si se trata de uno o varios factores tripanolíticos, es objeto de investigación en la actualidad de nuestro laboratorio. Recientes estudios experimentales mostraron que las especies de *Rhodnius* en Colombia carecen de capacidad vectorial para transmitir a *T. cruzi* II (6). La presencia del factor tripanolítico en la hemolinfina del grupo “prolixus” podría explicar en parte la incapacidad de este grupo para transmitir a *T. cruzi* II. Estos hallazgos abren una nueva línea de investigación que buscaría entender el papel de los vectores en la transmisión selectiva de subpoblaciones de *T. cruzi* y *T. rangeli* y su impacto en la epidemiología de los tripanosomas que infectan al hombre en América Latina.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a Ximena Carolina Pulido, por el apoyo técnico durante la realización del presente trabajo. Al Fondo de Investigaciones de la Universidad del Tolima, por la financiación parcial del presente proyecto y al Instituto Colombiano Francisco José de Caldas Colciencias, por la financiación del presente trabajo a través del proyecto No. 1204-343-19188.

BIBLIOGRAFÍA

1. Brisse, S., Verhoef, J. & Tibayrenc, M. Characterization of large and small subunit rRNA and mini-exon genes further supports the distinction of six *Trypanosoma cruzi* lineages. *Int J Parasitol*, 2001; 31, 1218-1226.
2. Sanchez, IP., Pulido, X., Carranza, C., Triana, O. & Vallejo, GA. Inmunidad natural de *Rhodnius prolixus* frente a la infección con *Trypanosoma* (Herpetosoma) *rangeli* KP1(-) aislados de *Rhodnius pallescens*, *Rhodnius colombiensis* y *Rhodnius ecuadoriensis*. *Rev asoc.col Ciencias biológicas* 2005; 17, 108-118.
3. Zingales, B., Stolf, B., Souto, R., Fernández, O. & Briones, M. Epidemiology, Biochemistry and Evolution of *Trypanosoma cruzi* Lineages Based on Ribosomal RNA Sequences. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 1999; 94, (I), 159-164.
4. Tibayrenc, M. & Ayala, F. Towards a population genetics of microorganisms: the clonal theory of parasitic protozoa. *Parasitology Today* 1991; 7, 228–232.
5. Macedo, AM. & Pena, SD. Genetic variability of *Trypanosoma cruzi*: implications for the pathogenesis of Chagas disease. *Parasitol Today* 1998; 14, 119-124.
6. Mejía, AM., Peña, VH. & 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.
7. D'Alessandro, BA. Biology of *Trypanosoma* (Herpetosoma) *rangeli* (Tejera, 1920) In: Lumsden, W.H.R., Evans, DA (Eds). *Biology of Kinetoplastida* 1976; 1, 327-493. Academic Press, London.
8. Vallejo GA, Guhl F, Carranza JC, Lozano LE, Sánchez JL, Jaramillo JC. kDNA markers define two major *Trypanosoma rangeli* lineages in Latin-América. *Acta Tropica* 2002; 81,77-82.
9. Urrea, DA., Carranza, JC., Cuba, CA., Gurgel-Gonçalves, R., Guhl, F, Schofield, CJ, Triana O., Vallejo, GA. Molecular characterization of *Trypanosoma rangeli* strains isolated from *R. ecuadoriensis* in Peru, *R. colombiensis* in Colombia and *R. pallescens* in Panama, supports a co-evolutionary association between parasites and vectores. *Infection, Genetics and Evolution* 2005; 5(2), 123- 129.
10. Zingales, B., Andrade, SG., Briones, MRS, Campbell, DA, Chiari, E., Fernandes, O., Guhl, F., Lages-Silva, E., Macedo, AM., Machado, CR., Miles, MA., Romanha, AJ., Sturm, NR., Tibayrenc, M., Schijman, AG. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009; 104(7), 1051-1054.
11. Herrera C, Bargues MD, Fajardo A, Montilla M, Triana O, Vallejo GA, Guhl F. Identifying four *Trypanosoma cruzi* I isolate haplotypes from different geographic regions in Colombia. *Infect Genet Evol* 2007; 7(4), 535-9.
12. Falla A., Herrera C., Fajardo A., Montilla M., Vallejo G., Guhl, F. Haplotype identification within *Trypanosoma cruzi* I in Colombian isolates from several reservoirs, vectors and humans. *Acta Tropica* 2009; 110, 15-21
13. Vallejo, GA., Guhl, R., Carranza, JC., Moreno, J., Triana, O. & Grisard, CE. Paritybetween kinetoplast DNA and miniexon 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* 2003; 3, 39-45.
14. Vallejo, GA., Guhl, F., Carranza, JC., Triana, O, Pérez G., Ortiz, PA., Marín DH., Villa LM., Suárez J., Sánchez IP., Pulido X., Rodríguez IB., Lozano LE., Urrea DA., Rivera FA., Cuba-Cuba C.,Clavijo, JA. Interacción tripanosoma-vector-vertebrado y su relación con la sistemática y la epidemiología de la tripanosomiasis Americana. *Biomedica*, 2007; 27(1), 110-8.

15. Pulido, XC., Perez, G. & Vallejo, GA. Preliminary characterization of a *Rhodnius prolixus* hemolymph trypanolytic protein, this being a determinant of *Trypanosoma rangeli* KP1(+) and KP1(-) subpopulations' vectorial ability; *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 2008; 103(2), 172-179.
16. Bullet, P., Dimarcq, JL. & Hoffmann, D. Antimicrobial peptides in insects: structure and function. *Development Comportamental Immunology* 1999; 23, 329-344.
17. Vallejo, GA.; Marinkelle, CJ.; Guhl, F. & De Sándchez, N. Mantenimiento en el laboratorio de *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli* Tejera, 1920. *Revista de Biología Tropical*. San José/Costa Rica, 1986; 34(1), 75-81.
18. Souto, PR., Fernández, O, Macedo, AM, Campbell, DA, & Zingales, B. DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 1996; 83, 141-152.
19. Souto, RP. & Zingales, B. Sensitive detección and strain classification of *Trypanosoma cruzi* by amplification of a ribosomal RNA sequence. *Molecular and biochemical parasitology* 1993; 62 (1), 45-52.
20. Vallejo, GA; Guhl F. & Schaub, GA. Triatominae *Trypanosoma cruzi* / *T. rangeli*: Vector-parasite interaction. *Acta tropica* 2009; 110, 137-147.
21. Guhl F and Vallejo GA. *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli* Tejera, 1920 : An updated review. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2003; 98(4), 435-442.
22. Abad-Franch, F, Monteiro, FA., Jaramillo, N., Gurgel-Gonçalves, R, Dias, F., BS., Diotaiuti, L. Ecology, evolution, and the long-term surveillance of vector-borne Chagas disease: A multi-scale appraisal of the tribe Rhodniini (Triatominae). *Acta Tropica*, 2009; 110, 159-177.