

UNIVERSIDAD DE GRANADA- INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

FACULTAD DE CIENCIAS



*Epidemiología Molecular de la Tripanosomiasis
Americana (Trypanosoma cruzi y
Trypanosomma rangeli) en la Región Norte y
nororiental del Perú*

TESIS DOCTORAL

2005

El presente trabajo de Investigación titulado: *Epidemiología Molecular de la Tripanosomiasis Americana (Trypanosoma cruzi y Trypanosomma rangeli) en la Región Norte y nororiental del Perú* ha sido realizado en el Laboratorio del Departamento de Parasitología Molecular de la Facultad de Ciencias - Universidad de Granada, bajo la dirección y supervisión de:

Prof. Dr. Manuel Sánchez Moreno
Director

Y presentada para optar el grado de Doctor por la Universidad de Granada, por

Dº Franklin Roger Vargas Vásquez

2005

A Dios
A mis Padres
A mi Esposa

Agradecimientos

Agradecimientos

Quisiera expresar mi sincera gratitud

En primer lugar al Dr. Manuel Sánchez Moreno que como Director me ha guiado y dado la confianza en la realización de este trabajo. Asimismo, por brindarme su amistad y respeto por siempre.

Al Dr. Antonio Osuna Carrillo de Albornoz, por iniciarme, apoyarme y animarme a la realización de estos estudios de Doctorado.

A la Dra. Carmen Mascaró Lazcano y a la Dra. Maria José Rosales Lombardo por amistad y colaboración, ofreciéndome plena confianza en mi trabajo y en mí persona.

Al grupo de Investigación de Parasitología Molecular, por su disposición y apoyo durante la realización experimental de este trabajo.

Al Convenio Interinstitucional entre la Universidad de Granada-Universidad Nacional de Trujillo, por el apoyo brindado y la oportunidad de conocer, durante los estudios de doctorado, a grandes investigadores y amigos de esta prestigiosa Universidad.

Y a todas aquellas personas pertenecientes o no al mundo de la investigación, que colaboraron directa e indirectamente en la ejecución y culminación de esta tesis.

Agradecimientos

A Ofelia, que con su amor y comprensión esta siempre apoyándome y expresando su colaboración e ilusión en mi trabajo. Gracias mi amor, por todo los momentos vividos, buenos como malos, y los que vendrán.

A mis Padres, que desde donde están, me guían en el camino de los conocimientos y servicios a mis semejantes. Gracias a Ustedes por creer siempre en mí.

A todos mis hermanos que siempre están brindándome su apoyo en cualquier circunstancia de mi vida. Gracias por estar siempre conmigo.

A mis amigos y colegas por su interés en todo momento de mi vida profesional.

A mi MAESTRO y gran AMIGO, Dr. Cristhopher J. Schofield, por su gran enseñanza en el conocimiento de la Biología de los triatomos y su apoyo en mis investigaciones.

I. INTRODUCCION

Trypanosoma cruzi es un protozoo hemoflagelado, causante del mal de Chagas o tripanosomiasis americana y descrito por Carlos Ribeiro Justiniano Das Chagas en 1909. Son varias las razones que justifican el recordar la obra de Carlos Chagas, autor de la contribución latinoamericana más importante a la ciencia médica del siglo XX. Entre ellas tenemos, ha sido el único caso en la historia de la medicina en que descubren al mismo tiempo y por la misma persona, una enfermedad infecciosa, el microorganismo que la produce y el agente biológico que la transmite. Además de todos los aspectos de la enfermedad: anatomía, patología, epidemiología, etiología, formas clínicas y medios de transmisión (Chagas 1924)

La situación de la enfermedad de Chagas hoy en día, se ve influenciada por factores epidemiológicos, bioecológicos y socioeconómico de la población rural de América Central y América del Sur (Días 2000). El reconocimiento de la gravedad de esta enfermedad en el continente Americano, ha sido establecida después de correlacionarla con la pérdida de productividad y la mortalidad precoz, que hace de ella, una de las causas de subdesarrollo de amplias zonas de América Latina (Días y Schofield 1999, Tarleton 2000).

El desconocimiento de la prevalencia de esta enfermedad, los limitados niveles económicos, culturales y científicos, característicos de los países endémicos en vías de desarrollo, el desinterés de los gobernantes y de la sociedad, y las insuficientes medidas de control y/o terapéuticas, obstaculizan la lucha contra esta enfermedad y contribuyen a la lenta erradicación de esta patología (OPS/OMS 2004).

La enfermedad de Chagas es una parasitosis endémica en América Latina y una zoonosis ampliamente extendida, siendo la cuarta causa de morbilidad y mortalidad en el continente. Naturalmente afecta de 16 a 18 millones de personas en 21 países, y cerca de 100 millones con grave riesgo de contraer la enfermedad. Se estima que cada año se infectan alrededor de 500.000 personas y de éstas 300.000 son niños, con tasas de

mortalidad de más del 10 –15 % en la fase aguda de la enfermedad. Hasta ahora no existe un tratamiento, ni profilaxis que ayuden al control de la enfermedad (OPS/OMS 2004).

La enfermedad, presenta una amplia distribución geográfica, que se extiende desde el sur de los Estados Unidos hasta el sur de Argentina y Chile (**Fig 1**). Sin embargo, se la ha encontrado en Canadá, USA o Europa debido a la inmigración o como consecuencia de la transfusión sanguínea (Schmunis 1991)

La distribución del parásito por el centro y América del Sur es compartida con *T. rangeli*, otra especie de tripanosomátido (Tejera 1920) que infecta a una gran variedad de vectores invertebrados y hospedadores mamíferos, causando infecciones simples y/o mixtas con *T. cruzi* (Machado y col. 2000)

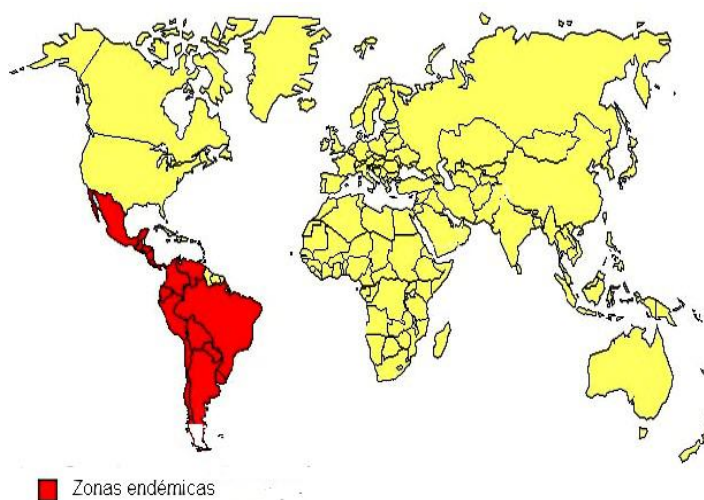


Fig 1. Distribución geográfica de la Enfermedad de Chagas

El alto riesgo de infección de esta enfermedad, está relacionado directamente con la pobreza y con una serie de factores, tales como: (a) existencia de chinches triatomíneas chupadoras de sangre y transmisoras del parásito; (b) mamíferos domésticos, peri-domésticos y salvajes que actúan como reservorios (perros, gatos, armadillos, murciélagos, zorros, ratas, ardillas, monos, etc.); (c) la edad del sujeto susceptible, siendo la enfermedad mas frecuente en niños con edades comprendidas entre unos meses de edad y dos años y (d) la cepa del parásito (PAHO 1982).

En los últimos años, el Programa de Control de la Enfermedad de Chagas de la Organización Mundial de la Salud (WHO/TDR), a través de la llamada Iniciativa del Cono Sur (Argentina, Brasil, Bolivia, Chile, Paraguay y Uruguay) ha tenido un éxito notable en el

control e interrupción de la transmisión vectorial del *T. cruzi* y por consiguiente de la tripanosomiasis americana (Moncayo, 1999). De acuerdo a estos éxitos y a las recomendaciones OMS-OPS y la Agencia Canadiense para el Desarrollo Internacional (ACDI), en el Perú se vienen realizando investigaciones epidemiológicas y entomológicas, de relevancia directa para el control de la especie de triatomino, tanto domiciliarios como no domiciliarios. Sin embargo, el desarrollo y/o adaptación de estrategias de control orientadas a las condiciones entomológicas locales; así como el conocimiento disponible sobre el impacto en Salud Pública de la enfermedad de Chagas, están dirigidos predominantemente al sur del país (Guhl y col. 1999). Esta gestión, que se inició en 2002: adecuada, oportuna, eficaz y eficiente, abre certezas sobre el desarrollo del proyecto y plantea la necesidad de que el Perú aborde los escenarios endémicos restantes (Norte y Amazonía) a la brevedad, con la estrategia y la metodología adecuadas (OPS-ACDI 2004)

En el Perú, los estudios realizados señalan la presencia de la infección en el territorio nacional, considerándose hasta hace poco a la macro-región sur del país como la principal zona chagásica, debido a la presencia del triatomo intradomiciliario (*Triatoma infestans*), compartiendo ecológicamente condiciones favorables para su transmisión. La tripanosomiasis americana fue descrita inicialmente por el Dr. Escomel en 1917 en los valles de Sihuas-Víto en el departamento de Arequipa.

La curva histórica de incidencia durante los últimos 75 años, muestra un descenso y estabilización de la enfermedad con un importante subregistro de casos, tasas de incidencia promedio de 0,01 – 0,02 x 100.000 habitantes anualmente y tasa nacional acumulada de 7,9 x 100.000 habitantes. Se estima actualmente en 24.700 los casos infectados por *T. cruzi* en áreas endémicas de los cuales 1.209 corresponden a formas agudas u oligosintomáticas y 22.962 casos a formas crónicas de la enfermedad. Se estima que 3.142 casos corresponden a niños menores de 5 años. La afectación por sexo es equitativa y el grupo de edad más afectado está entre los 20-54 años. (Ministerio de Salud. 2004).

El área chagásica más importante y conocida del país (**Fig. 2**) se encuentra en la vertiente sur occidental del Pacífico, comprendida entre los 13°.0 - 19°.0 grados de latitud



Fig. 2. Distribución de la Enfermedad de Chagas en el Perú

sur y los 10 - 3,075 m.s.n.m, en los departamentos de Arequipa, Moquegua, Tacna, Ica, Ayacucho y Apurímac. La vertiente Noreste y Centro-este de los Andes, comprendida entre los 5° - 6° de latitud norte, 77.0° - 78.0 ° de longitud y los 400 - 1,000 m.s.n.m, es otra de las áreas que reporta casos de enfermedad de Chagas en los departamentos de Cajamarca, Amazonas, San Martín y Ucayali. Existe información de casos humanos y vectores infectados naturalmente en el resto del territorio nacional a altitudes no mayores de 3,000 m.s.n.m. y una temperatura promedio anual de 24°C - 30° C.

(Vargas 2005)

La infestación intradomiciliaria del vector *T. infestans* se ha notificado en 21 provincias y 90 distritos del país, se estima en 2,0 % la población (473.918 habitantes) residente en áreas infestadas por este vector, la dispersión del *Triatoma* cubre el 9,0 % de la superficie nacional (119.228,75 Km²), estimándose en un número de 160.000 las viviendas infestadas. El índice de infección tripano-triatomíno reportado es variable fluctuando de 0,0 a 30,0 %, las encuestas de seroprevalencia efectuadas sobre población en áreas endémicas muestran variaciones de 0,7 – 12,0 %; la tasa de infección en bancos de sangre fluctúa de 3,0 – 12,0 %, siendo evidente la existencia de un notable subregistro de casos y un insuficiente conocimiento de la magnitud del problema. (Córdova 1993).

Actualmente la enfermedad de Chagas en el norte y noreste peruano esta tomando una gran relevancia, aunque *T. infestans* esta ausente en esta parte del país, pero se han demostrado la existencia de diversas especies de vectores inicialmente peridomiciliarios o silvestres, como *T. carrioni*, *P. chinai*, *P. herreri* y *R. ecuadoriensis*, y que ahora en muchas localidades se les encuentra invadiendo el domicilio, y, algunas de ellas han sido encontrados infectados en forma natural por *T. cruzi*. (Cáceres y col. 2002, Cuba y col. 2002, Ministerio de Salud 2004).

La detección de casos agudos de enfermedad de Chagas en la región noreste, y de donantes con serología positiva en los bancos de sangre del país, así como la información epidemiológica actualizada, sugieren considerarlas no sólo como un problema de la Región sino como un problema de salud pública nacional. (Ministerio de Salud 2004).

El principal objetivo de la epidemiología de las enfermedades parasitarias es la comprensión de la interacción dinámica entre el parásito, el huésped y el ambiente. El estudio cualitativo y cuantitativo de tales interacciones, los mecanismos que regulan las vías a través de los cuales un parásito dado es transmitido de un huésped a otros, la influencia de estas interacciones en la dispersión de la enfermedad dentro y entre poblaciones susceptibles, son importantes elementos para la documentación de la epidemiología de una enfermedad parasitaria dada (Dias 2000). Sin embargo, existe un problema en la correlación de los síntomas de la enfermedad con la presencia del agente causal en el huésped afectado. Es importante entonces, confirmar que la presencia del parásito sea responsable del desencadenamiento de los síntomas característicos de la enfermedad. En la gran mayoría de las parasitosis humanas, esta asociación queda claramente establecida, pero en otras parasitosis, la asociación entre el parásito y los síntomas de la enfermedad puede ser más compleja, como es el caso de *T. cruzi*, produciendo un espectro variable de formas clínicas de la enfermedad (Días 2000).

Varios factores epidemiológicos han sido señalados como responsables de las diferencias en las formas clínicas de la enfermedad de Chagas, destacándose la cepa y la composición genética del parásito, la cepa y la composición genética del triatomino vector, factores étnicos, factores genéticos relacionados con la respuesta inmune del huésped y factores ambientales. Como consecuencia, un epidemiólogo debe estudiar los componentes que influyen en la transmisión de *T. cruzi* incluyendo la identificación y la densidad de los reservorios, identificación, dispersión y genética de los vectores domiciliados y no domiciliados, los estudios de genética y virulencia de las cepas de *T. cruzi* y los cambios ambientales y sociopolíticos que puedan contribuir en la dispersión de los vectores y en la transmisión del *T. cruzi* (Dias 2000)

Durante los últimos 25 años, grupos de investigación en diferentes países latinoamericanos, han mostrado una extensa variabilidad bioquímica, genética y molecular de las poblaciones de *T. cruzi*, agente causal de la enfermedad de Chagas y *T. rangeli*, una especie aparentemente no patógena para el humano pero muy frecuente en infecciones mixtas con *T. cruzi* en algunos países, como se ha mencionado anteriormente. Asimismo, se han encontrado grandes diferencias en el comportamiento de las cepas tanto *in vitro* como *in vivo*. Esta variabilidad en su comportamiento biológico y la heterogeneidad que presentan, han impedido establecer parámetros adecuados para su clasificación y taxonomía, lo que ha hecho que su caracterización sea una condición necesaria para su estudio y control (Guzmán–Marín y col 1999).

El desarrollo de estrategias adecuadas para el control de la enfermedad de Chagas, basado en la transmisión vectorial depende de la disponibilidad de datos fiables acerca de la distribución geográfica, características ecológicas y tendencias de comportamiento de las especies de triatomos presentes en cada región. La información sobre las tasas de infestación domiciliar por triatomos, los índices tripano-triatomino, infección humana y animal, es fragmentaria y lo poco que se conoce por estudios localizados en algunas áreas; muestran tasas de hasta el 6% positivos a anticuerpos para *T. cruzi* en donantes de sangre en zonas endémicas y de hasta 1% en zonas no endémicas como Lima. (Vargas 2005)

Por estas razones, se considera que es apropiado extender los estudios epidemiológicos sobre la tripanosomiasis americana en el norte y nororiente peruano, para precisar la importancia de los elementos de la cadena epidemiológica de la infección, el vector, el reservorio y la infección humana, mejorar el diagnóstico clínico y de laboratorio y orientar las medidas de control más adecuadas. Además de actualizar la información sobre estos aspectos, ofrecer un análisis crítico de la misma y aportar nuevos datos de los principales vectores locales.

II. ANTECEDENTES

2.1 Vectores de la Enfermedad de Chagas

Los vectores de la Enfermedad de Chagas pertenecen a la familia Reduviidae, dentro del orden Hemiptera, suborden Heteróptera. Se caracteriza por poseer aparato bucal succionador; en su mayoría fitófagos, algunos predadores y unos pocos hematófagos como la subfamilia Triatominae, integrada por más de 100 especies. (Ministerio de Salud 2004)

Su distribución abarca Asia y América, localizándose en esta última la mayor densidad de las especies. Presentan muchas denominaciones con diversas terminologías regionales: “chinchas hocicones” y “cacarachuelos” en México; “pitos” en Colombia; “chinchas mamones” y “chinchas de monte” en Panamá; “pitos” y “chupos” en Venezuela; “chinchorros”, “chupasangre” y “chinchas de caballo” en Ecuador; “hitas” en Bolivia, y “barbeiros” en Brasil. En Argentina, Chile, Uruguay y otras partes de Sudamérica se les denomina “vinchucas”; y en el Perú como: “chinchas”, “chinchones” y “chirimachas”. (Moncayo 1999)

En relación a su morfología, estos hemípteros son de tamaño pequeño o mediano, el cual varía considerablemente en los diferentes géneros. Presenta dimorfismo sexual; la hembra casi siempre supera al macho en tamaño, y pigmentación generalmente sencilla, no obstante, también existen especies con pigmentaciones vistosas. Su hábitat natural es silvestre, sobre todo aquellos lugares que sirvan de nidos, refugios o lugares de descanso para mamíferos, aves y reptiles. Aunque algunos triatominos tienen preferencia por ciertas especies, en particular aves y mamíferos, la mayoría de ellos se alimenta de una amplia variedad de hospedadores. La presencia de animales incrementa y preserva la población, pues éstos se constituyen en fuentes de alimentación; algunos pueden incluso ser predadores de triatominos, y a la vez desempeñar un papel en la dispersión pasiva de los vectores, constituyéndose como hospedadores y/o reservorios de ellos. Por otro lado, los factores climáticos, principalmente la temperatura, al parecer controlan el índice de incremento de las poblaciones de los triatominos.(Ministerio de Salud 2004).

Otros factores que contribuyen a la colonización, proliferación y manutención de los triatominos son: Las condiciones de edificación de las viviendas que crean microhábitats apropiados (en las construcciones de las viviendas se observan hendiduras y grietas en las paredes y techos de barro, cemento y hojas de palmeras), el uso de telas como cortinas, el almacenamiento de los productos de las cosechas, el depósito de adobes y el apilamiento de maderas y palos dentro de la casa, y, por último, la presencia de animales domésticos en el interior de las casas, como: cuyes, conejos, gallinas, pavos, perros, gatos, etc.(Vargas 2004).

Al momento o después de alimentarse, el triatominos hace una deyección líquida que puede presentar dos aspectos: uno de color amarillento que se seca rápidamente al contacto del aire, y otro que se seca lentamente y es de color negro. Este comportamiento de picar y defecar se debe a la necesidad del triatominos de succionar más sangre y almacenarla, desocupando su intestino.

2.1.1 Vectores de la Enfermedad de Chagas en el Perú:

En relación a la presencia de triatominos en el Perú se reconoce la existencia de 19 especies de triatominos (**Fig 3**) y en el Norte y nororiente se encuentra el 11% de la fauna conocida en América. El de mayor importancia epidemiológica por sus características de domesticidad, infestación domiciliaria, índices elevados de densidad, dispersión vectorial e incriminación en la transmisión es el *T. infestans*, única especie existente en el sur del país. Mientras que, en la selva nororiental, es *P. herreri* la especie responsable de la transmisión (Vargas 2004, Cuba y col. 2002).

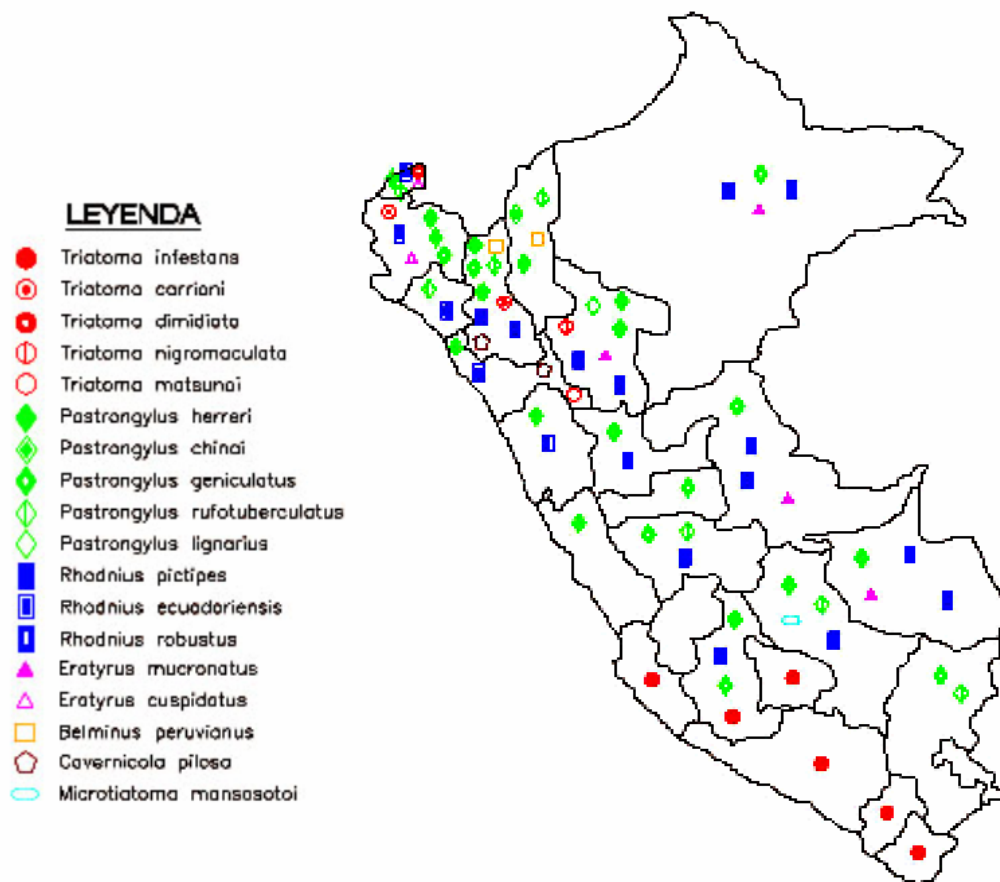


Fig. 3. Distribución de los triatominos en el Perú

Existen otras especies que han incrementado sus características de domiciliación tales como: *P. rufotuberculatus*, *R. pictipes*, *R. ecuadoriensis* y *P. chinai*, con estados de infección natural descrito en ellos (Vargas 1986a; 1986b; 1986c). Otros trabajos dan cuenta de la infección natural de algunas especies de triatominos con *T. cruzi* y *T. rangeli* (Cuba 1975, Calderón 1996, Vargas 1986a, Cuba y col. 2002), pero desconociéndose con exactitud la forma de transmisión silvestre y la potencial importancia epidemiológica de estos vectores.

2.1.2 Ciclo biológico de los vectores de la Enfermedad de Chagas

Los triatominos son insectos hemimetábolos: huevo, cinco estadios ninfales y adultos. Los estadios ninfales son de morfología semejante a los adultos pero de menor

tamaño y carente de alas. Los triatominos son de hábitos terrestres, colocando sus huevos individualmente o en grupo, en cualquier lugar que encuentre la hembra. Pero las especies que habitan en los árboles – como son la mayoría de especies de *Rhodnius* – colocan sus huevos en pequeños grupos adheridos al sustrato. Las hembras fértiles generalmente ponen huevos una sola vez, aunque se conocen casos en que la puesta se realiza durante toda su vida (Cuba 1975).

El ciclo de vida de los triatominos oscila entre 4 a 16 meses. Muchas especies han sido adaptadas a condiciones de laboratorio con temperaturas que fluctúan entre 24 °C y 27 °C, y a una humedad relativa entre 70% y 75%. Los huevos son ovopositados después 10 a 15 días de la cópula. El número de huevos puestos por hembra (100 - 600 huevos en la mayoría de los casos) y la frecuencia de la ovipostura depende principalmente de la cantidad de sangre ingerida. Los huevos son de forma oval, más o menos elípticos, presentan un opérculo en uno de sus extremos, por el cual emerge la ninfa I. Al inicio, los huevos son de color blanco-perla o gris, posteriormente cambian a rosado o rojizo a medida que el embrión desarrolla, observándose por transparencia los ojos de la futura ninfa. El tiempo que transcurre desde la puesta de los huevos hasta que eclosiona la primera ninfa varía según la especie; y para una misma especie cuando habitan en regiones diferentes. En algunas especies, el tiempo es de entre 10 y 30 días. La envoltura externa del huevo (corión) presenta ornamentaciones que varían según las especies.

Transcurridos dos a tres días después de emerger, las ninfas ya están listas para alimentarse de la misma variedad de hospedadores que sus adultos; de no conseguir alimento pueden pasar varias semanas en ayunas y sobrevivir durante períodos largos de inanición, llegando en algunos casos hasta 11 meses. Bajo buenas condiciones, las ninfas pueden ingerir sangre hasta nueve veces su peso, mientras que los adultos, aproximadamente, de 2 a 4 veces. Generalmente, las ninfas que están en el quinto estadio son las que absorben la mayor cantidad de sangre. Los triatominos adultos a diferencia de las ninfas presentan alas anteriores y posteriores bien desarrolladas; así como un par de ocelos fotosensibles en la parte posterior de la cabeza, justo por detrás de los ojos. Son sexualmente maduros, con los genitales completamente desarrollados. La hembra copula

sólo una vez y después de ser fecundada comienza la postura, antes de los 30 días. En algunas especies pueden observarse hasta 40 posturas que sobrepasan los 200 huevos. (Vargas y col. 2000b)

2.2 Los Parásito:

2.2.1 *Trypanosoma cruzi*

T. cruzi es un parásito que tiene dos tipos de hospedadores: como hospedador invertebrado (vector) a varias especies de la familia *Reduviidae*, hemípteros hematófagos, y como hospedador vertebrado a mamíferos y aves principalmente. La transmisión al mamífero es contaminativo, a partir de las heces del vector, teniendo como puerta de entrada la herida de la picadura, mucosas (conjuntivas), y piel intacta o lacerada (De Souza 1999).

Dependiendo del ambiente en el cual se encuentra, presenta distintas formas: amastigotes, epimastigotes y tripomastigotes. El amastigote es esférico u ovalado y constituye la forma de división intracelular (llamados pseudoquistes) en los tejidos del huésped mamífero. El epimastigotes de forma alargada con flagelo libre y kinetoplasto localizado anterior al núcleo; son la forma de división del tracto digestivo del vector y de los cultivos en medios artificiales. Los tripomastigotes son también de forma alargada, provistos de flagelo, kinetoplasto localizado posterior al núcleo y membrana ondulante a lo largo de su cuerpo. Es la forma infectante para los vertebrados, conocido como tripomastigote metacíclico presente en el vector. Existe otra forma de tripomastigote conocido como tripomastigote sanguíneo en el mamífero infectado, y es el responsable del establecimiento de la infección intracelular en el mamífero (tripomastigote delgado o forma slender) y de infectar al vector (tripomastigote grueso o “strout”) durante su alimentación (Tarleton 2000).

2.2.2 *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli*

T. rangeli, es un protozooario digenético, parásito de diversas especies de animales domésticos y silvestres, insectos triatominos del Género *Rhodnius* y también del hombre. Este flagelado está ampliamente diseminado en América Central y del Sur, muchas veces superponiendo su distribución geográfica con *T. cruzi*.

El *T. rangeli* fue descubierto en Venezuela por Tejera en 1920 y por el hecho de estar asociado con los vectores y reservorios del mal de Chagas, se han efectuado muchos estudios y enriquecido su investigación en diversas regiones del continente Americano. Actualmente, los aspectos fundamentales de la biología del parasitismo del *T. rangeli* como la epidemiología, continúan mal comprendidas y abiertas a la investigación interdisciplinaria básica y aplicada. La biología del parasitismo de *T. rangeli* en su huésped invertebrado, ofrece grandes desafíos en el campo de la investigación. En todos esos compartimentos (microhabitats con metabolismo diferente) el *T. rangeli* es capaz de diferenciarse y sufrir sorprendentes mudas morfogenéticas. Es pues, la gran plasticidad en su morfogénesis que hace de esta especie un modelo único en biología y fisiología celular (Cuba 1975).

Las cepas de *T. cruzi* o de *T. rangeli* están compuestas por poblaciones heterogéneas y su cultivo *in vitro* o inoculación en animales de laboratorio, nos pueden permitir seleccionar subpoblaciones de la mezcla original (Morel y col. 1980).

Si bien *T. rangeli* y *T. cruzi* son flagelados morfológica, bioquímica y biológicamente distintos, ellos presentan un principal problema epidemiológico, que se intensifica cuando comparten vectores del género *Rhodnius* y mamíferos reservorios, principalmente marsupiales. Por lo que, se considera de gran importancia el estudio del *T. rangeli*, la imperiosa necesidad de su correcta identificación y diferenciación con el *T. cruzi*. (Acosta y col. 1991, Marinkelle y col. 1985)

2.2.3. Índice de infección tripano/triatomino

La información actualizada del grado de domiciliación, ecótopos naturales y/o artificiales de los triatominos, en los diversos departamentos del noreste peruano, revela la existencia de una infección natural por *T. cruzi* / *T. rangeli* (Roldán y Vargas 1996), que los hacen vectores potenciales de estos parásito, y por consiguiente, un gran problema epidemiológico con riesgos de invasión peridomiciliar y domiciliar. (D' Alessandro y Saravia 1992).

T. rangeli es un parásito que llama la atención por ser patógeno para el vector pero apatógeno para el hospedero vertebrado. Una de las características más sobresalientes de *T. rangeli* es su capacidad de producir infecciones simultáneas con *T. cruzi* en el hombre, animales domésticos y silvestres y en los vectores, además de su desarrollo extraintestinal. (D'Alessandro y Saravia 1992) Por estudios de numerosos investigadores se conoce que la infección también puede ser transmitida por epimastigotes y tripomastigotes presentes en las heces del vector (método contaminativo), no obstante, se considera que la picadura del insecto (método inoculativo) es más eficiente (Cuba 1998).

Durante muchos años se han utilizado los términos *T. rangeli*-like, o tripanosomas semejantes al *T. rangeli*, o tipo-*rangeli*, a los flagelados presentes en los diversos huéspedes vertebrados y triatominos infectados naturalmente. D' Alessandro definió claramente que, para ser denominado un tripanosoma como *T. rangeli*, él debe evolucionar en la hemolinfa del triatomino, invadir sus glándulas salivares y ser transmitido por la picada al vertebrado susceptible. Todos éstos son parámetros biológicos son considerados indispensables en la identificación y caracterización del parásito. (Cuba 1975).

Es de conocimiento general que la susceptibilidad o resistencia entre los géneros y especies de triatominos a la infección por *T. rangeli*, varía grandemente, siendo las especies del género *Rhodnius* las más susceptibles a determinadas cepas de *T. rangeli*. A pesar de observar una elevada densidad de flagelados en el intestino y hemolinfa de *R. ecuadoriensis* experimentalmente infectado con *T. rangeli* (cepas peruanas), los flagelados no invaden las

glándulas salivares. Hecho real observado en una infección iniciada por xenodiagnóstico artificial de alimentación infectante, o con el uso de animales de laboratorio infectados (Vargas y col. 2000).

En un estudio con cepas de *T. rangeli* se desarrollan sin producir infección a nivel de las glándulas salivales de *R. prolixus*, *R. pallescens* o *R. ecuadoriensis*. Estos resultados surgieron que en la naturaleza las especies de *Rhodnius* son susceptibles solamente a ciertos grupos del parásito. En otras palabras el vector sería un filtro biológico en la transmisión de subpoblaciones genéticamente definidas de *T. rangeli*, (Vallejo y col. 2003).

Por otro lado, numerosos aislamientos de *T. cruzi* I (Z1) en diferentes regiones de América Latina, muestran una fuerte asociación entre especies de *Rhodnius*, *T. cruzi* I (Z1) y *Didelphis* (**Tabla I**). La subpoblación de *T. cruzi* Z3 está asociada en la cuenca del Amazonas con *P. geniculatus*, *Dasybus novemcinctus* (armadillo) y *Monodelphis breviceaudata* (marsupial) (Pova y col. 1984).

Tabla I. Asociación entre subpoblaciones de *T. cruzi*, ecótopos silvestres, triatominos y hospedadores

TRIATOMINO	Ecótopo silvestre	Subpoblaciones de tripanosomas	Hospedador asociado
<i>Rhodnius</i>	Palmas	<i>T. cruzi</i> I (Z1) <i>T. rangeli</i>	<i>Didelphis</i> <i>Didelphis</i>
<i>Panstrongylus</i>	Árboles diferentes a palmas	<i>T. cruzi</i> I (Z1)	<i>Didelphis</i>
<i>Panstrongylus</i>	madrigueras	<i>T. cruzi</i> (Z3)	<i>Dasybus</i> <i>Monodelphis</i>
<i>Triatoma</i>	terrestre	<i>T. cruzi</i> II (Z2)	<i>Cavia</i> <i>Leontocebus</i>

2.3 Reservorios de la enfermedad de Chagas en el Perú:

La importancia de los mamíferos en el ciclo silvestre del *T. cruzi* es destacada por numerosos autores (Ayaqui 1987). Los reservorios más importantes del *T. cruzi* son los mamíferos pequeños; sin embargo, todo mamífero es potencialmente buen reservorio (Náquira 2004, Vargas 2004, 2005).

En nuestro país, los principales reservorios son los roedores, *Cavia porcellus* «cuy», animales sinantrópicos como los ratones *Mus musculus* y las ratas *Rattus rattus*, *Rattus norvegicus* (Ayaqui y Cordova 1988, Vargas 2005), y en menor proporción otros mamíferos como los perros, los gatos, los cerdos, los conejos, los vacunos, los ovinos, los equinos, etc. Mamíferos silvestres como la zarigüeya y los monos también han sido hallados naturalmente infectados en nuestro país (Lumbreras 1972, Vargas 2005). Las tasas de infección de estos animales son variadas. Por estos motivos se justifica la necesidad de detectar en qué medida los mamíferos selváticos contribuyen a mantener la endemia en la región.

2.4. Seroprevalencia de la Enfermedad de Chagas

La situación de la enfermedad de Chagas en el Perú, se encuentra influenciada por factores epidemiológicos, bioecológicos y socioeconómico de la población rural. Las encuestas de seroprevalencia realizadas en áreas endémicas muestran variaciones del 0.7 - 12.0 %; la tasa de infección en Bancos de Sangre fluctúa del 3.0 - 12.0 %, siendo evidente la existencia de un notable subregistro de casos y un insuficiente conocimiento de la magnitud del problema. Se estima actualmente en 24,000 los casos infectados por *T. cruzi* en áreas endémicas de los cuales 1,200 corresponden a formas agudas u oligosintomáticas y 22,800 casos a formas crónicas de la enfermedad. De los cuales, 3,142 casos correspondan niños menores de 5 años. La afección por sexo es equitativa y el grupo de edad más afectado está entre los 20-54 años. (Córdova 1993)

2.5 Control de la Enfermedad de Chagas en el Perú

El control de la Enfermedad de Chagas en el Perú se ha caracterizado históricamente por el desarrollo de estrategias de erradicación vectorial del *T. infestans*, exclusivamente mediante rociamientos intermitentes y focalizados con diversos productos químicos, durante un período de 30 años en la región sur, vigilancia entomológica irregular, escaso componente de participación sectorial -comunitaria y sanitaria- que permita la prevención y mejoramiento de la vivienda, uso de insuficientes indicadores epidemiológicos y escasa orientación técnica relacionada con la situación operacional y epidemiológica del daño luego de éstas intervenciones. Como toda estrategia vertical los resultados iniciales sobre la infestación vectorial son satisfactorios, reiniciándose progresivamente la reinfestación en las áreas intervenidas hasta alcanzar los niveles de dispersión, transmisión e infección de la población, detectados en un inicio. (OPS-ACDI 2004, Vargas 2002b).

En el marco del documento técnico-político, "Lineamientos de Política del Sector Salud para el Quinquenio 2005 -2010", enunciado por el Ministerio de Salud se incluye a la Enfermedad de Chagas como uno de los daños relevantes de control prioritario en este quinquenio. La Dirección General de Salud de las Personas a través de la Dirección del Programa de Control de Enfermedades Transmisibles-Control de Malaria y OEM, plantea el establecimiento de un Programa de Control de la Enfermedad de Chagas con orientación estratégica, técnica, normativa y preventiva, integrada a los servicios de salud. Fortalecer una coordinación multisectorial amplia, adecuada vigilancia epidemiológica, manejo de un sistema de información epidemiológica que permita evaluar periódicamente el daño a fin de controlar y eliminar vectorialmente al *T. infestans* e interrumpir y vigilar la transmisión transfusional del *T. cruzi* en los Bancos de Sangre del país.(OPS-ACDI 2004).

Por los antecedentes y éxitos del Programa de Control de la Enfermedad de Chagas, a través de la llamada Iniciativa del Cono Sur (Argentina, Brasil, Bolivia, Chile, Paraguay y Uruguay) la WHO/TDR pasó a recomendar el empleo de dicha estrategia en los países con problema de endemia chagásica. Por lo que en el Perú, es necesario desarrollar y/o adaptar

estrategias de control que se adecuen a las condiciones entomológicas locales; así, los esfuerzos deben dirigirse hacia investigaciones epidemiológicas y entomológicas de especies de triatominos tanto domiciliarios como no domiciliarios (WHO 2000).

En nuestro país el conocimiento disponible sobre el impacto en Salud Pública, de la Enfermedad de Chagas es predominantemente el reportado para el Sur del país. Por ello los estudios epidemiológicos descriptivos de la prevalencia, incidencia y distribución geográfica de la endemia chagásica han sido y son conducidos en esa región (Lumbreras 1972, Barreda 1995, Hurtado y col. 2000)

El clásico estudio de identificación morfológica de los triatominos (Hemiptera, Reduviidae) ha avanzado con la utilización de modernas técnicas moleculares. Hoy las características fenotípicas y genotípicas de estos insectos permiten estudios minuciosos de especies crípticas; su filogenia y procesos evolutivos en su adaptación al ambiente intracelular. Asimismo, los estudios de genética de poblaciones ha contribuido en el reconocimiento de variantes de especies (*R. prolixus*, *R. colombiensis*, *T. brasiliensis*, *T. dimidiata*, *T. infestans*) en diversos países como Bolivia, Argentina, Brasil, Colombia, México, Ecuador. (Dujardin y col. 1997a, Borges y col.1999).

2.6. Caracterización bioquímica y molecular de cepas de *T. cruzi*/ *T. rangeli*

La diferencia en cuanto a la severidad de la enfermedad de Chagas en el hospedador humano y en otros mamíferos, se ha atribuido al pleomorfismo natural que presenta *T. cruzi*. Igualmente, se han encontrado grandes diferencias en el comportamiento de las cepas tanto "in vitro" como "in vivo". Esta variabilidad en su comportamiento biológico y la heterogeneidad que presentan, han impedido establecer parámetros adecuados para su clasificación y taxonomía, lo que ha hecho que su caracterización sea una condición necesaria para su estudio y control (Guzmán-Marín y col. 1999)

La variabilidad intraespecífica de estos parásitos, tradicionalmente ha sido estudiada por medio de la caracterización biológica: morfometría, curvas de parasitemia, patogenicidad, distribución geográfica, localización tisular y sensibilidad a drogas, pero

desgraciadamente la descripción de cepas o especies basada en estos parámetros son insuficientes. Además, es frecuente encontrarnos infecciones mixtas de *T. cruzi* y *T. rangeli* u otros flagelados no patógenos que infectan a los mismos hospedadores y se transmiten por los mismos vectores. Estos motivos son los que han llevado a los investigadores a la utilización de otros parámetros, con el fin de indentificar a estos parásitos: aglutinación por lectinas, perfiles isoenzimáticos, estudios del ADNk por medio de enzimas de restricción, estudios antigénicos con anticuerpos poli y monoclonales, análisis de secuencias ribosomales, amplificación del ADN polimórfico al azar (RAPD), lisis por complemento, son algunos de ellos.(Miles y col. 1977, Nunes y col..1997, Rodríguez y col. 1998, Miralles y col. 2002)

2.6.1 Aglutinación por Lectinas

Uno de los métodos bioquímicos de caracterización es el estudio de los carbohidratos de la superficie del flagelado del orden Kinetoplástido, a través de la aglutinación de lectinas.

Las lectinas son proteínas o glicoproteínas naturales de origen no inmune que pueden aglutinar células y reconocer específicamente unos determinados carbohidratos, uniéndose reversiblemente sin alterar la estructura covalente de los ligandos glicosídicos reconocidos. Están compuestas por una cadena polipeptídica que puede estar unida a uno o más residuos de carbohidratos (normalmente de 2 a 15 monosacáridos residuales) constituidos principalmente por dos o más azúcares como: D- Manosa, D-galactosa, D.Glucosa, L-fucosa, N-acetil-D-glucosamina, N-acetil-D-galactosamina, ácido salicílico, glucosamina y galactosamina (Perez Cornelio 1999)

La regulación en el desarrollo y comportamiento de la expresión de estos carbohidratos, aún está por resolverse. Sin embargo, hay algunas evidencias de los patrones de la expresión de receptores de lectinas en los parásitos y estos son distintos "*in vivo*" e "*in vitro*". Se ha intentado una caracterización intraespecífica de cepas de *T. cruzi* de distintas regiones de Sudamérica, mediante la aglutinación con lectinas, observándose una

aglutinación común con la *Concavalina ensiformis* (Con A), lectina del cacahuete (PNA) y lectina del germen de trigo (WGA) (Acosta y col. 1995, Piazza y col. 1996). Cuando se comparaba distintas cepas de *T. cruzi* con *T. rangeli*, se observaba que la lectina WGA, mostraba una débil o nula aglutinación en cepas de *T. rangeli* (Steindel y col. 1994). Schottelius observó dos tipos de aglutinación en distintas cepas de *T. cruzi*: el tipo I o tipo WGA, que aglutinaba con *Triticum vulgare* y *Aptos papillata II* y el tipo II o tipo PNA, aglutinaba *Arachis hypogaea* y *Aptos papillata II* (Schottelius y Unlenbruck 1984). Más tarde se observó en distintas cepas de *T. cruzi* colombianas, costariqueñas y mejicanas, que aglutinaban con las siguientes lectinas: *Ricinus communis* 120, *Glicina maximo*, *Helix pomatia*, *Axinella polypoides*, *Bandeiraea simplicifolia*, *Bauhinia purpurea*, *Wistaria floribunda*, *Abrus precatorius*, *Aptos papillata II*, *Iimax flavus* y *Arachis hypogaea*. Sin embargo, las lectinas *Concavalina ensiformis* y *Pisum sativum* reaccionaban tanto con cepas de *T. cruzi* como con cepas de *T. rangeli* (Schottelius y col. 1986; Marínkelle y col. 1986).

Esta técnica también ha servido para diferenciar claramente dos cepas de tripanosomas aislados del murciélago (*Phyllostomus hastatus*), mediante las lectinas WGA y *Bandeiraea simplifolia* (BSII), lectinas específicas para N-acetil-D-glucosamina, D-galactosa y D-manosa. También ha servido para diferenciar tripanosomas patógenos y no patógenos mediante las lectinas: *Bauhinia purpurea* y *Sophora japonica* (ambas con afinidad por la N-acetil-D-galactosamina), aglutinaban exclusivamente *T. cruzi*, mientras que la *Vicia villosa* (afinidad por la N-acetilgalactosamina), específica para *T. rangeli* y *Ulex europeus* y *Lotus tetragonolobus* (afinidad por la fucosa), reaccionaba solamente con *Trypanosoma conorhini* (Miranda y Pereira 1984).

En un estudio comparativo de *Leishmania donovani* aislado de un caso de leishmaniosis dérmica y *Leishmania tropica* aislado de un caso de leishmaniosis cutánea, presentaba una aglutinación selectiva para la lectina PNA, SBA y WGA, igual que la mayoría de cepas de *T. cruzi* sin embargo, *Herpetomonas* spp. eran positivas para PNA y WGA, mientras que para *Bodo* no lo era (Ghosh y col. 1990). Igualmente en otro estudio la lectina PNA distinguía dos subgéneros de *Leishmania* (Menezes y col. 1996).

En el laboratorio de Parasitología (Universidad de Granada), se han caracterizado diversas especies de *Phytomonas* aisladas de tomate y chirimoyo, empleando Con A, SBA, RCAI, UEAI, WGA, PNA, LCH, las que permitieron diferenciar claramente los distintos aislados de forma cuantitativa (Sánchez Moreno y col. 1995).

2.6.2 Análisis Isoenzimáticos

La electroforesis de isoenzimas es uno de los métodos empleados para detectar diferencias entre enzimas con propiedades catalíticas similares pero con distinta estructura molecular, lo que permite agrupar cepas de acuerdo a sus perfiles isoenzimáticos, que reciben el nombre de zimodemas (Rodríguez y col. 1998, Guzmán-Marín y col. 1999). Esta técnica ha sido frecuentemente utilizada para la caracterización no sólo de aislados pertenecientes al género *Trypanosoma*, sino también para otros miembros de la misma familia.

En este sentido, en 1979 consiguieron caracterizar 43 stocks del género *Leishmania*, aislados de diferentes órganos de diferentes pacientes, determinando que 37 de estos aislados se podían clasificar como *L. major* y los 6 restantes como pertenecientes a *L. tropica* (Rassam y col. 1979). Desde esta fecha hasta la actualidad, han sido numerosos los autores que utilizando esta técnicas han caracterizados diferentes aislado del género *Leishmania* (Belhadj y col. 2002).

También esta técnica ha sido utilizada para caracterizar a tripanosomas aislados de diferentes plantas y pertenecientes al género *Phytomonas* (Sánchez-Moreno y col.1995, Catarino y col. 2001).

Miles y col (1977 y 1978) introdujo la técnica de los perfiles isoenzimáticos en el estudio de *T. cruzi* identificando 3 zimodemas en cepas de Brasil. El zimodemo I es de origen selvático y circula entre animales triatominos selváticos y es infectivo para el hombre; el zimodemo II es de origen doméstico y comprende cepas aisladas de pacientes

con enfermedad de Chagas crónica y de animales domésticos; el zimodemas III comprende cepas de casos humanos autóctonos de Brasil y comparte el ciclo selvático, puesto que se ha aislado de armadillos y de algunos casos humanos con la forma aguda de la enfermedad (Brisse y col. 2000).

Además, esta técnica sirvió para demostrar la transferencia de parásitos del ciclo selvático al doméstico, así como la gran heterogeneidad isoenzimática relacionada con la distribución geográfica (Steindel y col. 1995, Mendonça y col. 2002). Otros autores observaron 6 grupos enzimáticos mayores de *T. cruzi* en Brasil, dentro de una gran variedad de hospedadores vertebrados e invertebrados en una amplia distribución geográfica (Brisse y col. 2000).

Esta técnica también es útil para estudiar subpoblaciones clonadas de una cepa, las cuales presentan diferencias entre sus patrones isoenzimáticos respecto a la cepa patrón, demostrando que las cepas del parásito pueden ser heterogéneas en su composición (Penin y col. 1998).

También se ha demostrado la existencia de patrones isoenzimáticos diferentes según la etapa del ciclo biológico en que se encuentra el parásito, número de bandas, posición e intensidad de las mismas, dan lugar a zimodemas distintos. Esto puede ser parte del proceso regulatorio asociado con cambios metabólicos y morfológicos del parásito. (Bogliolo y col. 1986, Higo y col. 2000).

En estudios realizados en México en pacientes con cardiopatía chagásica crónica, permiten suponer que los parásitos que afectan al corazón pueden tener zimodemas diferentes a los que afectan a vísceras huecas y que también hay zimodemas que pueden afectar tanto a corazón como vísceras huecas. (Mendoza y col. 1995).

2.6.3. Otras técnicas moleculares de caracterización

Otras técnicas han sido utilizadas en la caracterización de cepas de *T. cruzi*/*T. rangeli*, entre las que tenemos: RFLP de kADN, análisis de secuencias ribosomales, PCR, etc. (Souto y col. 1993, Brisse y col. 2000, Vallejo y col 2003)

El kinetoplasto es un orgánulo característico del orden Kinetoplastida, situado entre el núcleo y el flagelo. Su morfología varía según la etapa de desarrollo, en las formas de epimastigotes y amastigotes se presenta como una estructura oval con un ADN muy compactado; mientras que en las formas de tripomastigotes es redondeada a manera de cesta con el ADN más dispersado Este ADN es una condensación extra nuclear dentro de una región definida de la mitocondria (ADNk), que constituye cerca de 30% del ADN total del parásito. Esta conformado básicamente por una red de cerca de 20,000 a 30,000 minicírculos y 50 maxicírculos (homólogos del ADN mitocondrial) interrelacionados topológicamente, así como por cadenas lineales de distinto tamaño. La secuencia de maxicírculos es relativamente conservada, mientras que las secuencias de minicírculos son muy heterogéneas y se consideran para un mejor entendimiento en la rápida evolución de estos parásitos (Sturm y col. 1989). La desorganización de la red del kinetoplasto da lugar a la pérdida de la capacidad para activar cíclicamente la mitocondria y a menudo suelen ser letal para el organismo (Sturm y Simpson 1990).

La división del ADNk por endonucleasas de restricción produce fragmentos que se visualizan en geles de poliacrilamida por medio de RFLP y son característicos de los principales tripanosomatídeos, incluidos *T. cruzi* y *T. rangeli* (Morel y col. 1980).

Se conoce bastante sobre el análisis por las enzimas de restricción del ADNk de *T. cruzi*, pero está mucho más restringido este análisis en *T. rangeli*. Frasch y col. (1981), analizaron el ADNk de seis cepas simpátricas de *T. cruzi*. Los patrones de EcoRI son altamente heterogéneos, característica de la región de minicírculo de *T. cruzi* y contracta con los perfiles de los fragmentos de restricción homogéneos de *T. rangeli*.

Existen otras técnicas moleculares tales como marcadores nucleares que codifican ARN ribosomal 14 α y el miniexón (Souto y col. 1996), ARN spliced leader y genes promotores del ARN ribosómico (Nunes y col. 1997), se utilizan para diagnóstico diferencial de los tripanosomas americanos. En los últimos años se han utilizado técnicas de amplificación del ADN y de la subunidad pequeña del ARNribosómico 18s para caracterización de especies, para estimar el diagnóstico específico (Morel y col. 1980) así como para detectar variabilidad intraespecífica en *T. cruzi* (Cuervo y col. 2002, Mendonça et al. 2002). Otros resultados han mostrado que el análisis de los RFLP-ITS rADN, el análisis de la región 24s rARN, mini-exón y 18S rARN (Brisse y col. 2003) y de microsatélites de *T. cruzi* ha permitido realizar estudios de definición de la clonalidad de varias cepas y de reconstrucción filogenética (Macedo y col. 2001).

Durante más de 10 años se ha señalado que *T. cruzi* presenta una estructura genética predominantemente clonal, con restringida recombinación de manera que diversas líneas celulares individuales persisten como genotipos clonales estables y se propagan a través de amplias regiones geográficas (Tybayrenc y col. 1990, Brisse y col. 2003). La ocurrencia de eventos raros de intercambio genético, en una escala evolutiva, tendría profunda significado para la evolución adaptativa de *T. cruzi* a nuevos ambientes, incluyendo nuevos vectores y hospederos, entre ellos el hombre. (Machado y Ayala 2001)

Asimismo, tratando de comprender la variabilidad biológica de *T. rangeli* (las infecciones simultáneas en el hombre y triatominos vectores, el comportamiento biológico de las poblaciones de *T. rangeli* de diversos orígenes geográficos y la posible interacción con *T. cruzi* en el vector o en el vertebrado), se han realizado estudios de minicírculos de ADN de *T. rangeli*, análisis de polimorfismos del ADN mitocondrial, y encontraron diferencias genéticas en una molécula de ADN mitocondrial denominada KP1, en cepas de Brasil, Honduras, Colombia y Venezuela (Vallejo y col. 1994) Una divergencia genética similar entre estos dos grupos fue mostrada por Steindel y col. (1994) usando electroforesis de isoenzimas y amplificación aleatoria de regiones de ADN usando la reacción en cadena de la polimerasa (ASP-PCR). Una conclusión similar fue obtenida con el análisis del

cariotipo molecular de varias cepas de *T. rangeli* revelando la existencia de polimorfismo cromosómico (Toaldo y col. 2001).

2.6.4. Metabolismo energético

Los kinetoplástidos son organismos peculiares en que han desarrollado soluciones alternativas para dirigir sus vías catabólicas de los carbohidratos, pero no siempre son conocidos. (Opperdoes y Michel 2000). Durante el ciclo de vida de la familia Trypanosomatidae adapta su metabolismo a la disponibilidad del sustrato. La glucosa es la principal fuente de energía para muchas estrategias dentro de los hospedadores vertebrados e incluso intracelulares y del insecto, aunque de algunas estirpes de *Trypanosoma* y *Leishmania* pueden preferir aminoácidos (prolina y glutamato) a glucosa.

El metabolismo energético se desarrolla principalmente en la mitocondria y glicosoma (Opperdoes y Michel 1991) La glucosa entra a las células por difusión facilitada, sin embargo, se desconoce como entra al glicosoma. Estos tripanosomátidos, a diferencia de las células eucariotas, tienen las siete primeras enzimas glucolíticas (Opperdoes 1987), dos enzimas del metabolismo del glicerol y varias enzimas de la vía de las pentosas fosfato localizado en el glicosoma. (Sánchez Moreno y col. 1992) Este orgánulo, carece de las enzimas peroxisomales típicas (peroxidasa y catalasa), con la excepción de especies de *Crithidia* (Opperdoes 1995).

La compartimentación de la glucólisis dentro de los glicosomas es una característica de todo kinetoplástido, esto supone enzimas totalmente diferentes de las del citosol del hospedador. Estas enzimas glucolíticas son responsables de la conversión de glucosa a glicerol a través de 3-fosfoglicerato. Las tres últimas enzimas de la vía están presentes en el citosol. Como consecuencia, la síntesis neta de ATP ocurre en el citosol en la reacción catalizada por la piruvato kinasa (PYK), mientras que el consumo y producción de ATP están equilibrados en los glicosomas, sin embargo, no hay un cambio neto en el estado redox de NAD en estos orgánulos debido a la presencia de glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (GDH) glicosomal y la existencia de una lanzadera glicerol-3-fosfato/

dihidroacetona fosfato (G-3-P/DHAP) entre mitocondria y glicosoma. Esta lanzadera garantiza que el NADH producido en la reacción catalizada por el gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa (GAPDH) pueda oxidarse por la vía glicerol-3-fosfato oxidasa mitocondrial. Este proceso respiratorio no parece estar implicado en la transcripción de energía libre. Bajo condiciones anaerobias, el glicerol-3-fosfato glicosomal es convertido en glicerol, con la producción de ATP, la reacción inversa a través del glicerol kinasa. Esto sería posible por bajo potencial de fosfato y alta concentración de glicerol-3-fosfato en el glicosoma. El balance final de ATP glicosomal y NAD (bajo condiciones anaerobias), forman una molécula de glicerol y una de piruvato (en lugar de dos) por cada molécula de glucosa. (Opperdoes y Michel 2000).

Sin embargo, la organización de la vía glucolítica es básicamente similar en todo los kinetoplastidos, con algunas variaciones con respecto al número de glicosomas por flagelado y la concentración intraglicosomal de enzimas glucolíticas.

El mantenimiento de los carbohidratos como fuente de carbono y energía para todos los estadios del ciclo biológico de *T. cruzi* presenta una serie de rasgos excepcionales. La presencia de grandes concentraciones externas de carbohidratos, hace que el parásito no degrade completamente sus componentes, además en presencia de oxígeno y CO₂, los productos finales resultantes son ácidos dicarboxílicos (succinato y en menor proporción acetato y alanina para *T. cruzi* y piruvato para *Leishmania*) (Cazzulo 1994). *T. cruzi* no produce L-lactato ni malato, a pesar de mantener todo el complemento de las enzimas glucolíticas, la actividad del ciclo de Krebs, una fosforilasa y la cadena de transporte de electrones en el citocromo. La vía glucolítica no está regulada por los caminos clásicos de Embden-Meyerhof (por la hexokinasa y la fosfofructokinasa) si no que depende de una fosfoglicerato kinasa glicosomal, esto no permite controlar el flujo a través de esta vía metabólica. Estos parásitos carecen de la enzima lactato deshidrogenasa (Fairlamb 1990) que cataliza la reoxidación del NADH y dependen de la enzima malato deshidrogenasa (MDH) para regenerar NAD⁺, bajo condiciones anaeróbicas. Más tarde, se identificaron el NADH-fumarato reductasa que actúa en tándem con la MDH, reemplazando la lactato

deshidrogenasa de mamíferos, produciendo succinato que lo excreta al medio extracelular. (Opperdoes y Michel 1991)

Se ha mostrado en el metabolismo de carbohidratos de *T. cruzi* que el fosfoenolpiruvato sirve como aceptor primario para la reacción de fijación de CO₂ (Opperdoes 1995) que resultó con la formación de oxalacetato (OAA) y ATP, catabolizado por una fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPCK) glicosomal. (Cannata y Cazzulo 1985; Urbina 1987). El hecho de que estos parásitos sean muy eficientes en el uso de carbohidratos en condiciones aeróbicas, propone una vía PEPCK/Malato deshidrogenasa glucolítica auxiliar requerida para la reoxidación del pool NADH por la limitación de la cadena respiratoria mitocondrial (Cannata y Cazzulo 1985; Cazzulo 1994). Sin embargo, el hecho de que *T. cruzi* sea capaz de oxidar completamente aminoácidos (un proceso que requiere un metabolismo aerobio activo) no es compatible con una capacidad respiratoria limitada. Los electrones de coenzimas pueden ser donados directamente a la cadena respiratoria o puede entrar vía succinato, actuando como donador final de electrones, a través de la combinación NAD conectado al fumarato reductasa (funciona como un sumidero de electrones en condiciones anaerobias) y FAD conectado a una succinato deshidrogenasa, como propuso Denicola-Seoane (1992). En los tripanosomas africanos (*T. brucei*) el succinato es uno de los metabolitos centrales (Opperdoes y Michel 1991).

Una posible explicación para la presencia de PEPCK es posible por los requerimientos bioquímicos para el catabolismo completo de aminoácidos, los cuales utilizan directamente el ciclo de Krebs como intermediario a través del L-glutamato deshidrogenasa dependiente de NAD y excretan grandes cantidades de NH₄⁺. La ausencia de carbohidratos, además de acetyl-CoA, OAA o malato, acumularía al menos, para ser descarboxilados a PEP o piruvato respectivamente, los cuales podrían entonces reentrar al ciclo. La descarboxilación de OAA a PEP está catabolizada por PEPCK (bajo condiciones fisiológicas tiene baja afinidad por el CO₂ y PEP), también puede ser usada en la ruta gluconeogénica para la síntesis de glicoproteínas y ácidos nucleicos para el crecimiento en ausencia de carbohidratos, encontrados en epimastigotes de *T. cruzi*. (Urbina 1987).

El metabolismo cambia entre el glicosoma y la mitocondria implicada en el metabolismo de oxidación de aminoácidos: las formas sanguíneas de *T. brucei*, degradan glucosa diez veces más que *T. cruzi*; el flujo glucolítico es soportado por un cambio continuo de α -glicerofosfato y dihidroxiacetona fosfato entre el mismo compartimento. Además, este cambio metabólico entre los compartimentos subcelulares no parece ser un factor limitante para el metabolismo de estas células. Otra posible vía para la oxidación completa de aminoácidos derivados de esqueletos carbonados podría ser la descarboxilación del malato por la enzima málico dependiente NAPH mitocondrial, a piruvato. (Cannata y Cazzulo 1985; Cazzulo 1994). Sin embargo, esta ruta no permitiría la gluconeogénesis.

Durante el ciclo de vida de la familia Trypanosomatidae, se encuentra grandes variaciones en la disponibilidad del oxígeno, en formas tripomastigotes sanguíneos tienen oxígeno disponible, considerando ciertas estrategias en el intestino medio de los insectos pueden ser confrontadas con condiciones hipóxicas. Las formas tripomastigotes sanguíneas presentan diferencias en diferentes tripanosomátidos, en las formas epimastigotes de *T. cruzi* tienen una capacidad pobre para funcionar anaeróbicamente a diferencia de *T. brucei*. (Cazzulo 1984)

T. cruzi es dependiente de la cadena respiratoria y el metabolismo de glucosa se ve reducido durante la hipoxia. (Cazzulo 1984), además tiene la habilidad de detener su metabolismo de manera reversible. Es improbable la reducción significativa de fumarato en la familia Trypanosomatidae porque:

- ❖ La producción de succinato no funciona como un sumidero de electrones en condiciones anaerobias.
- ❖ No contienen una quinona especializada para la reducción eficiente del fumarato.
- ❖ Tienen un ciclo de Krebs únicamente para producir succinato, esto implica que la reducción del fumarato tiene que ocurrir a la vez como la oxidación del succinato, bioenergéticamente es un evento muy improbable en la mitocondria.

A pesar del papel esencial del CO₂ y PEPCK en los tripanosomátidos, el producto resultante, el OAA es convertido en citrato y metabolizado adicionalmente a succinato por las rutas de oxidación normales del ciclo de Krebs. (Denicola-Seoane 1992).

III. OBJETIVOS

El objetivo de la presente memoria es el estudio de la epidemiología de *T. cruzi* y *T. rangeli* y de sus mas importantes vectores en el norte y noreste de Perú, con enfoques metodológicos que permitan la caracterización bioquímica y molecular, e identificación de sub-poblaciones genéticamente definidas, asociadas con las diferentes formas clínicas de la enfermedad. Generándose una información de gran importancia, aplicable a las estrategias de control de esta enfermedad en el Perú.

IV. MATERIAL Y METODOS

4.1 Estudio de Triatominos Vectores:

4.1.1 Área de Estudio

El Perú está dividido en tres áreas geográficas: Región de la Costa (a lo largo del Océano Pacífico); Región Andina (montañosa) y la Región Amazónica.

El norte peruano, está dividido en tres partes (oeste, central y este) con los andes separando el Pacífico del lado Amazónico. Geopolíticamente está constituida por los Departamentos de Tumbes, Piura, Lambayeque, La Libertad, San Martín, Amazonas y Cajamarca y es en las localidades de estos Departamentos donde se ha realizado el estudio (**Fig. 4**).

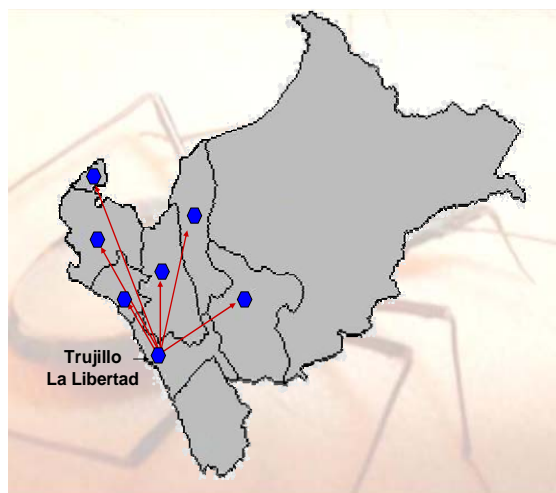


Fig 4. Áreas de muestreo en el norte y nororiente del Perú

La mayoría de las viviendas de estas localidades, están ubicadas en zonas urbanas y rurales de forma dispersa. El 8 % de las viviendas están ubicadas en zonas urbanas y presentan paredes de ladrillo con cemento, mientras que el 92 %, son de “adobe” y quinchas (bloques de 40 cm. x 25 cm. x 10 cm. de una mezcla de tierra húmeda con pajilla de arroz).

Las paredes internas y externas de algunas de estas viviendas se encuentran construidas de “tapias” (bloques de 1 m. x 25 cm. x 50 cm. de una mezcla de tierra húmeda con pajilla de arroz), o enlucidas con yeso; mientras que en otras viviendas se observan grietas en los adobes y hendiduras en las quinchas y en los tapias (**Fig 5**).

La gran mayoría de viviendas presentan dos a tres ambientes: dormitorio, cocina - comedor- cuyero (área de cría de cobayos) y la despensa o depósito, y utilizan piso de tierra, con calaminas, ramas de palmeras, maderas y/o cartón como techo.

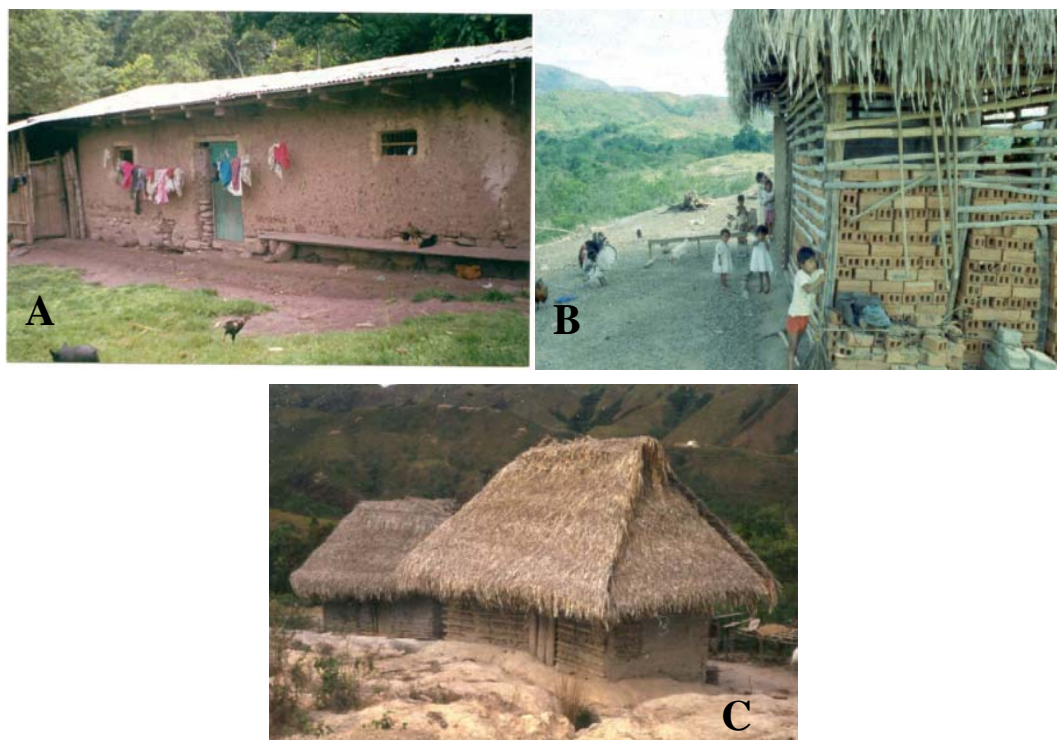


Fig 5. Casa triatomínica típica de áreas rurales de (A) la costa, (B) la sierra y (C) la selva.

4.1.2 Captura de triatomínos

Los triatomínos, han sido capturados utilizando linternas de mano, alambre y pinzas largas. Con tiempo de recolecta, triatomínos/vivienda, de 20 - 30 minutos, durante 9 a 10 horas.

Las capturas se realizaron, en el intra y peridomicilio (radio de 20 m. alrededor de la casa), buscando en grietas y hendiduras de las paredes internas y externas de las viviendas, de los muros de piedras y adobes próximos a las viviendas, troncos de madera, raíces de árboles, y nidos de gallinas o aves. Utilizando el método activo (captura manual hombre/hora: 20-30 min/casa) y métodos pasivos (sensores Cajas de Gómez Núñez y hoja

de papel). Posteriormente, los triatominos recolectados fueron colocados en frascos debidamente etiquetados, y trasladados al laboratorio referencial de Triatominos en el norte del Perú (Laboratorio de Protozoología - Universidad Nacional de Trujillo), para su identificación taxonómica y estudios de morfometría.

4.1.2.1 Obtención de Datos climatológicos

Durante el tiempo de realización de este estudio, se han registrado en un termo higrómetro, las medidas de temperatura y humedad relativa de los ecótopos (tanto del medio exterior como interior) en los que se han hallados los triatominos. Las coordenadas geográficas de latitud, longitud y altitud fueron determinadas usando un GPS (Global Position System).

4.1.3 Identificación taxonómica y análisis de triatominos

Los insectos recolectados de los diversos hábitats, fueron identificados empleando las claves de identificación taxonómica publicadas por Lent y Wygodzinsky (1979) y de acuerdo a lo sugerido por ECLAT (1998).

Los insectos fueron examinados de acuerdo a las técnicas estandarizadas por Vargas (1986c) y Cuba (1998) a fin de comprobar su infección natural con tripanosomátidos (*T. cruzi* y *T. rangeli*) y los parásitos encontrados se aislaron en medios de cultivo bifásicos para su posterior caracterización por métodos bioquímicos y moleculares.

4.1.4 Morfometría

Esta herramienta morfológica, permite estimar el grado morfométrico de las diferencias y por consiguiente, la distribución de la variabilidad genética entre poblaciones vecinas de una misma especie de triatominos. Muy importante en la epidemiología y control de los vectores de la enfermedad de Chagas.

El presente estudio ha sido realizado en ejemplares de *Panstrongylus herreri* y *Rohdnius ecuadoriensis*, por ser potenciales transmisores de *T. cruzi* y/o *T. rangeli* respectivamente, en el norte y noreste peruano. Utilizando el análisis morfométrico, se determinó las variaciones morfométricas de *P. herreri* y *R. ecuadoriensis* capturados en hábitats naturales (poblaciones naturales) geográficamente distantes y colonias de la primera generación (F₁) obtenidas en insectario (poblaciones de laboratorio).

4.1.4.1. Muestreo y tamaño muestral

El muestreo de los triatomos naturales para este tipo de estudio, fueron recolectados de viviendas de las localidades de Simbrón y Pampa Puquio del distrito de Cascas, provincia de Gran Chimú - La Libertad, inspeccionándolos en forma intradomiciliaria, registrando paredes resquebrajadas, adornos de pared, techos, camas, colchones, armarios, abrigos de insectos y corrales de *Cavia porcellus* “cuy”, gallineros u otros animales menores (si existieran en el intradomicilio). Los triatomos fueron recolectados en frascos de boca ancha conteniendo papeles con numerosos pliegues longitudinales a fin de dar refugio a los especímenes capturados los que fueron debidamente rotulados y trasladados al insectario para su evaluación respectiva.

Para estimar el tamaño muestral del número de triatomos, se empleó la fórmula:

$$n = \frac{4pq}{E^2}$$

p = presencia

q = ausencia

E = error (1%)

Luego de haber aplicado el muestreo piloto con n = 6 casas para Simbrón y n = 21 casas para Pampa Puquio, con E = el 1% dando un tamaño muestral menor a la unidad, se decidió mantener el tamaño del muestreo piloto; lo que significa un “n” total de 20 unidades muestrales por población y sexo.

4.1.4.2. Obtención de la primera generación (F₁) de *R. ecuadoriensis*

Se empleó especímenes adultos machos y hembras colocándolos en parejas (de sexos diferentes) dentro de recipientes cilíndricos de plásticos conteniendo papel con pliegues y tapados con mallas para permitir el intercambio gaseoso, a fin de obtener la población adulta de la generación F₁, bajo condiciones de humedad y temperatura correspondientes al insectario (T°: 24° ± 1°C y H°R: 85%). Una vez obtenida la población de adultos F₁, se procedió a escoger al azar 20 especímenes adultos hembras y 20 machos para su estudio morfométrico.

4.1.4.3. Métricas morfométricas

4.1.4.3.1 Medida alar y cefálica:

Los triatomíneos fueron disectados conservando cabezas y hemielitros, material con el que se procedió a realizar el montaje respectivo:

a) Montaje permanente de cabezas:

El montaje se realizó empleando puntas entomológicas en el cual se impregnó la cabeza del triatomíneo empleando como sustancia adhesiva esmalte; los especímenes fueron rotulados colocando el lugar de procedencia, especie, sexo y número de muestra.

b) Montaje permanente de hemielitros:

Se realizó empleando la técnica de montaje entre lámina y laminilla. Se colocó una gota de solución de montaje (bálsamo de Canadá) en una lámina y se dispuso los hemielitros en sentido transversal a la lámina para facilitar la toma de puntos homólogos de medición, posteriormente se cubrió con una laminilla y se dejó secar a temperatura ambiente haciendo la rotulación respectiva.

c) Captura de puntos homólogos de medición en cabeza y hemiélitro.

Para el análisis morfométrico se empleó cabezas y hemiélitros preparados como se ha descrito anteriormente. La captura de puntos homólogos de la cabeza se realizó empleando un estereoscopio con aumento de 4,8 y cámara lúcida con 20 aumentos. Se tomó 9 puntos homólogos en vista dorsal de la porción posterior de la cápsula cefálica (**Fig 6**), que correspondieron a los siguientes:

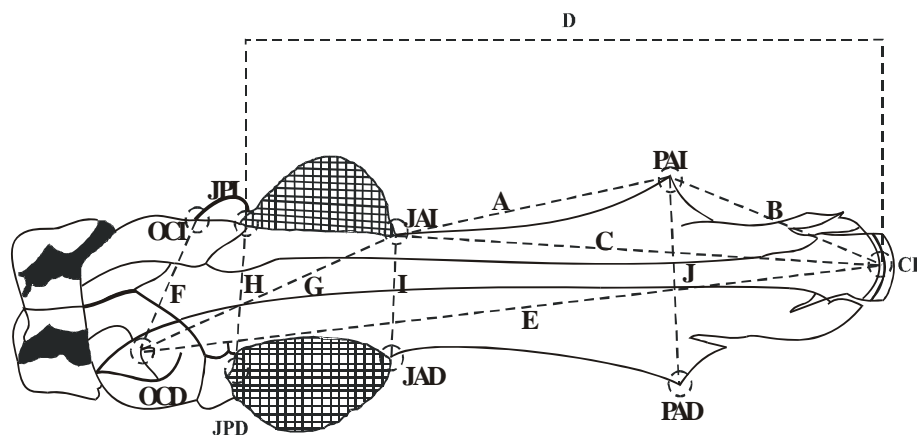


Fig.6. Puntos homólogos de medición y distancias morfométricas de la porción posterior de cápsula cefálica en vista dorsal de un espécimen adulto de *R. ecuadoriensis*. Caracteres Morfométricos: A: Distancia entre PAI y JAI; B: entre PAI y CL; C: entre JAI y CL; D: entre JPI y CL; E: entre OCI y CL; F: entre OCI y OCD; G: entre OCD y JAI; H: entre JPI y JPD; I: entre JAI y JAD; J: entre PAI y PAD.

PAI: Pedúnculo antenífero izquierdo, ángulo externo de la extremidad del pedúnculo antenífero. JAI: Junción izquierda entre el borde anterior del ojo y el tejido de la cabeza. JPI: Junción izquierda entre el borde posterior del ojo y el tejido de la cabeza. OCI: Ocelo izquierdo, junción entre el borde posterior del ocelo y el tejido de la cabeza. OCD: Ocelo derecho, junción entre el borde posterior del ocelo y el tejido de la cabeza. JPD: Junción derecha, entre el borde posterior del ojo y el tejido de la cabeza. JAD: Junción derecha, entre el borde anterior del ojo y el tejido de la cabeza. PAD: Pedúnculo antenífero derecho, ángulo externo de la extremidad del pedúnculo antenífero. CL: Clypeos, punto mediano del borde anterior del clypeo. Igualmente se tomaron también 4 puntos homólogos en vista dorsal de la porción anterior de cápsula cefálica (Dujardin 1999a) empleando un

estereoscopio con 4,8 aumentos y cámara lúcida con 20 aumentos (**Fig. 7**) siendo los puntos homólogos los siguientes:

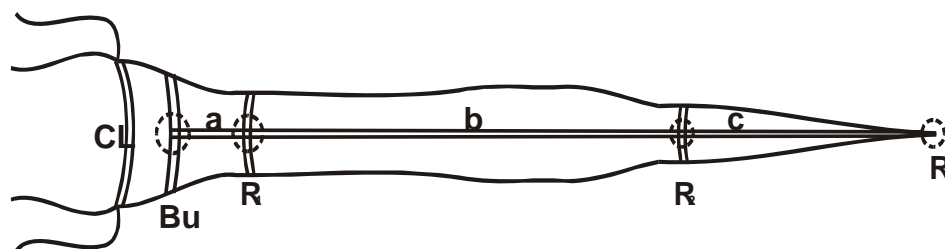


Fig. 7. Puntos homólogos de medición y distancias morfométricas tomados de la porción anterior de la cápsula cefálica en vista dorsal de un espécimen adulto de *R. ecuadoriensis*. Caracteres Morfológicos: a: Distancia entre BU y R₁; b: entre R₁ y R₂; c: entre R₂ y R₃

BU: Buccula, unión visible entre el primer segmento del rostro y la buccula. R₁: Extremidad distal del primer segmento del rostro. R₂: Extremidad distal del segundo segmento del rostro. R₃: Extremidad distal del tercer segmento del rostro

*De manera similar se tomaron 7 puntos homólogos de medición en los hemielitros (izquierda y derecha) (Dujardin 1999a) utilizando estereoscopio con 16 aumentos y 12,8 aumentos en cámara lúcida (**Fig.8**) siendo los puntos homólogos los siguientes:

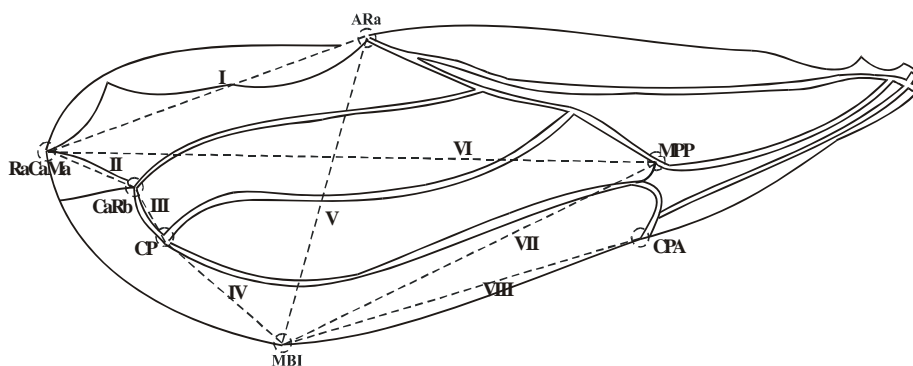


Fig. 8. Puntos homólogos de medición y distancias morfométricas tomados de hemielitros de un espécimen adulto de *Rhodnius ecuadoriensis*. Caracteres Morfológicos: I: Distancia entre ARA y RaCaMa; II: entre RaCaMa y CaRb; III: entre CaRb y CP; IV: entre CP y MBI; V: entre MBI y ARA; VI: entre RaCaMa y MPP; VII: entre MBI y MPP; VIII: MBI y CPA.

ARA: Entrecruzamiento entre vena auxiliar y R₂₊₃ (a). RaCaMa: Entrecruzamiento entre la vena R₂₊₃, curvatura de R₂₊₃ y zona media apical. CaRb: Entrecruzamiento entre curvatura

de R_{2+3} y R_{4+5} (b). CP:Entrecruzamiento entre cubital y postcubital. MBI Punto medio del borde interno. CPA: Entrecruzamiento entre curvatura de postcubital y vena axilar. MPP: Entrecruzamiento entre medio y prolongación de postcubital.

4.1.4.3.2 Distancia entre los puntos homólogos

La toma de puntos homólogos de medición se realizó separadamente hembras y machos en cada uno de los grupos poblacionales de acuerdo al lugar de origen. En el estudio se empleó una de las modalidades conocidas en el análisis morfométrico, la morfometría tradicional según Dujardin (1999a), como se detalla a continuación:

Se realizaron 10 mediciones de las distancias entre los 9 puntos homólogos tomados de la porción posterior de cápsula cefálica en vista dorsal (**Fig. 4**), mediciones que fueron denominadas caracteres y obtenidas con un vernier calibrado en milímetros (mm) como se indica:

- Distancia entre PAI y JAI.
- Distancia entre PAI y CL.
- Distancia entre JAI y CL
- Distancia entre JPI y CL
- Distancia entre OCD y CL
- Distancia entre OCI y OCD
- Distancia entre OCD y JAI
- Distancia entre JPI y JPD
- Distancia entre JAI y JAD
- Distancia entre PAI y PAD

También se realizaron 3 mediciones de las distancias entre los puntos homólogos de la porción anterior de cápsula cefálica en vista dorsal (**Fig. 5**), como se indica:

- a. Distancia entre BU y R1
- b. Distancia entre R1 y R2

c. Distancia entre R2 y R3.

De manera similar se tomaron 8 mediciones empleando los puntos homólogos tomados en los hemiólitros (**Fig. 6**) como se detalla a continuación:

- I. Distancia entre ARa y RaCaMa
- II. Distancia entre RaCaMa y CaRb
- III. Distancia entre CaRb y CP
- IV. Distancia ente CP y MBI
- V. istancia entre MBI y ARa
- VI. Distancia entre RaCaMa y MPP
- VII. Distancia entre MBI y MPP
- VIII. Distancia entre MBI y CPA

4.1.5 Análisis numérico

Las mediciones fueron introducidas en un programa computarizado y se procedió a realizar la verificación de la precisión y exactitud de las mediciones realizadas (denominados caracteres), así como de precisar los errores en la entrada de la misma.

Para el análisis morfométrico de los datos se empleó los programas Windows XP[®] y Excel[®], así como los softwares estadísticos MICROSTA[®] Versión 1.2 (Dujardín 1999a) procediéndose a estimar la media (X), varianza (S^2), desviación estándar (DE.), coeficiente de variación (CV.) y comparación de medias empleando el estadístico “t”, análisis de correlación y regresión de los caracteres cefálicos y hemiólitros, con la finalidad de conocer la variación de los caracteres morfométricos, asimismo se empleó el programa Numerical Taxonomic System (NTSYS[®]) vr 2.01 para determinar las distancias taxonómicas entre individuos, para lo cual se tuvo como base el valor de los coeficientes de similitud obtenidos a

partir de la Matriz Básica de Datos (MBD) y se empleó para tal fin la Técnica de Agrupamiento de Unión Promedio (UPGMA)

4.2 Aislamiento de cepas de *T. cruzi*/ *T. rangeli*

4.2.1 Origen de los Aislados

En estos estudios se han utilizado siete tripanosomas (**Tabla 2**), aislados de diferentes áreas geográficas de Perú y Brasil.

Tabla 2. Aislados procedentes de Perú y Brasil

AISLADO	HOSPEDADOR VECTOR	LOCALIDAD	FECHA DE AISLADO
TP	<i>Panstrongylus chinai</i>	Perú	2002
TCII	<i>Triatoma infestans</i>	Perú	2002
TRa	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Perú	2001
TRh	<i>Rhodnius prolixus</i>	Brasil	2001
TM	<i>Didelphys marsupialis</i>	Brasil	2002
TH	Humano	Brasil	2001

El tripanosoma denominado como TP fue aislado en la zona norte de Perú de la hemolinfa de un triatomino (*Panstrongylus chinai*). El flagelado TCII fue aislado en el sur de Perú de un triatoma (*Triatoma infestans*). TRa, fue aislado de las glándulas salivales de un *Rhodnius ecuadoriensis*, en la región La Libertad. Los otros tres aislados proceden de la región amazónica (Manaos-Brasil), uno de ellos; TRh, aislado de *Rhodnius prolixus*, TM de un marsupial y TH de sangre de un humano asintomático. Igualmente en este estudio se ha incluido a un tripanosoma (TCI) tipificado como perteneciente a la cepa Maracay aislado de un caso clínico en la División de Malariología Sanidad Ambiental de Maracay (Venezuela).

4.2.2. Cultivo de los aislados

4.2.2.1 Aislamiento

Los tripanosomas aislados fueron inicialmente transferidos a un medio de cultivo bifásico compuesto de una fase sólida: medio Nicolle-Noví-Neal (NNN) [2% agar con 10% de sangre de conejo o caballo] y una fase líquida: medio MEM (Sigma®)[20% v/v SBFÍ (suero bovino fetal inactivado a 56°C durante 30 minutos)]. Es necesaria la adición de una mezcla antibiótica y antimicótica para evitar contaminación por bacterias, hongos y levaduras.

Los cultivos exentos de contaminantes fueron clonados y transferidos a un medio de cultivo monofásico. Se ensayaron cinco medios de cultivo monofásico diferentes (**Tabla 3**), suplementados con SBFÍ (Suero Bovino Fetal Inactivado), con el fin de averiguar que medio es el idóneo para el crecimiento de los diferentes aislados.

Los medios se prepararon en un ambiente estéril (cámara de flujo laminar) por filtración desgerminizante a presión, mediante filtros estériles Sartorius (Sartolab p-20) de tamaño de poro de 0,22 µm, tras lo cual se les suplementan suero bovino fetal previamente inactivado a 56°C durante 30 minutos (SBFÍ) (GIBCO®).

Los tripanosomátidos se mantuvieron en frascos de cultivo celular de 25 ml. (Roux) conteniendo 5 ml de medio de cultivo fresco y bajo condiciones de esterilidad. Los parásitos se sembraron a una concentración aproximadamente de $5 \cdot 10^4$ cél/ml, manteniéndolos en una estufa a 28°C. Al cabo de 24 horas se realizó una resiembra para evitar una posible contaminación por restos de agar-sangre y parásitos muertos del primocultivo. El nuevo pase se realizó una vez alcanzada la etapa de crecimiento estacionario, aproximadamente a los 4 ó 5 días.

Tabla 3.- Medios de cultivo

Medios	Suero bovino fetal	Referencia
Grace's	10 %	Sigma ®
TC 199	20%	Gibco ®
RPMI-1640	10%	Gibco ®
SDM-79	10%	Brun y Schöenberger 1979
MTL	10%	Ruiz-Pérez y col. 1986

4.2.2.2. Crioconservación

Para ello se transfirió a un contenedor estéril de fondo cónico (sterilin) 1×10^6 cél/ml (densidad de crecimiento óptimo para congelar) concentrados mediante centrifugación a 1500 rpm durante 10 minutos y a 4°C. El sedimento o pellet obtenido se resuspendió en medio de congelación (medio Grace's más 10% de glicerol estéril). Dicha suspensión se pasó a viales de congelación estériles de 1,8 ml de capacidad (Corning), los cuales se guardan en un contenedor Cryo 1°C (Nalgene) conteniendo alcohol isopropílico, de modo que la temperatura descienda a una velocidad de 1 °C/min. Finalmente dicho contenedor se lleva aun congelador de -80°C y al cabo de 24 horas los viales de congelación se trasvasan a unos cilindros con nitrógeno líquido para una mejor preservación.

La recuperación de los parásitos se obtiene por descongelación rápida, en estufa de 37°C, con el fin de evitar la destrucción de las estructuras intracelulares, ocasionado por la formación de cristales.

4.2.2.3 Obtención de masa Celular

Para obtener masa celular para llevar a cabo el estudio de caracterización bioquímica, se tomaron 100 ml de medio de cultivo de cada aislado cultivado, con una concentración aproximadamente de 2×10^7 células/ml que se centrifugaron a

1500g durante 10 minutos, se lavaron dos veces en tampón fosfato y se congelaron a -20°C hasta su utilización.

4.2.3 Cuantificación de metabolitos

4.2.3.1 Curvas de Crecimiento y de pH

Para realizar el estudio de las curvas de crecimiento y pH, los parásitos se sembraron en falcons de plástico (Nunc) de 175 ml de capacidad a partir de una densidad inicial de 1.10^6 parásito/ml para un volumen total de 50 ml para cada uno de los medios de cultivo monofásicos a ensayar (descritos en el apartado 4.2.2.1).

La densidad de crecimiento se determinó mediante conteo de flagelados cada 24 horas en una cámara hemocitrométrica de Neubauer durante un período de 5 días, tiempo en que alcanza el crecimiento estacionario.

Para la determinación del pH del medio, previamente se centrifugaron a 1500g durante 10 minutos para eliminar los flagelados y medidas el pH al sobrenadante resultante. La cuantificación se hizo cada 24 horas durante los cinco días de cultivo.

4.3 Caracterización de cepas de *T. cruzi*/ *T. rangeli*

4.3.1 Test de Aglutinación con Lectinas

El test de aglutinación con lectinas utilizado fue descrito por Schottelius (1982). Las lectinas usadas en este experimento, se exponen a continuación en la **Tabla 4**, fueron suministradas por la casa comercial Sigma

Tabla 4.- Lectinas.

Lectina	Origen	Carbohidrato específico
Concavalina A (Con A)	<i>Concavalina ensiformis</i>	α -D Man, α - D Glc
<i>Vicia villosa</i>	<i>Vicia villosa</i>	GalNAc
Germen de trigo (WGA)	<i>Triticum vulgare</i>	(glcNAc) ₂ , NeuNAc

Partimos de 5 ml de cultivo en medio Grace's, con una concentración de formas epimastigotes de los diferentes aislados de 10^7 cél/ml. Seguidamente el cultivo fue centrifugado por tres veces a 1500g durante 10 minutos a 4°C de temperatura. En cada centrifugación lavamos el sedimento con tampón PBS-SBF (PBS adicionado con 0,5% de Suero Bovino Fetal), y finalmente las células fueron resuspendidas en 1 ml de dicho tampón. Como control de inhibición se ha usado VGA (125 μ g/ml) pre-incubado con un volumen equivalente de 0,1 M en N-acetil-D-glucosamina, VV (125 μ g/ml) con 0,1 M de N-acetil-D-galactosamina y Con-A (125 μ g/ml) con α -D-glucosa y α -D- manosa, durante 10 minutos.

Cada una de las lectinas han sido disueltas en PBS y usada a concentraciones finales de 5, 15, 20 y 50 μ g/mL, mezclándose (1:1) con una suspensión de los tripanosomas (10^7 epimastigotes/ml). La resuspensión fue distribuida en placas de microtitulación a razón de 25 μ l por pocillo, incubándose durante 1 hora a temperatura ambiente. (Acosta y col. 1991).

El grado de aglutinación fue determinado sobre una escala subjetiva, cuyo rango va de negativo (-) a positivo (+, ++, +++), de acuerdo con lo propuesto por Zubiatur y Alonso (1985).

4.3.2 Caracterización Isoenzimática

4.3.2.1 Bases teóricas

La electroforesis permite estudiar la migración de moléculas dentro de un campo eléctrico. Sobre los geles, la velocidad de migración depende únicamente de la carga eléctrica de las moléculas.

Las isoenzimas, enzimas que catalizan el mismo sustrato, tienen una migración diferente en la electroforesis y son el reflejo directo del polimorfismo del ADN. Las diferencias de migración observadas, traducen diferencias en cuanto a la carga neta de las proteínas estudiadas. Estas diferencias de cargas son el reflejo de la estructura primaria (secuencias de aminoácidos) de las proteínas en cuestión, depende directamente de la secuencia de ADN que codifica la proteína.

4.3.2.2 Elección de los Sistemas Enzimáticos

Se han elegido los siguientes sistemas enzimáticos por su claridad de revelación e interpretación y por su significación en el metabolismo energético del *T. cruzi*: Enzima málico (EM) [E.C.1.1.1.40], Malato deshidrogenasa (MDH) [E.C.1.1.1.37], Isocitrato deshidrogenasa (IDH) [E.C.1.1.1.42], Glucosa fosfatisomerasa (GPI) [E.C. 5.3.1.9], Fosfoglucomutasa (PGM) [E.C.2.7.5.1], Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa (G6PD) [E.C.5.3.1.9], 6-Fosfogluconico deshidrogenasa (6-GPD) [E.C.1.1.1.44]. Superóxido dismutasa (SOD)[E.C.1.15.1.1], se determinó siguiendo el protocolo de Beber y Fridovic (1987).

4.3.2.3 Técnica de Isoelectroenfoque

Ebert (1982) indicaba que la técnica de isoelectroenfoque, es un método muy sensible que permite el reconocimiento de diferentes stocks en el complejo *T. cruzi* más fácilmente que otros métodos convencionales.

Los tripanosomas obtenidos según el apartado 4.2.2.3, fueron resuspendidos a una densidad de 2×10^9 células en 2 ml de una solución hipotónica estabilizadora (2mM EDTA, 2mM 13-aminocaproico, 2mM ditioneitol) (Golfrey y Kilgour, 1976) (compuestos suministrados por la casa comercial Sigma).

Posteriormente fueron congelados a -80°C durante 15 minutos y descongelados a temperatura ambiente, proceso que se repitió tres veces. Para asegurar la lisis de estos organismos se sometieron a ultrasonidos en un aparato sonicador (Vibra Cells, Sonics y Materials Inc Danbury CT, USA), a 60 ciclos/sg, sumergiendo la sonda 1 cm en el líquido en intervalos de 30 segundos tres veces, teniendo un periodo de reposo de 1 minuto entre cada intervalo. Una vez lisados los tripanosomas fueron centrifugados a 8000g durante 20 minutos a 4°C (Sánchez-Moreno y col. 1992).

El sobrenadante se pasó por una columna PD-10 (Sephadex G-25) (Pharmacia Biotech) para eliminar sales que pueden causar distorsión en la formación de bandas sobre los geles. Seguidamente se determinó la concentración de proteínas mediante el método Bradford (Bradford 1976) y se hicieron alícuotas en tubos eppendorf a una concentración entre 10-20 $\mu\text{g/ml}$ de proteína, se almacenan a -20°C hasta su utilización.

Las enzimas se separaron por isoelectroenfoque usando Phastsystem (Pharmacia) y geles de poliacrilamida de rango de pH (pI) 3-9 (Phas-gel IEF-3-9) suministrados por la misma casa comercial. A los geles se les realizó un pre-enfoque bajo las siguientes condiciones: 2000 mV; 2,5 mA; 3,5 W; 75Vh;

aplicando la muestra de la solución proteica (15 µg/ml) en el centro, parte superior o inferior del gel, según la enzima a revelar.

Una vez finalizada la electroforesis, los geles fueron colocados en una placa de petri, donde se llevó a cabo el proceso de revelado siguiendo los procedimientos descritos por Ben Abderrazak y col. (1993) que se reflejan en la **Tabla 5.**

Tabla 5.-

Enzima	Tampón de reacción	Solución de Tinción
GPI	1 (1/4)	10 mg fructosa 6 fosfato, 5UI Glucosa-6fosfato deshidrogenasa, 50 mg MgCl ₂ , 5 mg NADP, 2 mg MTT y 4 mg PMS
IDH	2(1/10)	10 mg D-L ácido isocítrico, 50 mgr MgCl ₂ , 5 mg NADP, 2 mg MTT y 4 mg PMS
MDH	2(1/10)	0,9 ml ácido málico pH 7.0 (D-L-ácido málico), 4 mg NAD, 2 mg MTT y 4 mg PMS
EM	1 (1/4)	0,9 ml ácido málico pH 7.0 (D-L-ácido málico), 50 mg MgCl ₂ , 5 mg NADP, 2 mg MTT y 4 mg PMS
PGM	2 (1/4)	20 mg glucosa 1 fosfato 8 UI glucosa-6-fosfato deshidrogenada, 50 mg MgCl ₂ , 5 mg NADP, 2 mg MTT y 4 mg PMS
6-PGD	2 (1/4)	10 mg ácido fosfogluconico, 50 mg MgCl ₂ , 5 mg NADP, 2 mg MTT y 4 mg PMS
G6PD	1 (1/4)	5 mg glucosa 6 fosfato, 50 mg MgCl ₂ , 5 mg NADP, 2 mg MTT y 4 mg PMS

El tampón de reacción: indica la dilución del tampón 1 y 2 para un volumen total de 10ml. Tampón 1 (1M Tris-HCl pH 7.0) Tampón 2 (1M Tris-HCl pH 8.0).

La incubación de las enzimas con las soluciones específicas de tinción se realizó a 37°C y en oscuridad, hasta la aparición de las bandas. Una vez reveladas, se fijaron sumergiendo los geles en una solución de ácido acético al 10% durante 5 minutos, después se dejó secar a temperatura ambiente y en oscuridad.

Para determinar la actividad de la enzima SOD (Superóxido dismutasa), se utilizó el ensayo negativo donde se determina la inhibición de la reducción del azul de nitrobluetetrazolio (NBT) fotoquímicamente, según lo descrito por Beyer y Fridovich (1987). Los geles fueron sumergidos en 10 ml de una solución stock e incubados bajo la luz ultravioleta a temperatura ambiente hasta la aparición de bandas.

4.3.3. Identificación de Metabolitos excretados por Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear de Protones (RMN¹H).

Se inicio a partir de 25 ml de un cultivo de tripanosomas, con una concentración de $6,4 \times 10^5$ cél/ml, en medio de cultivo Grace's. Se toma una muestra de 3ml del cultivo cada 24 horas durante 5 días. Se centrifugaron a 1500g durante 10 minutos a una temperatura de 4°C y se almacenó a -20°C hasta su utilización en el estudio de espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear de Protones (RMN¹H).

El proceso fue llevado a cabo por el personal especializado de los Servicios Técnicos de la Universidad de Granada. Los espectros de RMN¹H se obtuvieron a 300 MHz y 400 MHz en un aparato Bruker AM-300 y ARX-400 respectivamente, usando la transformada de Fourier con una detección en cuadratura. La temperatura de pulso es de 90°, anchura de barrido (Sweep Width) SW=15 ppm (4000-6000 Hz), tiempo de repetición total 2 segundos y 160 acumulaciones, resolución digital TD= 64K y número de puntos SI= 64K. Los desplazamientos químicos son expresados en partes por millón (ppm), empleando como señal de referencia standard el Sodium 2,2-Dimethyl-2-Silapentone-5-Sulphonate (DSS).

Estos desplazamientos usados para identificar los respectivos metabolitos estaban en concordancia con los descritos por Gilroy (1988) y Sánchez-Moreno y col. (1992). Una serie de controles con metabolitos puros se llevaron a cabo adicionándose éstos al medio de cultivo, anotándose sus espectros.

4.4 Tratamiento Estadístico

La metodología de trabajo a emplear se basa en el Análisis Cluster Jerárquico por individuos. Para ello se seleccionó la distancia euclídea al cuadrado como base para medir las asociaciones entre los individuos. Debido a que nos encontramos ante la clasificación de siete aislados, se procedió a medir 52 variables. En el procedimiento de selección se ha considerado el linkaje promedio entre grupos, mediante el coeficiente R_k de Rand, que es un índice del parecido entre clasificaciones. Este análisis ha sido realizado mediante un programa StatGraphics en versión 5.0

V. RESULTADOS

5.1. Estudio de Triatominos vectores

En el presente estudio se obtuvieron nuevos hallazgos sobre la biogeografía de los triatominos del norte peruano. Se han colectados e identificado seis especies de triatominos hematófagos (**Fig 9**). Asimismo, se ha investigado su capacidad vectorial e Índices de Infección tripano/triatomino.

Estas especies están mostrando fuerte comportamiento sinantrópico, debido probablemente a la complejidad ecológica en cada región de estudio (zonas de áreas secas y húmedas hasta 4900 msnm)

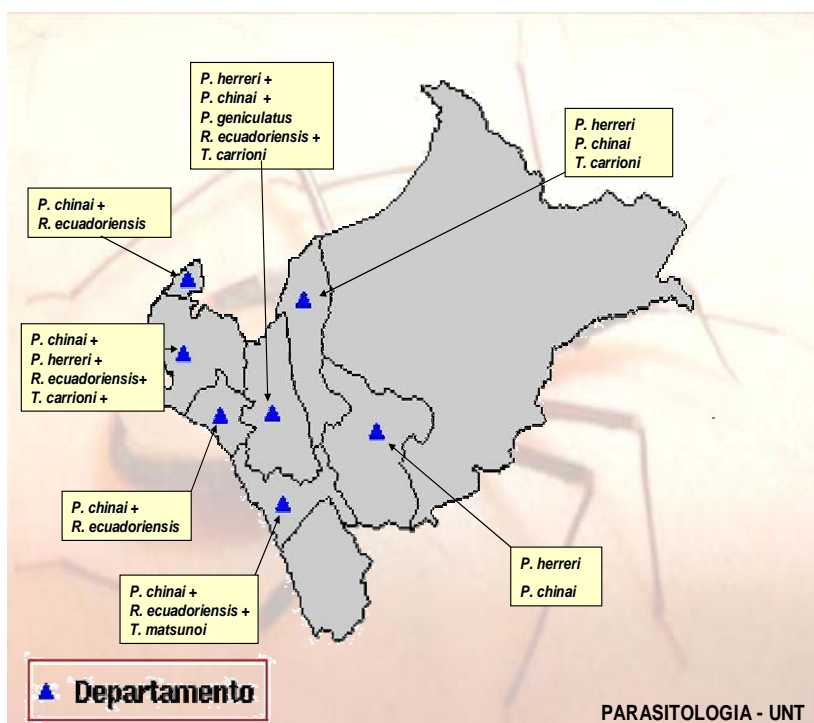


Fig 9: Distribución de Triatominos hallados en la Región Norte y nororiente del Perú

5.1.1 Captura de Triatominos por área de estudio

La recolección de triatominos infectados con *T. cruzi* y/o *T.rangeli* realizado en los cinco departamentos de la región norte y nororiente del Perú, se muestra en las siguientes tablas:

Tabla 6: Localidades y triatominos colectados con *T. cruzi* y/o *T.rangeli* del Departamento de Tumbes. 2001-2004

Localidades del Río Zarumilla	N° casas infestada	Triatomo (*)	N°	<i>T. cruzi</i>	<i>T. rangeli</i>	Neg
Zarumilla	1	<i>R.ecuadoriensis</i>	2	-	-	2
El Milagro	1	<i>P.chinai</i>	5	-	-	5
Pueblo Nuevo	2	<i>R.ecuadoriensis</i>	5	-	-	5
Matapalo	1	<i>R.ecuadoriensis</i>	3			3
Localidades del Río Tumbes	N° casas infestada	Triatomo (*)	N°	<i>T. cruzi</i>	<i>T. rangeli</i>	Neg
San Juan	1	<i>P.chinai</i>	2	1	-	1
Cruz Blanca	1	<i>P.chinai</i>	3	1	-	2
	1	<i>R.ecuadoriensis</i>	4	-	-	4
Pampas de Hospital		<i>R.ecuadoriensis</i>	2	-	1	1
La Angostura		<i>R.ecuadoriensis</i>	2		-	2
El Rodeo	1	<i>R.ecuadoriensis</i>	2	-	-	2
TOTAL	9		30	2	1	27

(*) Índice de infección tripano/triatomo: 10

Tabla 7: Localidades y triatominos colectados con *T. cruzi* y/o *T.rangeli* del Departamento de Piura. 2001-2004

Localidades	N° casas infestada	Triatomino (*)	N°	<i>T. cruzi</i>	<i>T. rangeli</i>	Neg
Pampas de Socchabamba	3	<i>T. carrioni</i>	16	-		16
El Progreso	5	<i>T.carrioni</i>	12	1		11
		<i>R.ecuadoriensis</i>	10	-	1	9
Asiayaco	2	<i>T.carrioni</i>	22	1	-	21
Huachuma	3	<i>T. carrioni</i>	9	-	-	9
		<i>P.chinai</i>	6	-	-	6
La laguna	4	<i>T. carrioni</i>	15	1	-	14
		<i>R.ecuadoriensis</i>	8	-	-	8
Espindola	1	<i>T. carrioni</i>	7	-	-	7
Joras	1	<i>P. chinai</i>	6	-	-	6
La Peña	2	<i>P. herreri</i>	12	1	-	11
San Felipe	1	<i>T.carrioni</i>	9	-	-	9
Suyo	6	<i>T. carrioni</i>	39	1	-	38
		<i>P.chinai</i>	12	-	-	12
Puchos	2	<i>T. carrioni</i>	11	1	-	10
Tina	1	<i>T. carrioni</i>	9	1	-	8
TOTAL	31		203	7	1	195

(*) Indice de infección tripano/triatomino: 4

Tabla 8: Localidades y triatominos colectados con *T. cruzi* y/o *T.rangeli* del Departamento de Lambayeque. 2001-2004

Localidades	N° casas	Triatominos	N°	<i>T. cruzi</i>	<i>T. rangeli</i>	Neg
Ninabasmba	3	<i>P. chinai</i>	35	5	-	30
Zaña	4	<i>P. chinai</i>	38	4	-	34
Reque	2	<i>P. chinai</i>	29	2	-	27
TOTAL	9		102	11		91

(*) Índice de infección tripano/triatomino: 10.7

Tabla 9: Localidades y triatominos colectados con *T. cruzi* y/o *T.rangeli* del Departamento de La Libertad. 2001-2004

Localidades	Casas	Triatominos (*)	N°	<i>T. cruzi</i>	<i>T. rangeli</i>	Neg
Zapotal	1	<i>R.ecuadoriensis</i>	4	-	-	4
La Cueva	8	<i>R.ecuadoriensis</i>	18	-	1	17
Cormot	6	<i>R.ecuadoriensis</i>	12	-	-	12
Pampa Puquio	21	<i>R.ecuadoriensis</i>	204	-	2	202
		<i>P.chinai</i>	10	1	-	9
Santa Ana	4	<i>R.ecuadoriensis</i>	8	-	-	8
Monteverde	6	<i>R.ecuadoriensis</i>	99		10	89
		<i>P.china</i>	5	-	-	5
La Constancia	18	<i>R.ecuadoriensis</i>	37	-	1	36
		<i>P.chinai</i>	4	-	-	4
Pampas de Chepate	4	<i>R.ecuadoriensis</i>	12	-	-	12
Chepate Bajo	23	<i>R.ecuadoriensis</i>	10	-	-	10
La Ciénaga	12	<i>P.chinai</i>	8	1	-	7
Baños Chimú	15	<i>R.ecuadoriensis</i>	47	1	1	45
TOTAL	118		478	3	15	460

(*) Índice de infección tripano/triatomino: 3.7

Tabla 10: Localidades y triatomos colectados con *T. cruzi* y/o *T.rangeli* del Departamento de Cajamarca. 2001-2004

Localidades	Casas	Triatomos (*)	N°	<i>T. cruzi</i>	<i>T. rangeli</i>	Neg
Chontali	3	<i>P. chinai</i>	16	1	-	15
Palo Blanco	2	<i>P. herreri</i>	12		-	12
Chunchuquillo	2	<i>P. herreri</i>	12	2	-	10
Jaén	2	<i>P. herreri</i>	9		-	9
	1	<i>P. chinai</i>	6	1	-	5
Chiple	2	<i>P. herreri</i>	15		-	15
Lagunas	1	<i>P. herreri</i>	7		-	7
Casa Blanca	1	<i>P. chinai</i>	6		-	6
Esperanza	2	<i>P. herreri</i>	12	1	-	11
Pueblo nuevo	1	<i>P. herreri</i>	9		-	9
Bellavista	3	<i>P. herreri</i>	39	2	-	37
Cutervo	2	<i>P. herreri</i>	14		-	14
Magdalena	2	<i>P. herreri</i>	11		-	11
Tembladera	1	<i>P. herreri</i>	9		-	9
Chilete	1	<i>P. chinai</i>	8		-	8
		<i>P. herreri</i>	9		-	9
Paredones	2	<i>P. herreri</i>	18	1	-	17
Pucará	1	<i>P. chinai</i>	5		-	5
		<i>P. herreri</i>	11		-	11
Vista alegre	1	<i>P. herreri</i>	8		-	8
Tabacal	2	<i>P. herreri</i>	7		-	7
Namballe	2	<i>P. herreri</i>	23	1	-	22
Chirinos	1	<i>P. herreri</i>	16		-	16
Bellavista	2	<i>P. herreri</i>	18	1	-	17
Colasay	3	<i>P. chinai</i>	10		-	10
		<i>P. herreri</i>	16		-	16
Sallique	1	<i>P. chinai</i>	1		-	1
San Felipe	1	<i>P. chinai</i>	2		-	2
Sallique	1	<i>R. ecuadoriensis</i>	8			8
TOTAL	40		337	10		326

(*) Indice de infección tripano/triatomino: 2.9

Tabla 11: Localidades y triatominos colectados con *T. cruzi* y/o *T.rangeli* del Departamento de Amazonas 2001-2004

Localidades	N° casas	Triatominos	N°	<i>T.cruzi</i>	<i>T.rangeli</i>	Neg
Aramango	3	<i>P. herreri</i>	8	1	-	7
Imaza	2	<i>P. herreri</i>	9	-	-	9
Bagua Grande	2	<i>P. chinai</i>	9	-	-	9
Cajaruro	5	<i>P.herreri</i>	12	1	-	11
		<i>P.chinai</i>	1	-	-	1
El Milagro	1	<i>P.geniculatus</i>	2	-	-	2
TOTAL	13		41	2		39

(*) Índice de infección tripano/triatomino: 4.8

Tabla 12: Localidades y triatominos colectados con *T. cruzi* y/o *T.rangeli* del Departamento de San Martín 2001-2004

Localidades	N° casas	Triatominos (*)	N°	<i>T. cruzi</i>	<i>T. rangeli</i>	Neg
Rioja	18	<i>P. herreri</i>	18	1	-	17
Moyobamba	21	<i>P. herreri</i>	39	4	-	35
Lamas	8	<i>P. chinai</i>	15	-	-	15
El Dorado	10	<i>P.herreri</i>	11	-	-	11
TOTAL	57		83	5		78

(*) Índice de infección tripano/triatomino: 6

Tabla 13: Especies de triatomos según el tipo de hábitat en el Norte y Noreste peruano. 2001-2004

Especies de Triatomos	N°	INTRADOMICILIARIO		EXTRADOMICILIARIO	
		N°	%	N°	%
<i>P. herreri</i>	297	278	93.6	19	6.4
<i>P. chinai</i>	196	29	14.8	167	85.2
<i>R. ecuadoriensis</i>	496	435	87.7	61	12.3
<i>T. carrioni</i>	149	119	79.9	30	20.1
<i>H. matsunoi</i>	23	2	8.7	21	91.3
<i>P. geniculatus</i>	2	2	100.0	-	-
TOTAL	1056	758	71.8	298	28.2

Tabla 14: Especies de triatomos por Departamento y su positividad a *T. cruzi* y/o *T. rangeli* en el Norte y Noreste peruano. 2001-2004

DPTO.	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>		<i>Panstrong. chinai</i>		<i>Triatoma. carrioni</i>		<i>Panstrongy. herreri</i>		<i>Herman. matsunoi</i>		<i>Panstrong. geniculatus</i>	
	N°	(+)	N°	(+)	N°	(+)	N°	(+)	N°	(+)	N°	(+)
Tumbes	19	1	10	2	-	-	-	-	-	-	-	-
Piura	18	1	24	-	149	6	-	-	-	-	-	-
La Libertad	451	15	27	2	-	-	-	-	23	-	-	-
Lambayeque	-	-	102	11	-	-	-	-	-	-	-	-
Cajamarca	8	1	54	2	-	-	275	8	-	-	-	-
San Martín	-	-	15	-	-	-	68	5	-	-	-	-
Amazonas	-	-	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TOTAL	496	18	242	17	149	6	343	13	23	-	-	-
IIT (*)	3.6		7		4		3.8		0		0	

(*) IIT: Índice de infección tripano/triatomino

5.1.2 Análisis Estadístico:

De acuerdo a la prueba Z de comparación de medias con nivel de significancia de 0.05, observamos que la utilización de las cajas de Gomez Nuñez se diferencia, aunque no muy significativamente, de las otras dos técnicas de detección de viviendas infestadas (hombre/hora y hoja) (**Fig 10**), pero estas diferencias no son muy significativas. Sin embargo, la utilización de las cajas de Gomez Nuñez son más efectivas en la evaluación de las viviendas, debido a que sirve como guarida de los insectos además de permitir apreciar formas evolutivas del triatomino (inclusive huevos y exubias) y muestras fecales como señal de infestación.

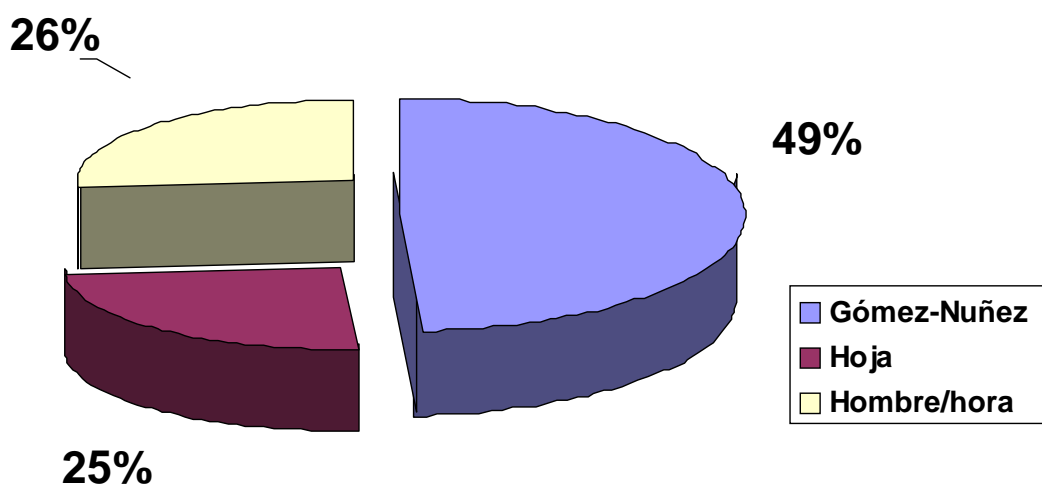


Fig 10. Evaluación de viviendas positivas según métodos de captura efectuados en los departamentos del norte y nororiente del Perú.

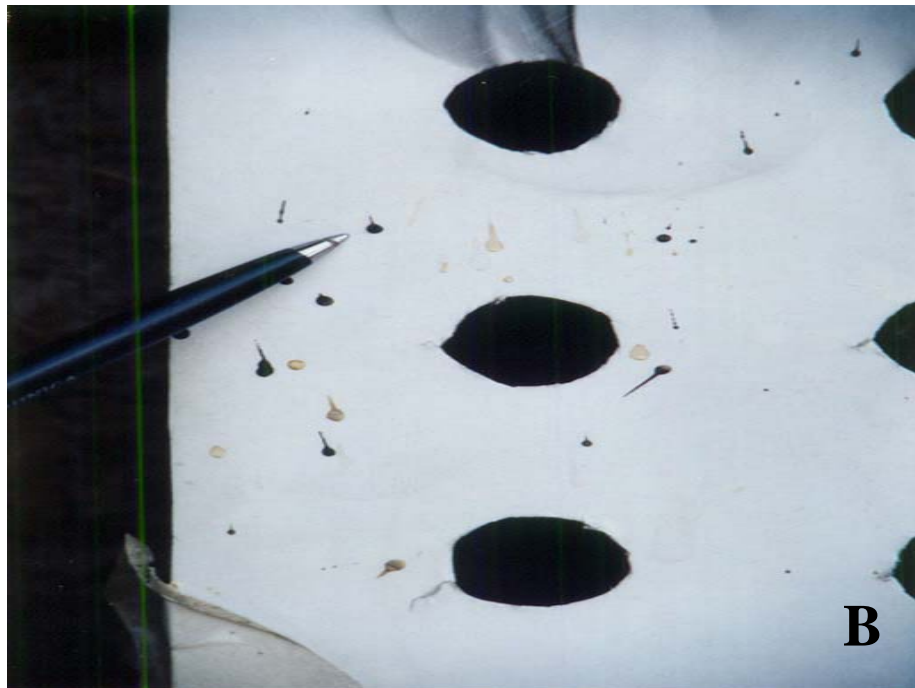


Fig 11. Observación de cajas Gómez Nuñez con presencia de triatominos y otros signos de infestación (A) como restos de heces características (B)

5.2. Morfometría

A fin de determinar la distancia taxonómica, se realizó el análisis estadístico de las medidas de las cápsulas cefálicas y alas de los especímenes recolectados, mediante el Programa Estadístico para Ciencias Sociales (SPSS) versión 11 y el Programa de Numerical Taxonomic System (NTSYS) versión 1.2



Fig 12 Ejemplares hembras de *Panstongylus herreri* de ecotopos naturales (izquierda) e insectarios (derecha)

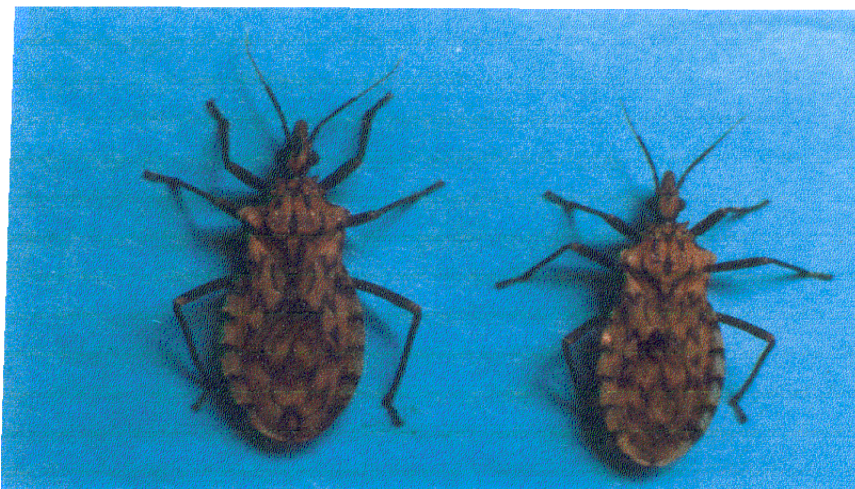


Fig 13 Ejemplares machos de *Panstongylus herreri* de ecotopos naturales (izquierda) e insectarios (derecha)

Los valores de tendencia central y dispersión mostradas en las **Tablas 15 y 16**, presentan valores promedios de 13 caracteres morfométricos de cápsula cefálica (C) de los

cuales 10 caracteres corresponden a la porción posterior (A, B,C,D,E,F,G,H,I y J) y 3 caracteres a la porción anterior (a, b y c) de hembras (H) y machos (M), de insectario (L) (CHL, CML) y naturales de Simbrón (S) (CHS, CMS) y Pampa Puquio (P) (CHP, CMP) (Fig. 12 y 13). Se muestra los valores de coeficientes de variación (CV) en porcentajes, en donde se observan la presencia de caracteres que muestran variabilidad (CV > 10%), relativa uniformidad (CV entre 5-10%) así como caracteres que muestran uniformidad (CV < 5%), encontrándose dicha variación sostenida por el análisis de varianza. De igual manera, se presentan 8 caracteres morfométricos de hemiélitro (H) derecho (D) e izquierdo (I) de hembras y machos de insectario (HLMD, HLHI, HLMD, HLMI) y naturales de Simbrón (MSMD, HSMI, HSMD, HSMI) y Pampa Puquio (HPHD, HPHI, HPMD, HPMI) (Fig. 14).

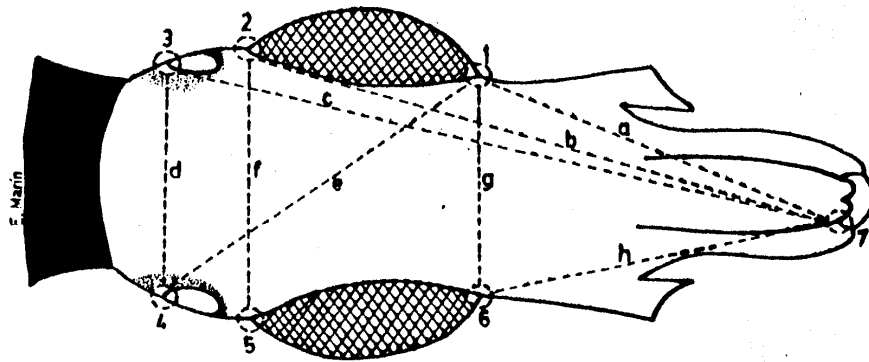


Fig 14 Puntos homologos de medición y distancias morfométricas de *P. herreri*

En las **Tablas 15** y **16**, se presentan los valores promedios de 7 caracteres morfométricos (A, B, C, D, E, F y G), tomados de hemiélitros (fig 8) izquierdos (HI) y derechos (HD) de hembras y machos de insectario (HI y MI) y hembras y machos naturales (HN y MN): HIHI, HIHD, MIHD, MIHI, MNHI, MNHD, HNHI, HNHD; así como de cápsulas cefálicas (C) de hembras y machos de insectario y naturales (CHI, CMI, CHN, CMN) (Fig. 14), agrupados en 8 y 4 determinaciones, respectivamente, obtenidos de especímenes de insectario y de ambientes naturales; observándose la presencia de caracteres que muestran uniformidad (CV < 5%), relativa uniformidad (CV entre 5 y 10%), así como variabilidad (CV > 10%), encontrándose dicha variación sostenida por el análisis

de varianza (Anexos 1 y 2), en el cual se observa que por lo menos una de las determinaciones en cada caso y para cada carácter difieren de los demás.

Al realizar la comparación de medias, mediante el estadístico "t" para caracteres de hemielitros (**Tabla 15**), se observa que los especímenes hembras y machos tanto de insectario como naturales, presentan diferencias significativas frente a los caracteres A, E, F y G, mas no se observan diferencias entre hemielitros izquierdos y derechos para cada grupo sexual analizado. Frente al carácter B, se observa la presencia de diferencias significativas entre machos y hembras naturales, no siendo significativas en ejemplares de insectario, que se encuentran relacionados.

En la comparación de medias de los caracteres cefálicos (**Tabla 16**), se observan diferencias significativas entre ejemplares de insectario y naturales para los caracteres a, b, c, g y h; mientras que el carácter d, sólo se presenta diferencia significativa entre machos naturales y hembras de insectario, asimismo los caracteres e y f permiten diferenciar poblaciones de machos y hembras naturales; presentándose también asociación y dependencia entre los caracteres.

En la comparación de medias, mediante el estadístico "t" para caracteres de cápsula cefálica de *R. ecuadoriensis* (**Tabla 17**), se observa que existe semejanza para los caracteres **A** (distancia entre PAI y JAI), **F** (Distancia entre OCI y OCD), **H** (Distancia entre JPI y JPD) entre los especímenes hembras de dos localidades: Simbrón y Pampa Puquio, existiendo también semejanza entre el caracter **b** (Distancia entre R₁ y R₂) para los especímenes machos de las poblaciones naturales, de igual modo existe semejanza en los caracteres **A**, **D** (Distancia entre JPS y CL), **F** y **H** para los especímenes machos de Pampa Puquio y hembras de insectario, sólo en el carácter **a** (Distancia entre BU y R₁) existe semejanza en hembras y machos de insectario. Para el carácter **G** (Distancia entre OCD y JAI), **c** (Distancia entre R₂ y R₃) se observó semejanza en especímenes hembras de naturales y machos de Simbrón, de igual modo existe semejanza para los machos naturales y hembras de insectario para los caracteres **B** (Distancia entre PAI y CL) y **C** (Distancia entre JAI y CL). Luego, se observa que existe mayor similitud en los caracteres **I**

(Distancia entre JAI y JAD), **J** (Distancia entre PAI y PAD) y **a** para los especímenes hembras y machos naturales, considerándose estos últimos caracteres como probables valores taxonómicos. Para el resto de caracteres en las poblaciones estudiadas existe gran diferencia significativa.

Tabla 15. Valores de mediciones morfométricas de siete caracteres de hemielitros derechos e izquierdos de ejemplares de *Panstrongylus herreri* de ambos sexos procedentes de insectario y ecotopos naturales.

Carácter	Estimador	Determinaciones							
		Insectario					Naturales		
		HIHD	HIHI	MIHD	MIHI	HNHD	HNHI	MNHD	MNHI
A	X	86.69	86.16	78.45	78.48	98.74	98.72	91.39	90.93
	DE	3.83	3.56	4.37	3.85	4.77	4.32	2.72	2.80
	CV	4.42	4.13	5.57	4.96	4.83	4.38	2.98	3.08
B	X	27.19	27.74	26.19	26.12	33.49	33.77	31.01	31.42
	DE	1.78	0.45	0.51	1.45	0.50	4.44	0.58	0.48
	CV	6.54	7.30	8.71	7.64	6.63	5.77	8.31	6.86
C	X	27.45	27.62	26.17	26.15	31.19	31.13	29.41	29.00
	DE	0.43	0.50	0.53	0.48	0.56	0.60	0.77	0.64
	CV	7.07	8.16	90.01	8.14	8.00	8.58	11.70	9.90
D	X	26.08	25.47	22.68	22.99	30.31	30.44	26.68	28.34
	DE	0.56	0.50	0.33	0.50	0.68	0.57	0.58	0.54
	CV	8.73	8.71	6.56	9.70	10.03	8.40	9.72	8.57
E	X	90.93	90.73	81.24	81.15	110.06	110.57	98.59	97.23
	DE	1.23	1.38	1.23	1.11	1.43	1.47	1.01	1.11
	CV	6.04	6.79	6.78	6.12	5.81	5.95	4.57	5.09
F	X	145.09	144.07	131.50	131.19	172.10	172.13	154.84	154.67
	DE	1.58	1.46	1.71	1.56	1.89	2.05	0.97	1.08
	CV	4.87	4.54	5.83	5.33	4.92	5.34	2.80	3.14
G	X	68.93	68.15	61.43	61.13	80.20	72.63	72.23	72.34
	DE	0.66	0.76	0.77	0.71	0.88	0.79	0.80	0.56
	CV	4.29	5.00	5.65	5.19	4.91	4.45	4.96	3.46

* < 0.05

Estimadores: X: Promedio (mm), CV: Coeficiente de variación (%) y DE: Desviación estándar. Determinaciones: HIHD: Hembras insectario hemielitros derechos, HIHI: Hembras insectario hemielitros izquierdo, MIHD: Machos insectario hemielitros derechos, MIHI: Machos insectario hemielitros izquierdos, HNHD: Hembras naturales hemielitros derechos, HNHI: Hembras Naturales hemielitros izquierdos, MNHD: Machos naturales hemielitros derechos y MNHI: Machos naturales hemielitros izquierdos. Caracteres morfométricos: A: Distancia entre 1 y 2, B: entre 2 y 3, C: entre 3 y 4, D: entre 4 y 5, E: entre 5 y 6, F: entre 2 y 6 y G: entre 1 y 5 (Anexo 5).

Tabla 16. Valores de mediciones morfométricas de ocho caracteres morfométricos de cápsula cefálica de ejemplares de *Panstrongylus herreri* de ambos sexos procedentes de insectario y ecotopos naturales

Carácter	Estimador	Determinaciones			
		Insectario		Naturales	
		CMI	CHI	CMN	CHN
a	X	74.53	78.77	80.06	87.04
	DE	5.59	3.52	4.18	4.88
	CV	7.50	4.47	5.22	5.61
b	X	119.39	125.05	140.32	129.97
	DE	4.00	5.81	4.20	6.46
	CV	3.20	4.87	3.23	4.60
c	X	131.98	142.56	158.32	149.68
	DE	5.57	4.18	4.67	6.84
	CV	4.22	2.93	3.12	4.32
d	X	31.11	26.27	23.39	33.28
	DE	4.13	2.39	3.16	5.61
	CV	13.29	9.08	13.53	16.90
e	X	72.63	76.78	32.68	87.92
	DE	4.47	7.92	3.51	4.69
	CV	6.15	10.31	4.25	5.34
f	X	46.68	48.12	50.04	53.19
	DE	3.71	0.56	1.96	2.59
	CV	7.96	5.25	3.91	4.86
g	X	43.05	45.54	47.22	51.10
	DE	2.58	2.23	2.36	2.61
	CV	5.99	4.90	5.00	5.10
h	X	74.53	78.75	80.26	87.12
	DE	6.68	3.45	5.40	4.70
	CV	8.96	4.38	6.20	5.86

P < 0.05

Estimador : X: Promedio (mm), CV: Coeficiente de variación (%) y DE: Desviación estándar. terminaciones:CHI: Cápsula de hembras de insectario, CMI : Cápsula de machos de insectario, CHN: Cápsula hembras naturales y CMN: Cápsula de machos naturales. Caracteres morfométricos: a: Distancia entre 7 y1, b: entre 7 y2, c: entre 7 y3, d: entre 4 y3 e: entre 4 y 1, f entre 5 y2, g: entre 6 y 1 y h: entre 6 y 7 (Anexo 5).

Referente a los caracteres de hemiólitros (**Tabla 18**) se observa que los especímenes no muestran diferencias significativas entre los hemiólitros derecho e izquierdo para cada población sexual analizada. Para los caracteres **I** (Distancia entre ARa y RaCaMa), **II** (Distancia entre RaCaMa y CaRb), **V** (Distancia entre ARa y MBI) y **VI** (Distancia entre RaCaMa y MPP) existe semejanza en especímenes hembras de Simbrón y Pampa Puquío.

De igual modo existe semejanza para especímenes machos de Simbrón y Pampa Puquio en los caracteres **I**, **II**, **VI** y **VII** (Distancia entre MBI y MPP). Frente al carácter **III** (Distancia entre CaRb y CP), existe mayor semejanza para hembras y machos naturales. En el resto de los caracteres en las poblaciones estudiadas existe diferencia significativa.



Fig.15.Especímenes hembras de *Rhodnius ecuadoriensis*; de ecotopos naturales de Simbrón (izquierda), Pampa Puquio (derecha) e insectario (centro).



Fig.16. Especímenes machos de *Rhodnius ecuadoriensis*; de ecotopos natural de Simbrón (izquierda), Pampa Puquio (centro) e insectario (derecha).

Enfatizando estos resultados con el análisis de varianza (**Tablas 17 y 18**) muestra que la población de insectario es la que contribuye a la varianza morfométrica al analizar los caracteres de cápsula cefálica y hemiólitros; corroborándose lo anterior al observar las diferencias en el tamaño global de los especímenes de ambos sexos en las tres poblaciones estudiadas.

Tabla 17. Valores de Tendencia central y dispersión de 13 caracteres morfométricos de cápsula cefálica de especímenes de *Rhodnius ecuadoriensis* de ambos sexos procedentes de insectario y ecotopos naturales

Carácter	Estimador	NATURALES			INSECTARIO		
		CHS	CHP	CMS	CMP	CHL	CML
A	X	43.72	42.23	42.36	41.00	39.53	39.08
	DE	2.29	1.59	1.79	2.04	3.08	0.97
	CV	5.25	3.77	4.24	4.99	7.79	2.49
B	X	38.55	35.83	33.78	33.88	33.82	30.66
	DE	1.62	2.02	3.09	2.09	2.45	2.38
	CV	4.20	5.69	9.17	6.19	7.25	7.76
C	X	80.02	78.62	74.48	73.48	76.34	71.14
	DE	1.38	2.31	2.66	1.80	2.34	3.07
	CV	1.72	2.94	3.57	2.45	3.07	4.31
D	X	104.76	101.49	101.22	97.75	98.11	93.31
	DE	3.12	1.77	2.14	2.37	2.16	3.15
	CV	2.97	1.75	2.11	2.43	2.20	3.38
E	X	121.82	119.07	117.80	113.46	112.06	110.42
	DE	2.60	1.51	2.18	2.98	4.40	3.43
	CV	2.14	1.27	1.85	2.63	3.93	3.10
F	X	21.71	21.42	21.01	19.52	19.98	18.79
	DE	1.63	1.28	1.06	1.48	1.13	1.77
	CV	7.50	5.96	5.02	7.58	5.66	9.42
G	X	50.14	50.30	49.79	48.93	47.89	46.79
	DE	2.02	1.72	1.86	1.39	2.23	2.11
	CV	3.88	3.42	3.73	2.86	4.66	4.45
H	X	25.57	25.48	24.31	22.96	24.85	21.43
	DE	1.96	2.20	1.40	1.57	1.21	0.85
	CV	7.63	8.64	5.76	6.83	4.87	3.97
I	X	27.59	27.47	27.47	27.21	25.92	24.75
	DE	1.37	1.17	2.03	2.19	1.42	1.81
	CV	4.98	4.25	7.39	8.07	5.47	7.32
J	X	30.06	30.36	30.04	30.53	29.01	28.05
	DE	1.62	1.42	1.24	2.26	2.13	1.48
	CV	5.39	4.66	4.12	7.39	7.35	5.27
a	X	16.43	16.58	16.76	16.79	15.45	15.89
	DE	1.69	1.92	1.82	1.32	1.99	1.28
	CV	10.30	11.59	10.86	7.86	12.88	8.06
b	X	83.30	60.38	78.76	78.47	77.47	76.27
	DE	2.04	2.49	1.94	1.82	3.02	2.36
	CV	2.45	3.09	2.97	2.31	3.89	3.09
c	X	32.18	31.31	31.24	30.16	30.66	30.55
	DE	2.54	1.23	2.03	0.99	1.69	2.01
	CV	7.88	3.92	6.49	3.27	5.51	6.57

P<0,05. Estimadores: X: Promedio (mm), CV: Coeficiente de Variación (%) y DE: Desviación estándar. Tratamientos :CHS: Cápsula cefálica hembra de Simbrón; CHP: Cápsula hembra de Pampa Puquio; CMS: Cápsula macho Simbrón; CMP: Cápsula macho Pampa Puquio; CHL: Cápsula hembra de insectario; CML: Cápsula macho de insectario. Caracteres Morfométricos: A: Distancia entre PAI y JAI; B: entre PAI y CL; C: entre JAI y CL; D: entre JPI y CL; E: entre OCI y CL; F: entre OCI y OCD; G: entre OCD y JAI; H: entre JPI y JPD; I: entre JAI y JAD; J: entre PAI y PAD (Fig. 4); a: entre BU y R1; b: entre R1 y R2; c: entre R2 y R3

Tabla 18. Valores de tendencia central y dispersión de 8 caracteres morfométricos de hemiólitros derecho e izquierdo de especímenes de *Rhodnius ecuadoriensis* de ambos sexos procedentes de insectario y naturales. P<0,05

Carácter	Estimador	NATURALES								INSECTARIO			
		HEMBRAS				MACHOS				HEMBRAS		MACHOS	
		HPHI	HPHD	HSHI	HSHD	HPMI	HPMD	HSMD	HSMI	HLHD	HLHI	HLMI	HLMD
I	X	79.44	79.39	80.59	80.53	77.08	76.76	75.92	76.86	76.16	76.47	71.79	72.17
	DE	2.18	1.75	2.39	2.77	2.88	2.46	1.42	1.62	2.58	2.49	1.79	2.07
	CV	2.75	2.19	2.96	3.44	3.73	3.20	1.87	2.10	3.39	3.26	2.49	2.87
II	X	24.93	24.80	24.91	24.40	23.72	23.38	24.15	24.24	23.28	23.22	23.07	22.95
	DE	0.89	1.11	0.82	1.04	1.54	1.21	0.81	1.11	0.53	0.50	0.79	1.26
	CV	3.59	4.48	3.29	4.26	6.51	5.18	3.37	4.59	2.28	2.17	3.43	5.49
III	X	18.03	17.51	18.61	18.86	17.57	17.79	18.46	18.42	17.96	17.99	16.50	16.20
	DE	1.45	1.59	1.14	0.98	1.67	1.04	1.52	1.56	0.57	0.71	1.11	0.86
	CV	8.05	9.05	6.12	5.22	9.50	5.08	8.21	8.48	3.15	3.94	6.76	5.28
IV	X	31.87	34.19	34.26	34.26	28.36	28.45	30.87	32.26	33.99	33.84	30.52	30.06
	DE	2.15	2.73	1.11	0.99	1.34	1.80	2.78	0.94	0.73	0.65	0.85	0.72
	CV	6.75	7.98	3.25	2.91	4.71	6.32	8.99	2.90	2.14	1.93	2.78	2.41
V	X	69.90	69.92	69.64	69.72	66.04	67.49	66.71	67.18	67.37	66.82	64.19	64.28
	DE	1.73	2.25	1.90	1.68	1.46	2.90	1.62	1.50	1.63	1.53	1.82	1.87
	CV	2.47	3.22	2.73	2.40	2.21	4.29	2.42	2.24	2.42	2.29	2.83	2.91
VI	X	160.95	162.62	162.43	161.70	150.51	149.04	150.38	150.32	149.36	149.56	141.23	140.69
	DE	13.07	2.47	4.67	5.32	4.04	2.98	4.02	2.37	1.45	1.34	2.59	1.62
	CV	8.12	1.52	2.87	3.29	2.69	2.05	2.68	1.58	0.97	0.89	1.83	1.15
VII	X	110.06	110.05	101.60	101.00	99.15	99.93	99.85	99.16	93.59	94.62	92.17	90.62
	DE	2.76	3.39	3.13	2.52	2.83	1.96	2.09	1.42	2.17	2.07	2.73	3.02
	CV	2.51	3.08	3.08	2.49	2.86	1.97	2.09	1.43	2.32	2.18	2.96	3.33
VIII	X	80.85	81.29	88.78	88.37	77.59	75.42	77.55	77.90	73.64	72.53	70.37	70.06
	DE	3.41	3.97	2.04	2.16	2.90	2.65	3.25	2.72	2.42	1.55	1.82	2.81
	CV	4.22	4.88	2.30	2.44	3.74	3.50	4.19	3.49	3.28	2.14	2.58	4.01

Estimadores: X: Promedio (mm), CV: Coeficiente de Variación (%) y DE: Desviación estándar. Tratamientos: HPHI-HPHD: Hemiólitro Pampa Puquio Hembra Izquierda y Derecha; HSHI-HSHD: Hemiólitro Simbrón Hembra Izquierda y Derecha; HPMI-HPMD: Hemiólitro Pampa Puquio Macho Izquierda y Derecha; HSMI-HSMD: Hemiólitro Simbrón Macho Izquierda y Derecha; HLHI-HLHD: Hemiólitro Insectario Hembra Izquierda y Derecha; HLMI-HLMD: Hemiólitro Insectario Macho Izquierda y Derecha. Caracter Morfométrico: I: Distancia entre ARa y RaCaMa; II: entre RaCaMa y CaRb; III: entre CaRb y CP; IV: entre CP y MBI; V: entre MBI y ARa; VI: entre RaCaMa y MPP; VII: entre MBI y MPP; VIII: MBI y CPA (Fig. 6).

5.3 Aislamiento de cepas de *T. cruzi*/ *T. rangeli*

5.3.1 Cultivo de los aislados

Se han ensayado 5 medios de cultivo monofásicos distintos (Material y Método, Apartado 4.2.2.1) con el fin de averiguar que medio es el idóneo para el crecimiento de los distintos aislados.

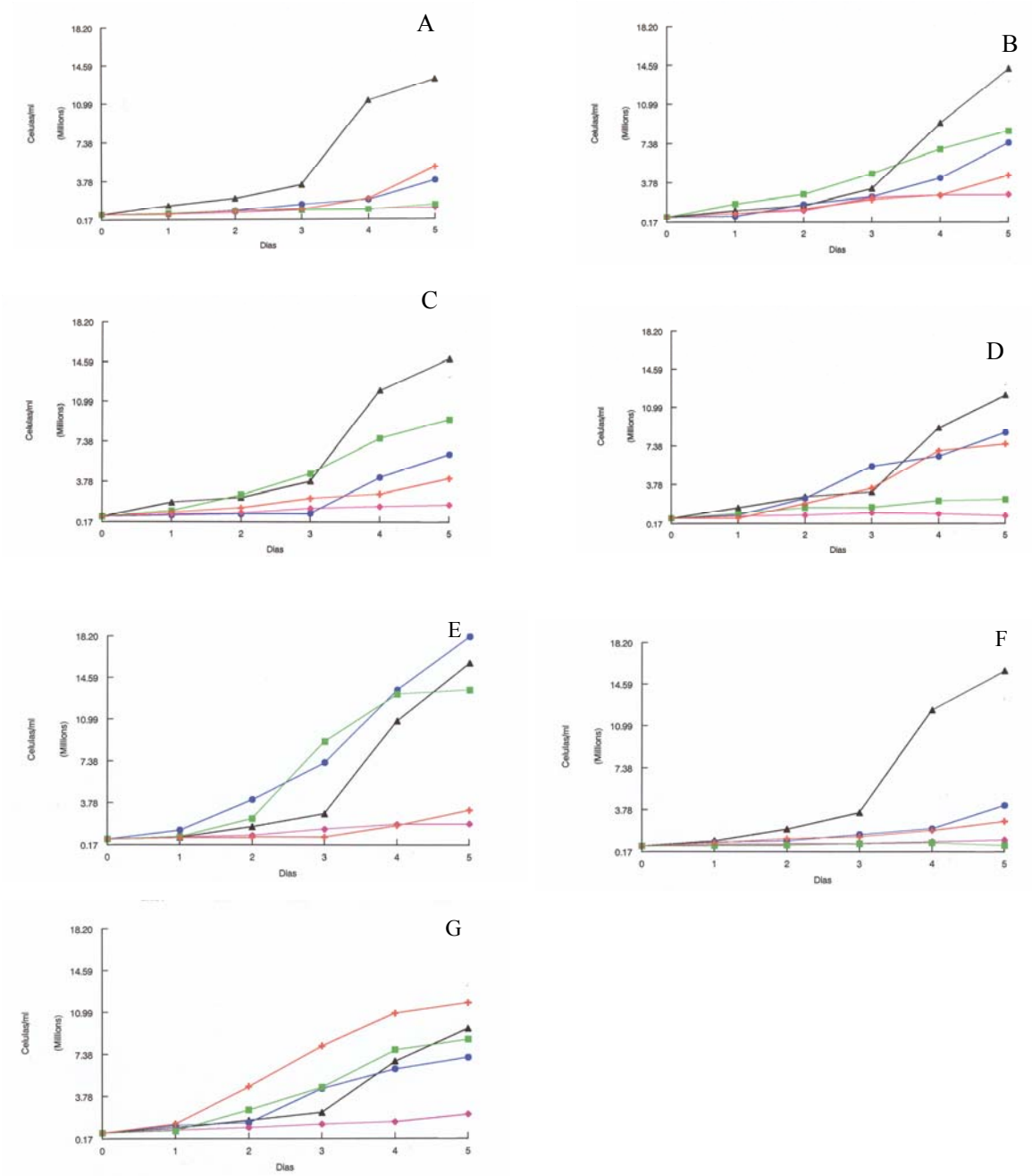
En todos los casos se partió de una concentración inicial de $6,4 \times 10^4$ parásitos/ml, determinando el crecimiento celular mediante el contaje en una cámara de Neubauer cada 24 horas, hasta el 5° día, en el que se alcanza la etapa de crecimiento estacionaria.

En la **Gráfica 1**, se reflejan los resultados de este experimento. En el medio de cultivo Grace's, adicionado al 10 % SBF1, es donde se obtiene mayor número de parásitos, aproximadamente $1,5 \times 10^7$ parásitos/ml, al quinto día de cultivo para los aislados TCI, TCII, TP, TRa y TRh.

En el caso del aislado TM (**Gráfica 1 G**), la densidad de crecimiento que se obtiene en el medio Grace's, es significativamente menor, aproximadamente de 1×10^7 parásitos/ml. Mientras que con el medio de cultivo SDM, se obtiene mayor densidad de crecimiento ($1,2 \times 10^7$ parásitos/ml).

De los aislados, objeto de este estudio, el aislado TRa y TM, son los menos adaptados a cultivo "*in vitro*". En todos los casos, se ha observado que el medio de cultivo RPMI, usado tradicionalmente por otros autores, es con el que menor densidad celular se ha obtenido.

En el caso del aislado TH, en el medio MTL, se consigue una alta concentración ($1,8 \times 10^7$ parásito/ml), aunque el medio Grace's y TC también son medios aceptables (densidad $1,5 \times 10^7$ y $1,3 \times 10^7$ parásitos/ml, respectivamente).



GRÁFICA I. -Curvas de crecimiento en los distintos medios de cultivo de: (A): *Trypanosoma cruzi* (TCI); (B): (TCII); (C): (TP); (D): TRa; (E): TH; (F): TRh y (G): TM.



5.4 Caracterización de cepas de *T. cruzi*/ *T. rangeli*

5.4.1 Aglutinación por Lectinas

Una de las técnicas de caracterización de los distintos tripanosomátidos ha sido a través del test de aglutinación por lectinas. Los resultados de este experimento se reflejan en la **Tabla 19**. Los aislados fueron cultivados en medio Grace's adicionado con 10% de SBF1 al tercer día de cultivo donde se alcanza la fase exponencial de crecimiento, posteriormente fueron centrifugados a 1500 rpm durante 10 minutos y resuspendidos en una solución salina (PBS) adicionado al 0,5% de Suero Bovino Fetal (SBF) y ajustados a una densidad de 1×10^8 parásitos/ml.

Table 19 Aglutinación por Lectinas^a de los siete tripanosomatidos aislados.

Lectinas ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	TC	TP1	TP2	TP3	TB1	TB2	TB3
Concanavalin A							
5	+	+	+	+	++	++	++
15	+	++	+	+	+++	++	+++
20	++	++	++	+	+++	++	+++
50	++	++	++	+	+++	++	+++
<i>Vicia villosa</i>							
5	-	-	-	+	-	-	-
15	-	-	-	+	-	-	-
20	-	-	-	+	-	-	-
50	-	-	-	+	-	-	-
Wheat-germ lectin							
5	+	-	+	-	+	-	++
15	+	-	+	-	+	-	++
20	+	-	+	-	+	-	++
50	++	-	+	-	+	-	+++

^aLa aglutinación fue estimada desde - (no aglutinación) a +++ (Aglutinación completa)^b Resultados de tres experimentos.

La lectina del germen de trigo (WGA), no es capaz de aglutinar a los aislados: TP, TRa y TM, a ninguna de las cuatro dosis ensayadas. En el caso del aislado TCII y TRh, y a la mayor dosis, se observa una aglutinación más débil, que la que se obtiene con la cepa de referencia TCI. Con dicha lectina, el aislado TH aglutina más fuertemente que los anteriores aislados a las dosis ensayadas (5µg/ml).

5.4.2 Análisis Isoenzimático

Mediante el empleo de ocho sistemas isoenzimáticos hemos podido diferenciar entre sí a la mayoría de estos aislados estudiados.

Para conseguir el número de parásitos adecuado para llevar a cabo los estudios isoenzimáticos se siguió la metodología descrita en el Apartado 4.3.2 de Material y Métodos. Una vez obtenida suficiente masa celular y previamente a la caracterización isoenzimática, los flagelados se lisaron mediante congelación-descongelación brusca en una solución hipotónica y posterior centrifugación a 8000g durante 20 minutos a temperatura de 8°C. La determinación de la concentración de proteínas se realizó mediante el método de Bradford.

Las enzimas fueron separadas por isoelectroenfoque usando un Phas-sistem (Pharmacia) y geles de poliacrilamida (Material y Métodos Apartado 4.3.2.3). En total fueron ensayadas ocho enzimas, las cuales vienen descritas en el Apartado 4.3.2.2 de Material y Métodos. Como se desprende de la **Fig 17A**, los perfiles isoenzimáticos de cada una de las muestras viene dada tanto por el número de bandas como por su movilidad, al ser separadas electroforéticamente en función de su punto isoeléctrico.

En la **Fig 17A**, se representa los perfiles isoenzimáticos para la enzima 6-GPD (6-fosfogluconico deshidrogenasa). Diferencia claramente el aislado TRa, con una banda en el punto isoeléctrico 5 (pI 5). El resto de los aislados carecen de actividad enzimática para esta enzima.

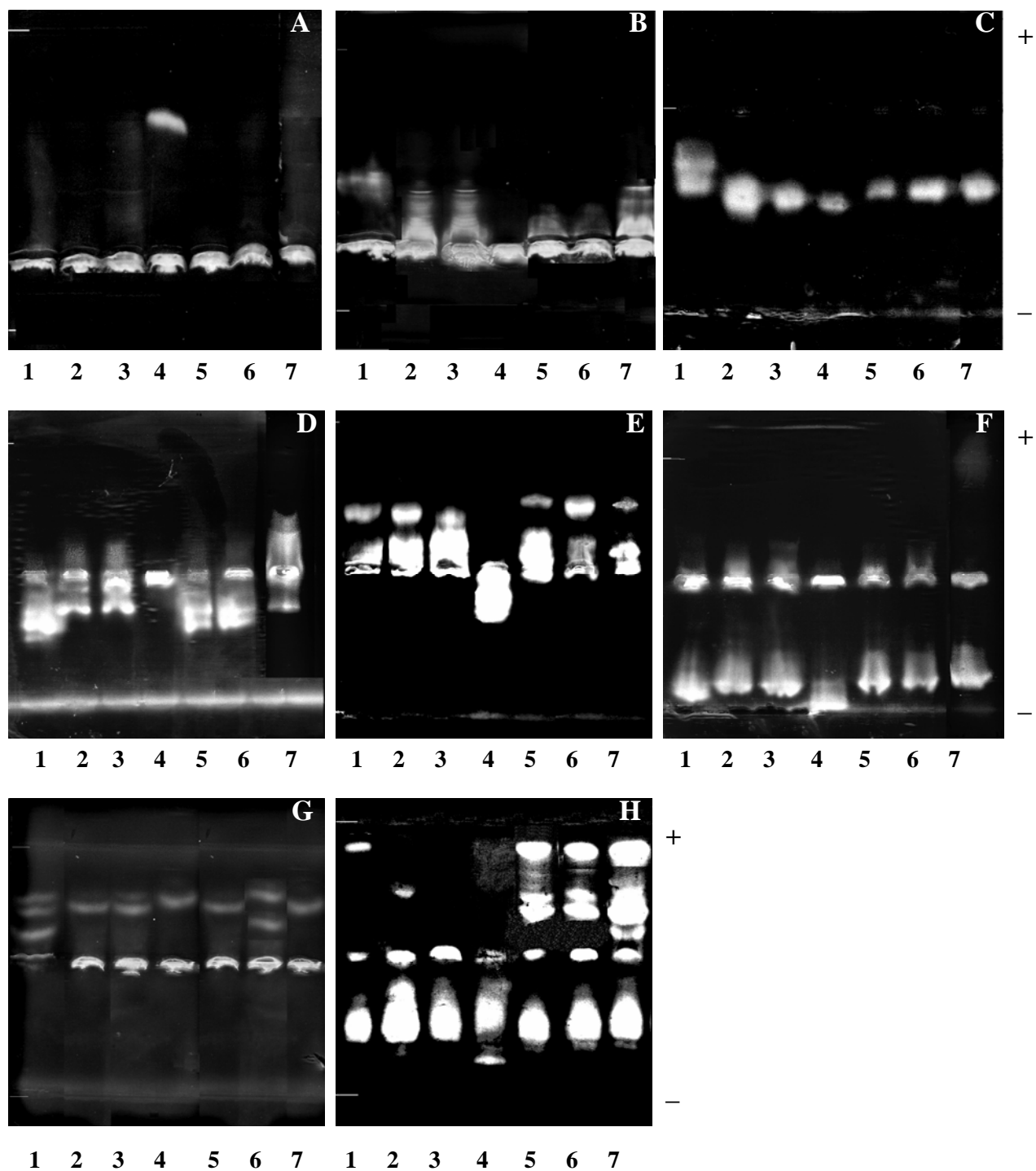


Fig 17- Perfil isoenzimático para los siguientes sistemas: (A) 6 -Fosfogluconodeshidrogenasa (6-GPD), (B) Glucosa 6-fosfato-deshidrogenasa (G6PD), (C) Glucosa fosfato isomerasa (GPI), (D) Isocitrato deshidrogenasa (IDH). (E) Enzima málico (ME), (F) Malato deshidrogenasa (MDH), (G) Fosfoglucomutasa (PGM) y (H) Superóxido dismutasa (SOD). (1) TCI; (2) TCII; (3) TP; (4) TRa; (5) TH; (6) TRh; (7) TM

Por el contrario, con la enzima G6PD (glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa) (**Fig 17B**), el aislado TRa, no presenta ninguna actividad para esta enzima. Los otros seis aislados si presentan actividad, aunque existen diferencias, según el número de bandas y movilidad. Todos los aislados, con la excepción de TCI, presentan una banda común con un pI 6,48. Los aislados TCII, TP y TM, presentan dos bandas isoenzimáticas adicionales (pI 6 y 6,12). El aislado de referencia T. cruzi, cepa maracay (TCI), presentan una banda isoenzimática con pI diferente a las bandas de los anteriores aislados, (pI 5,83).

En el caso de GPI (glucosa-fosfato isomerasa), (**Figura 17 C**), excepto el aislado de referencia TCI, que presentan dos bandas isoenzimáticas de pI 4,98 y 5,72, respectivamente). Los otros aislados tienen una sola banda, que en el caso de TH, TRh y TM, esta banda tiene un pI común a la banda pI 5,72 de TCI. El pI de la banda de TCII, TP, TRa, es ligeramente diferente (pI 6).

En la **Fig 17 D**, se observa el perfil isoenzimático IDH (isocitrato deshidrogenasa), destacándose que el caso de TRa, no presenta actividad isoenzimática. Los aislados TCI, TH y TRh, presentan unos perfiles muy semejantes, con dos bandas de pI 7,10 y 7,20. La banda pI 7,10 es común en el resto de los aislados. Aunque en el caso de TM, presentan dos bandas adicionales con un pI diferente (5,10 y 4,60).

El perfil electroforético de la ME (enzima málico) (**Fig 17 E**), también diferencia claramente el aislado TRa (una sola banda pI 7,12) del resto de los aislados que presentan dos bandas: una de ellas común a todos ellos (pI 5,30) y la otra, en el caso de TCI, TCII y TP, tienen un pI 5, mientras que para TH, TRh y TM, es de 4,67. MDH (malato deshidrogenasa) (**Figura 17 F**), presenta para todos los aislados una sola banda isoenzimática, con un pI 8,80, con la excepción de TRa, que tiene un pI de 9.

El aislado TCI, para la enzima PGM (fosfoglucomutasa), (**Figura 17 G**), presenta tres bandas isoenzimáticas (pI 4,60; 4,90 y 5,60). El aislado TP, presenta dos bandas

isoenzimáticas de pI 4,60 y 4,90 comunes con los de aislados TCI y el aislado TRh también presenta dos bandas comunes con TCI (pI 5,60 y 4,60), y el resto presentan una sola banda isoenzimática, que en el caso de los aislados TCII y TH, el pI es 4,90; mientras que TRa y TM es de pI 4,60.

La enzima SOD (superóxido dismutasa) (**Figura 17 H**) muestra la mayor variabilidad isoenzimática. TCI, presenta dos bandas isoenzimáticas (pI 3,70 y 7,51), en TCII y TP solamente una banda con distinto punto isoeléctrico (4,70 y 7,51 respectivamente). TRa, presenta dos bandas igual que TCI, una de ellas común con este (pI 7,51) y la otra totalmente distinta (PI 8,34). Los aislados TH, TRh y TM, tienen la banda observada anterior en TCI, TP y TRa (pI 7,51), presentando además, TH y TRh, tres bandas más (con un pI de 3,70; 4,70 y 5,71, respectivamente) y en el caso de TM una quinta banda pI 5,50.

5.4.3 Cuantificación de metabolitos

Para identificar los principales metabolitos que son excretados al medio de cultivo Grace's adicionado con 10% de SBF1. Se analizó la composición de los medios en los que habían crecido los distintos aislados durante cinco días. Se empleó para ello espectroscopía de RMN ^1H , comparándose los espectros obtenidos con los del medio fresco libre de células como control (**Figura 18 A**).

Los picos adicionales que se observan al comparar el espectro control con los espectros correspondientes a los medios de cultivo de los flagelados, se correspondían con los metabolitos excretados (**Figura 18B-H**). Al comparar los espectros correspondientes a los siete aislados observamos diferencias tanto cuantitativas como cualitativas entre ellos.

Todos los aislados excretan como producto final de su metabolismo el acetato (A, 1,8 ppm), a pesar de las diferencias cuantitativas de uno con respecto a los otros aislados. La cepa de referencia TCI, cepa Maracay, excreta principalmente y de mayor a menor cantidad:

acetato, alanina (AL, 1,4 ppm) y succinato (S, 2,3 ppm) (**Fig 18 B**). La producción de estos metabolitos es continua durante los 5 días de cultivo (**Fig 18A**).

Los aislados TCI, TP y TRa, excretan los mismos productos finales que en el caso de la cepa de referencia, aunque TCII y TRa, el metabolito mayoritario es el succinato, seguido del acetato y la alanina (**Fig 18C y 18E**).

El aislado TP el orden de los metabolitos producidos cuantitativamente decreciente: acetato, succinato y alanina (**Fig 18D**). En los tres casos la producción de estos ácidos orgánicos es de forma continua durante los días de cultivo, si exceptuamos el aislado TCII (**Gráfica 2B**), donde la excreción de este metabolito se estabiliza entre el tercer y cuarto día de cultivo. En el caso del aislado TM, los productos liberados al medio son totalmente distintos a los mencionados anteriormente (**Fig 18F**), teniendo en cuenta que el acetato es el metabolito excretado mayoritariamente pero como metabolitos secundarios libera: lactato (L, 1,2 ppm), etanol (ET, 1,05 ppm) y glicerol (GL Y, 3,4 ppm). La producción de lactato se hace apreciable a partir del segundo día de cultivo y en todos los casos la producción es continua durante los cinco días de cultivo (**Gráfica 2E**).

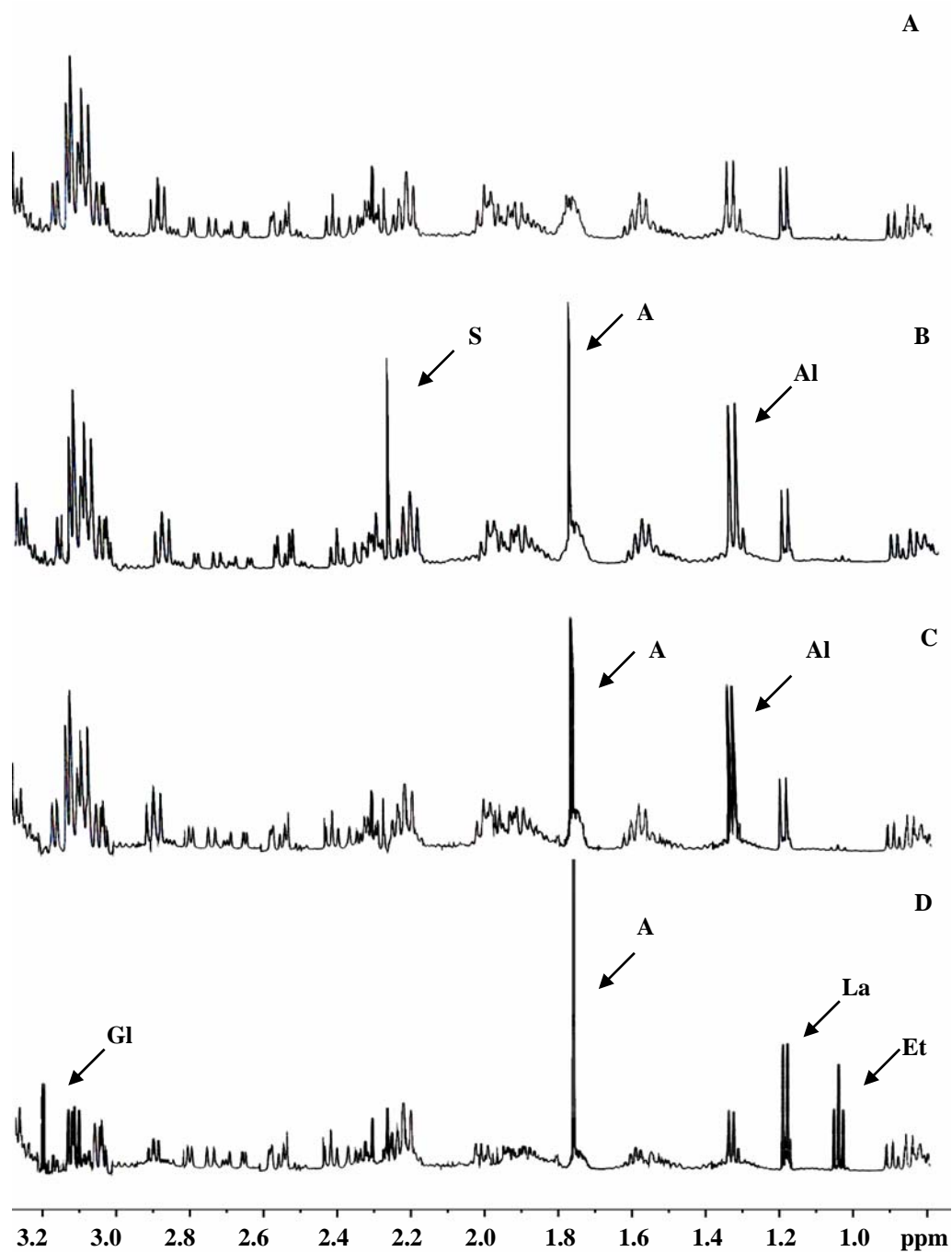
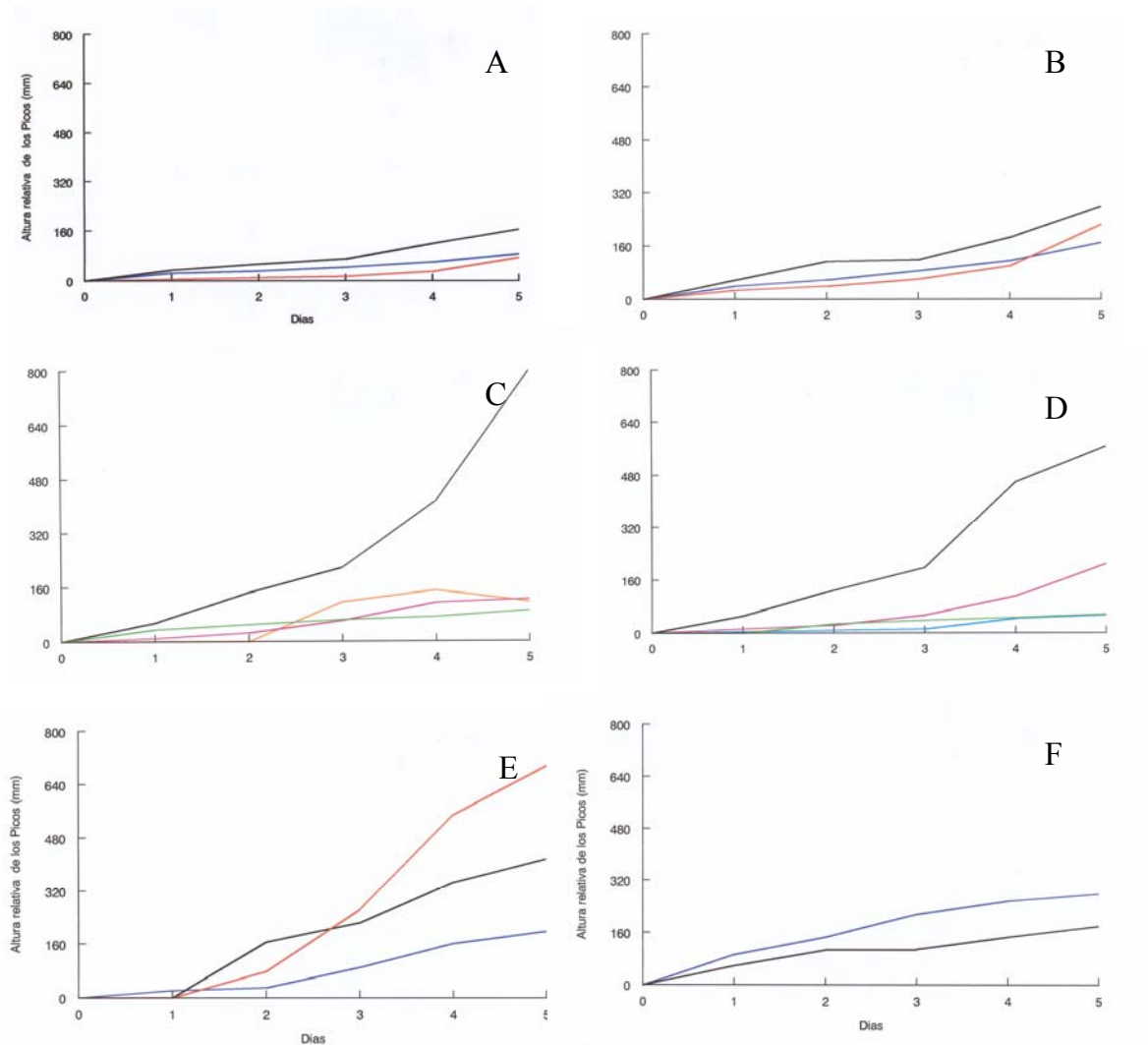


Fig 18- Cuantificación de Metabolitos empleando espectroscopía de RMN ^1H , comparándose los espectros obtenidos con los del medio fresco libre de células como control (A) cepa de referencia TCI (B) aislados TCI (C) aislado TP (D) aislado TRa (E) y TM (F)



Gráfica 2 Cuantificación de Metabolitos comparándose las curvas de crecimiento obtenidos con los del medio fresco libre de células como control (A) cepa de referencia TCI (B) aislados TCI (C) aislado TP (D) aislado TRa (E) y TM (F)

VI. DISCUSIÓN

La enfermedad de Chagas existe en el Perú desde épocas remotas, como lo confirman los hallazgos de momias prehispánicas de los siglos XIV y XV DC, presentando estadios crónicos de la enfermedad.

El desarrollo de estrategias adecuadas para el control de la transmisión vectorial de la enfermedad de Chagas depende de la disponibilidad de datos confiables sobre la distribución geográfica, características ecológicas y tendencias conductuales de las especies de triatomíneos presentes en cada región. En la presente Memoria se ha actualizado la distribución geográfica y la prevalencia de los principales vectores de la Enfermedad de Chagas del norte peruano, como: *Triatoma dimidiata*, *Rhodnius ecuadoriensis*, *Triatoma carrioni*, *Panstrongylus herreri*, *Panstrongylus chinai* y *Hermanlenticia matsunoi* (**Fig. 9**) Asimismo, se ha determinado los índices de infestación domiciliaria y el índice de infección natural de estos vectores por *Trypanosoma*, la densidad y el potencial papel vectorial de estas especies, parámetros básicos en la aplicación de un posible programa de control a implementarse por el Ministerio de Salud del Perú.

El comportamiento del parásito *T. cruzi* puede estar influenciado por el mismo hospedero o las condiciones del medio ambiente, lo que ha incrementado la tendencia a realizar una caracterización de las diferentes cepas de *T. cruzi*. Asimismo, uno de los problemas planteados consiste en conocer si las diferencias que se observan en la presentación de los cuadros clínicos y en la respuesta de los pacientes al tratamiento, se debe a las diferencias biológicas entre las cepas de *T. cruzi* que prevalecen en cada área geográfica, o en las diferencias genéticas entre las poblaciones humanas susceptibles (Andrade 1985).

La complejidad ecológica de la región (con zonas de áreas secas y húmedas hasta 4947 msnm) sugiere una diversidad de especies de triatomíneos, tal como se refleja en las dieciséis especies halladas en ocho departamentos que se están investigando. Tres de las dieciséis

especies están demostrando un fuerte comportamiento sinantrópico, sugiriendo su consideración como blanco de control de poblaciones de vectores domésticos/peridomésticos. Mediante este estudio, hemos podido observar que *P. herreri* se está convirtiendo en un potente vector de *T. cruzi*, presente en áreas consideradas como principales ecótopos humanos. Mientras que, *T. carrioni* y *R. ecuadoriensis* parecen ser exclusivamente domésticos pero potencialmente importantes transmisores de *T. cruzi* en el futuro próximo.

La distribución geográfica y prevalencia de la infección humana por *T. cruzi* y *T. rangeli*, sugiere realizar una estrategia que combine la demostración parasitológica y la serología. Sin embargo, ambos procedimientos son realmente de valor limitado. La demostración directa del flagelado en muestras de sangre periférica tiene valor práctico insignificante en términos de trabajo-beneficio. Si utilizamos los triatomos adecuados (preferencialmente los vectores locales), podríamos obtener xenodiagnósticos con positividad decreciente: en heces, hemolinfa y, en menor proporción, en glándulas salivares. El problema radica en el entrenamiento del personal técnico, en el examen de la hemolinfa y de las glándulas salivares.

6.1 Índice de infección Tripano/Triatomino:

Se ha determinado un importante Índice de Infección tripano-triatomino (IIT) en todos los departamentos estudiados. Obteniéndose un mayor IIT en el departamento de Lambayeque, 10.7 (**Tabla 8**) y Tumbes (**Tabla 6**) y un menor IIT en el departamento de Cajamarca 4 (**Tabla 10**). Con los resultados obtenidos en el presente estudio, se amplía la distribución geográfica de los triatomos más importantes transmisores de trypanosomas capturados en la región norte y noreste del Perú

Los Indices de infección por triatomino hallados en la Región Norte y Noreste muestran a *P. chinai* como el de mayor importancia en la transmisión potencial de *T. cruzi* con IIT de 7, seguido de *T. carrioni* IIT 4, *P. herreri* IIT 3,8 y *R. ecuadoriensis* IIT 3,6

(**Tabla 14**). Estos resultados nos demuestran la gran importancia que tienen los triatominos en norte y noreste del Perú no solo por la diversidad de especies sino el alto índice de infección con *T. cruzi* y/o *T. rangeli*, los que mayoritariamente son intradomiciliarios 71,8 %. (**Tabla 13**)

A continuación se mencionan algunas características de los triatominos hallados en los seis Departamentos objetos de nuestro estudio.

6.1.1 Vectores de la Costa Norte.

Rhodnius ecuadoriensis (Lent y León 1958): Especie presente en algunas localidades de los departamentos de Tumbes, Piura, La Libertad y Cajamarca, localidades de la vertiente occidental y valles interandinos del norte. Ha sido encontrado en hábitat domésticos de zonas áridas del norte, con baja pluviosidad (0-125 a 1000-2000 mm/año) y temperatura entre 16.5 y 30°C., *R. ecuadoriensis* puede encontrarse entre 0 y 2200 m de altitud (con un registro de 2700m), las palmeras no forman parte de la flora nativa de estas zonas ecológicas, por lo que sus poblaciones siempre están asociados a poblaciones humanas (donde el microhábitat, muy estable, depende poco de las condiciones externas). Esta presencia podría deberse a una expansión pasiva facilitada por migraciones humanas; lo que los diferencia a los hallados en Ecuador que se encuentran limitados a la zona central de occidente y están asociados estrechamente con palmeras de la especie *Ph. aequatorialis*.

Los únicos datos disponibles hasta el momento y que han sido encontrados en el presente trabajo, sobre la ecología de las poblaciones domésticas de *R. ecuadoriensis* indican que se encuentran frecuentemente asociadas con aves domésticas (gallinas, pavos y palomas), donde las colonias están formadas por muchos individuos (Castillo y col. 1995, Cuba y col. 2002). Nuestro grupo ha estudiado en detalle los principales aspectos ecológicos de estas poblaciones en los departamentos encontrados, determinando que en La Libertad los índices

de infestación por *R. ecuadoriensis* son altos y se encuentran colonizando las viviendas humanas encontrándose 496 especímenes con 15 parásitos identificados como *T. rangeli*.

En estos estudios pudimos mostrar, usando regresión logística multivariada, que el número de aves y cobayos mantenidos dentro de la vivienda y alrededores, algunas técnicas y materiales de construcción (paredes de quincha, barro y techos rudimentarios que combinan troncos, ramas y barro) y los bajos ingresos familiares son, por este orden, factores de riesgo que incrementan de modo significativo la probabilidad de que una vivienda, todas rurales y aisladas, se encuentre infestada por *R. ecuadoriensis*.

Consideramos que *R. ecuadoriensis* es uno de los principales vectores de la enfermedad de Chagas en la región Norte del Perú. Actúa como vector primario en las zonas costeras del norte de Perú, principalmente de La Libertad (Valle Gran Chimú) y en donde sus poblaciones están estrictamente asociadas con hábitats humanos. Como se observa en la (Tabla 14), se colectó un total de 496 especímenes con una positividad a la infección natural de *T. rangeli* de 3.6%, encontrándose mayoritariamente en las estructuras de caña y madera con que están construidas las camas. (Fig. 11)

***Panstrongylus chinai*:** Es un vector secundario de la región Norte por ser especie nativa con capacidad demostrada de invadir y colonizar domicilios y peridomicilios. Es frecuente que estas especies permanezcan en sus hábitats silvestres hasta que los vectores primarios son eliminados por las acciones de control. En este momento la competencia por los ambientes humanos disminuye y los vectores secundarios tienden a ocuparlos. Es probable que *P. chinai* actúe como vector de *T. cruzi* en los ciclos silvestres que tienen lugar en zonas áridas de los seis departamentos de la región Norte y Oriente del Perú. Se ha notificado su capacidad para colonizar nidos de roedores (Vargas 2004) y en ocasiones viviendas humanas; en ambos casos, parece existir una marcada preferencia por estructuras de piedras con abundantes escondrijos y alrededor de corrales de cabras. Es muy frecuente que ejemplares adultos, en especial hembras, lleguen volando hasta las viviendas con iluminación artificial

(Arrarte 1955) por lo que, estas características hacen que, deba recomendarse un fuerte componente de vigilancia entomológica en las zonas donde la especie está presente.

Triatoma carrioni: Esta especie, posiblemente nativa de Ecuador, es un vector primario de la Enfermedad de Chagas por ser una población mayoritariamente domiciliaria. La estrecha adaptación de estas poblaciones al ecótopo doméstico los convierte en un transmisor importante de enfermedad de Chagas humana. Se ha adaptado con éxito a los hábitats humanos en el norte de Perú, en el departamento de Piura. *T. carrioni*, ocupa un amplio rango de zonas ecológicas (áridas y húmedas, entre 500 y 2600 m de altitud) Parece haber una correspondencia entre la adaptación a zonas de vida menos húmedas y la capacidad de colonizar hábitat humanos, habiéndosele encontrado en su gran mayoría, 80%, intradomiciliario datos publicados por el Dr. Grijalva (Grijalva y col. 1997) indican que, en localidades rurales donde la infestación de viviendas por *T. carrioni* es frecuente (y las colonias altamente densas, como en el Perú), la tasas de seroprevalencia de anticuerpos anti-*T. cruzi* en humanos pueden superar el 20%. Esto confirma que *T. carrioni* es un vector altamente eficiente y que, al menos en el Norte de Perú, representa un serio peligro para la salud de las poblaciones humanas y será necesario incrementar un fuerte sistema de vigilancia en el que los habitantes denuncien reinfestaciones para su rápida evaluación y eliminación (Vargas 2004).

6.1.2 Vectores de los Valles Interandinos :

Panstrongylus herreri: Se menciona su presencia para los Departamentos de Cajamarca, San Martín y Amazonas, todos circunscritos a los valles interandino afluentes de los ríos Marañón, Huallaga y Apurímac. Investigadores nacionales lo consideran de hábitos intra y peri domiciliarios.

Con los resultados obtenidos en el presente estudio, se actualiza la distribución geográfica de *P. herreri*, de características mayoritariamente domiciliarias, 94% (habiéndose

encontrado todo su ciclo biológico dentro de las viviendas) y, diferenciándose de *P. herreri* procedente de Ecuador, en donde, parece ser esencialmente silvestre. Esta especie es muy similar a *P. lignarius* (de la que solo se diferencia por la presencia de una pequeña mancha clara en las tibias de *P. lignarius*). Esta especie es la más importante en esta región tropical y se ha adaptado a las viviendas, transportando consigo el *Trypanosoma cruzi* y su potencial infección al hombre y a los animales domésticos.

Panstrongylus geniculatuus (Latreille 1811): Algunos autores la refieren en los valles interandinos y orientales del norte, centro y sur del Perú. En el presente estudio se le ha encontrado en el departamento de Amazonas. Se le considera presente en ambos lados de la cordillera y no es raro que ejemplares adultos entren en las viviendas durante la noche, aparentemente atraídos por la luz (eléctrica o de lámparas de combustible). Su papel en la transmisión de *T. cruzi* a humanos es incierto, aunque se ha notificado la infestación de pocilgas peridomésticas en Brasil (Valente 1999) y hay hallazgos de pequeñas colonias domésticas en Venezuela y Brasil (Feliciangeli y col. 2004, Vera 1999), el fuerte efecto irritante de la picadura de esta especie y sus requerimientos microclimáticos (es necesario mantener 100% de humedad relativa para lograr su reproducción en laboratorio (Barreto y col. 1988) hacen pensar en una importancia epidemiológica limitada. Sin embargo, *P. geniculatus* debe considerarse como un vector potencial en las zonas donde se encuentra esporádicamente dentro de los domicilios.

Hermanlenia matsunoi: Este triatomino ha sido encontrado en la provincia de Pataz, distrito de Piaza, Departamento de La Libertad. Su distribución geográfica es muy limitada, 7°52'S, 1980 m de altitud, lo que está condicionando las características climáticas del tipo continental y con grandes amplitudes térmicas y se le considera de características silvestres (cuevas), aunque recientemente se le ha encontrado en el interior de una casa. No se le ha encontrado infectado con *T. cruzi*, no descartándose su infección natural.

6.2. Morfometría

Al observar los valores del coeficiente de variación (CV) de los caracteres morfométricos tomados en hemielitros y cápsulas cefálicas de *P. herreri* (**Tablas 15 y 16**), se observa la predominancia de caracteres que muestran estrecha variación morfométrica para cada determinación ($CV < 10\%$). Por otro lado, los resultados de los caracteres morfométricos tanto de cápsula cefálica y hemielitros de *R. ecuadoriensis* (**Tablas 17, 18**) muestra un mayor porcentaje de C.V., oscilando entre 5 y 10%, esto permitiría considerarlos como buenos marcadores poblacionales, por la baja variación que poseen los individuos en sus respectivas poblaciones; entendiendo como un "buen marcador" a aquel carácter que se presenta en forma estable y con curva de variación estrecha (Reyes 1995).

Al realizar la comparación de medias (**Tabla 15 y 17**), con el propósito de determinar la relación existente entre los promedios de los caracteres estudiados en los hemielitros, se observa que las medias de los ejemplares machos de insectario, presentan un tamaño promedio menor a los especímenes restantes; ello implicaría que los caracteres de los hemielitros de estos especímenes se encontrarían sujetos a influencia ambiental; observándose que estos ejemplares de insectario presentan cambios en su estructura morfométrica en respuesta a la adaptación a nuevos hábitats (Dujardin y col. 1999b), pero son las hembras naturales las que poseen mayores dimensiones en la totalidad de caracteres de los hemielitros (**Fig.12, 15**); sobrepasando a los machos naturales (**Fig. 13 y 16**), verificándose con ello la presencia de dimorfismo sexual; esta observación se fundamenta en el hecho de que sólo las hembras están adaptadas morfológica y fisiológicamente para iniciar el proceso de colonización, presentando por lo tanto un mayor potencial para sobrevivir en la naturaleza (Schoofield 1999), verificándose con ello la presencia de dimorfismo sexual, lo que es una regla general de los triatomíneos (Lent y Wygodzinsky 1979), fundamentándose en que las

hembras son las que se encuentran adaptadas morfológica y fisiológicamente para iniciar el proceso de colonización, presentando por tanto un mayor potencial para sobrevivir en el campo (Schoofield 1999). Fairban (1990) encontró una asociación positiva entre la duración de la cópula y el dimorfismo sexual, afirmando así que existen restricciones en el peso que la hembra puede soportar durante la cópula, lo cual asociado a la duración del apareamiento seleccionan para un mayor dimorfismo, manifestándose hipolametría (cópula cuando los machos son el sexo más pequeño). Por otro lado, Cassini y col. (1995) demostraron en *T. infestans*, proveniente de Uruguay, que los caracteres morfométricos de cápsula cefálica pueden ser usados para distinguir las poblaciones de diversas procedencias, siendo comprobada esta última observación en el presente trabajo (**Tabla 16,17**)

Las medias de los caracteres morfométricos cefálicos (**Tabla 16 y 17**), también demuestran la presencia de diferentes tamaños de especímenes hembras y machos de insectario y naturales, para los caracteres estudiados, lo que indicaría que estos caracteres cefálicos tienden a modificar sus dimensiones de acuerdo a las presiones ambientales que encuentran en un hábitat nuevo (Dujardin y col. 1999b); los caracteres morfométricos de cápsula cefálica reflejan que los especímenes machos de insectario presentan un tamaño promedio menor al resto de especímenes de las poblaciones analizadas, lo que podría deberse a una influencia ambiental; con los especímenes de insectario mostrando una reducción de tamaño respecto a sus antecesores capturados en ambientes naturales (Zeledón 1981; Dujardin y col. 1999b).

Asimismo Jaramillo y col. (2001) observaron semejante reducción en el tamaño de cápsulas cefálicas y hemiólitros de *P. megistus* de una colonia de laboratorio, comparadas con especímenes silvestres de la misma especie. La explicación podría deberse a la baja presión selectiva que ocurre en un ambiente con condiciones uniformes de temperatura, humedad y

alimentación, siendo esta última un factor preponderante en el desarrollo del individuo, ya que en condiciones de insectario esta alimentación resulta ampliamente satisfecha originando un menor tiempo de ocurrencia entre cada ecdisis, consecuentemente el individuo no tendrá el tiempo necesario para su desarrollo total; asimismo la menor área de desenvolvimiento al parecer juega un rol importante; Schoofield (1999) pensó en esta dirección cuando sugirió que dicho comportamiento se debe a una supervivencia mayor, en el laboratorio, de los individuos pequeños comparada con la que se presenta en el campo. Dujardin y col. (1997a, b) encontraron una situación similar en *T. infestans* de origen doméstico comparados con los silvestres; vemos entonces, el efecto de la selección natural sobre el fenotipo de tamaño. Si paralelo a este efecto del ambiente sobre el desarrollo hay genes expresando el mismo fenotipo, la selección los favorecería, se perdería la varianza génica y con el transcurso del tiempo se podría llegar a la fijación de ciertos alelos, llamándose este proceso de asimilación genética (Futuyma 1986).

Esta simplificación genética que ya se encuentra presente en menor cantidad en especímenes domésticos, se ve incrementada en los ejemplares de insectario; pudiendo ser explicada la reducción en el tamaño de los hemiólitros en función a que estos ejemplares tanto domésticos como los criados en insectario, no necesitan poseer alta capacidad dispersativa para conseguir su alimento, con sucede con especímenes silvestres; pero se diferencian en que el ambiente de los ejemplares de insectario es más restringido y estable que de los domésticos, dando como resultado la reducción progresiva del tamaño de los hemiólitros, asimismo diversos estudios muestran que un vuelo activo se encuentra asociado con el bajo estado nutricional del triatomino (Schoofield y col. 1999); por lo tanto esto se encontraría anulado para especímenes de insectario, que generalmente son alimentados hasta su satisfacción completa, en el transcurso de cortos periodos de tiempo (7 días), donde la inanición no resultaría ser un problema para ellos.

Las medias de los caracteres morfométricos de hemielitros (**Tabla 15 y 18**) de los especímenes no muestran diferencias significativas entre los hemielitros derecho e izquierdo para cada población sexual analizada. Se observa también la presencia de diferentes tamaños en hemielitros de especímenes hembras y machos de insectario y de ecotopos naturales. Siendo, también las medias de los especímenes machos de insectario los que presentan un menor tamaño al compararlas con las demás poblaciones restantes. Dujardín y col. (1999a) mostraron que los triatominos en campo ante la falta de alimentación o debido a la destrucción del hábitat, son principalmente los machos quienes emprenden migración mediante el vuelo activo, siendo este último responsable del mecanismo de dispersión, por lo que en la naturaleza, la intensidad de la selección sobre los hemielitros puede ser más fuerte para los machos que para las hembras. Por tanto, cuando se pasa al insectario se pierde tal presión de selección por el ambiente, ya que el vuelo activo se encuentra asociado con el bajo estado nutricional del triatomo en condiciones naturales (Schoofield 1999); por lo tanto esto se encontraría anulado para especímenes de insectario, que son alimentados hasta su satisfacción completa, donde la inanición no sería un problema para especímenes de insectario.

Así al analizar las distancias geográficas entre poblaciones naturales de *R. ecuadoriensis* se encontró que no existe variación significativa en cuanto al tamaño de cápsula cefálica y hemielitro de especímenes provenientes de Simbrón y Pampa Puquio, las que se encuentran con una separación geográfica aproximada de 38 km. Estos resultados difieren con el trabajo de Pinto y col. (1999), quienes investigaron en *R. neglectus* en dos provincias de Brasil, encontrando diferencias morfométricas en poblaciones de insectos de ambas localidades, atribuyéndolas a tendencias genéticas y a cambios en las condiciones climatológicas; además, estiman que los especímenes que poseen mayor variabilidad genética tendría una elevada plasticidad en su comportamiento. Dujardín y col. (1998) propone el modelo de “Aislamiento por la distancia o vecindad”, el cual, significa que es más probable que se realice el intercambio genético entre poblaciones vecinas que entre poblaciones más

distantes geográficamente; así, las poblaciones de una misma especie geográficamente cercana no tienen barreras biológicas para impedir el flujo genético entre ellos. Sin embargo el flujo genético puede reducirse debido a factores externos tales como la topografía del lugar (río, cerros, montañas, etc.) o clima (temperatura, lluvia, humedad, etc.). La presencia de reducción del tamaño tiene varias teorías, unas de ellas es la de Zeledón (1981), el cual propone que en condiciones naturales, las ninfas realizan muchos intentos de alimentarse lo que a veces no resulta, alargando por tanto la vida de las ninfas y como consecuencia su tamaño. Por el contrario en el insectario, cada comida de la ninfa puede ir hasta su satisfacción completa, permitiendo el desarrollo de la siguiente muda más rápidamente, lo que resultaría un tamaño menor del adulto. Otra teoría sería que en insectario los más pequeños sobreviven con los más grandes, no así en el ambiente silvestre, desplazando entonces el promedio de los tamaños hacia valores inferiores (Dujardin y col. 1999a). Por último una teoría más general, es la llamada “ley de Bergmann” según la cual los organismos viviendo en ambientes más fríos son generalmente más grandes (Ray 1960).

6.3 Caracterización de cepas de *T. cruzi*/ *T. rangeli*

T. cruzi comprende un conjunto de poblaciones de cepas que circulan entre vectores, hombre y reservorios, tanto domésticos como silvestres. Se han realizado aislamientos del parásito de diversos hospederos, demostrándose una gran variación intraespecífica en cuanto a diferencias morfológicas de las formas sanguíneas, virulencia, habilidad para inducir lesiones, susceptibilidad para agentes quimioterapéuticos, constitución antigénica y capacidad de infección para células hospederas. (Brenner 1985).

La enorme heterogeneidad que presentan las especies de tripanosomas, dificulta su clasificación taxonómica, la cual es fundamental en la epidemiología de la tripanosomiasis americana. Los métodos tradicionales para la caracterización de cepas (morfometría, curva de

parasitemia, patogenicidad, distribución geográfica y localización tisular), son insuficientes para alcanzar este objetivo. Esto ha llevado al empleo de otros métodos, con el fin de caracterizar adecuadamente estos aislados (Guzmán-Marín 1999)

Uno de los objetivos de esta memoria es caracterizar mediante técnicas bioquímicas, seis tripanosomas aislados de distintas áreas geográficas de Sudamérica (principalmente Perú y Brazil) y de diferentes hospederos y vectores. Empleándose el aislado *T. cruzi*, cepa Maracay (TCI) como referencia. Nuestro primer intento fue adaptar los diferentes flagelados al cultivo "in vitro". Para ello hemos ensayado distintos medios de cultivo (GRACE'S, MTL, TC, SDM y RPMI). Estos medios nos han permitido conocer datos acerca de las necesidades nutritivas de los distintos flagelados. De todos los medios utilizados, el medio Grace's es con el que se obtiene mayor densidad de crecimiento en los aislados: TCII, TP, TRa, TRh y la cepa referencia TCI. En el caso del tripanosoma aislado de un humano asintomático (TH), el medio más idóneo es el medio MTL y para el caso del tripanosoma aislado de un marsupial (TM), la máxima densidad se obtiene con el medio SDM. Ambos medios en su composición tienen hemoglobina humana a una concentración de 0,25 gr/l. Esto parece indicar que ambos aislados requieren para su crecimiento "in vitro" de este componente.

Una vez adaptado los distintos aislados al cultivo "in vitro", continuamos el resto de los estudios utilizando el medio de cultivo Grace's para mantener el crecimiento de estos parásitos, ya que es el medio más idóneo en general. El motivo que nos llevo al cultivo "in vitro" de todos los aislados en un mismo medio, fue que diversas poblaciones de *T. cruzi*, catalogadas como zimodemas distintos, podrían no serlo, en virtud de haber sido cultivadas en distintos medios de cultivo (Ramírez y col. 1998).

Nuestro siguiente objetivo ha sido caracterizar estos tripanosomátidos mediante el test de aglutinación por lectinas. De las tres lectinas empleadas, la lectina *Concavalina A*, no permite apreciar diferencias cualitativas entre los siete aislados. Lo que indica que todos ellos llevan en la composición de su membrana α -D-glucosa, y α -D-manosa, aunque si nos permite

apreciar diferencias cuantitativas, los aislados denominados TH y TRh, en la composición de sus membranas, las moléculas α -manosa y α -glucosa, son más numerosos que para los aislados TCI, TCII y TM, que muestran una menor aglutinación. Esta misma lectina nos permite marcar una nueva y clara diferencia entre TRa y el resto de los aislados, ya que presenta menor aglutinación.

La lectina *Vicia villosa* (VV), y a todas las dosis ensayadas, solamente aglutinan al aislado TRa. Esta lectina tiene afinidad para aglutinar aquellos parásitos que poseen en su superficie N-acetilgalactosamina, lo que indica que el aislado TRa, presenta una clara diferencia en cuanto a la composición de los azúcares de su membrana, ya que poseen unidades de N-acetilgalactosamina, que el resto de los aislados no poseen. Teniendo en cuenta las observaciones de Miranda y Tejera (1984), en el sentido de que la lectina VV, solamente aglutinan a cepas de *T. rangeli*, nos sugiere que TRa se trate de una cepa de *T. rangeli*.

La lectina germen de trigo (WGA), igualmente, nos permite poner de manifiesto diferencias cualitativas y cuantitativas entre los siete aislados. Esta lectina tiene afinidad por los grupos N-acetilglucosamina y N-acetilneuramínico. En la composición de los azúcares de membrana de los aislados, TP, TRa y TM, no existen tales azúcares, por el contrario, si son muy numerosos en el aislado del humano asintomático (TH), aunque estos azúcares existen en menor cantidad en los aislados, TCII, TCI y TRh. A la vista de estos resultados y según la composición de azúcares de la membrana, podemos agrupar los siete aislados en tres grupos: Grupo I: incluiríamos a TCI, TCII y TH; Grupo II: TP y TM, y en el Grupo III: estaría el aislado TRa.

De los ocho sistemas enzimáticos ensayados, la enzima 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6-GPD), nos permite diferenciar claramente al aislado TRa del resto, ya que este es el único que posee esta actividad enzimática. Estos nuevos datos junto con los obtenidos en el test de aglutinación por lectinas, nos confirmaría que estamos ante una cepa de *Tripanosoma* claramente diferenciable de la cepa Maracay, usada como referencia en este

estudio. Si tenemos en cuenta que este aislado lo fue de las glándulas salivales de un triatomino, nos sugiere la posibilidad de que este tripanosomátido pertenezca a *T. rangeli*. Reforzando esta hipótesis tenemos que, este mismo aislado no presenta actividad glucosa -6-fosfato deshidrogenasa (G6PD), ni isocitrato deshidrogenasa (IDH), mientras que el resto sí. Y además, para las enzimas: malato deshidrogenasa (MDH), enzima málico (ME) y superóxido dismutasa (SOD), presenta un perfil electroforético completamente diferente.

La enzima glucosa -6 fosfato- deshidrogenasa (G6PD), glucosa fostato isomerasa (GPI), fosfoglucomutasa (pGM) y la superóxido dismutasa (SOD), nos permiten diferenciar el aislado de referencia TCII del resto de los aislados. Los aislados TCI y TP, muestran unos perfiles isoenzimáticos muy semejantes entre sí, para las enzimas G6PD, IDH y PGM, que los diferencian de los aislados TH, TRh y TM. La enzima SOD, nos permite diferenciar a estos aislados entre sí, ya que el aislado TCII, presenta un perfil electroforético diferente del aislado TP para este sistema. También el sistema IDH y nuevamente la SOD, nos diferencia a su vez al aislado TM de los aislados TH y TRh. Estos dos últimos son los que presentan para todos los sistemas enzimáticos estudiados un perfil electroforético semejante.

Los perfiles isoenzimáticos nos permiten sugerir la existencia de al menos dos especies diferentes dentro de estos 7 aislados. Por un lado, el aislado TRa lo incluiríamos dentro de *T. rangeli*, y por otro lado, en el segundo grupo podríamos diferenciar 3 Clusters que irían estrechamente relacionados con la distribución geográfica de su aislamiento. El Cluster 1: incluye la cepa de referencia TCI, aislada en Venezuela; Cluster 2: englobaría los aislados de Perú (TCII y TP) y en el tercer Cluster se incluirían los aislados procedentes de Brasil (TH, TRh y TM).

Estos resultados que parecen estar en parte, en discordancia con los obtenidos por el test de aglutinación de lectinas, mediante el cual se agrupaban a los aislados TCII, TH y TRh, en el mismo conjunto al que pertenece TCI y en un grupo distinto al que pertenecen TM y TP,

no es tanta la diferencia puesto que salvo en el caso del aislado TH (lectina WGA, **Tabla 19**), donde la aglutinación es fuerte, en el resto (TCII y TRh) la aglutinación es moderada.

Por lo que se sabe hasta la fecha, ninguno de los miembros de la familia Trypanosomatidae estudiados, son capaces de degradar la glucosa totalmente hasta CO₂, bajo condiciones aeróbicas, excretándose al medio como metabolito fermentativo una gran parte de su esqueleto carbonado. La excreción al medio de cultivo de estos ácidos orgánicos como metabolitos finales hace que el pH del medio baje (datos nos mostrados).

La cepa de referencia TCI presenta el metabolismo glucolítico muy semejante a los que presentan las formas procíclicas de *T. brucei*, en donde se produce como degradación parcial de la glucosa, los metabolitos: alanina, acetato y succinato (Clayton y Michel, 1996).

La producción de acetato parece ser común a todas las cepas de *T. cruzi* estudiadas: Tulahuen (Cazulo, 1994), cepa Y (Rogerson y Gutteridge, 1980) y la cepa Bolivia (Penin y col. 1998). La alanina es otro de los metabolitos mayoritariamente detectados en las cepas Bolivia e Y, aunque no ha sido detectado en la cepa Tulahuen.

En este estudio, la cepa Maracay excreta los mismos metabolitos que han sido sugeridos para otras cepas de *T. cruzi*, y mencionados anteriormente por diversos autores, aunque estos autores encuentran que el metabolito mayoritario es el succinato (Cazzulo, 1994 y Urbina, 1987) y no el acetato como refleja nuestros resultados.

Los aislados TCII, TP y TRa, excretan estos mismos metabolitos, aunque en el caso de TCII y TRa, el metabolito principal es el succinato.

La excreción de metabolitos finales nos permite marcar diferencias entre los aislados de Brasil (TH, TRh y TM) con los otros aislados. El acetato sigue siendo el metabolito mayoritario excretado por TH y TM, pero además, estos aislados no excretan alanina ni

succinato, pero en cambio si excretan etanol y glicerol. Y, en el caso de TH, además excreta malato, aunque en muy pequeña cantidad. La cepa aislada del marsupial y procedente de Brasil (TM), excretan también acetato, etanol, glicerol y lactato. El aislado del triatomino y procedente de la región del Amazonas excreta solamente acetato y alanina.

Hasta ahora no era conocido en ninguna cepa de *T. cruzi*, la producción de etanol, aunque si se conoce en otras especies de la familia Trypanosomatidae, como es el caso de las especies pertenecientes al género *Phytomonas* (Sánchez Moreno y col. 1992), donde el etanol, es uno de los productos finales mayoritario. Tampoco se conocido en la actualidad que las cepas de *T. cruzi*, excreten glicerol como metabolito fermentativo, aunque en un estudio anterior de nuestro grupo, si pudimos detectar cierta cantidad de glicerol con la cepa Bolivia (Penin y col. 1998).

El hecho de que los miembros de la familia Trypanosomatidae no produzca glicerol, podría ser explicado porque han perdido la actividad de la lactato deshidrogenasa (Mukkada 1985), enzima responsable para la reoxidación del NADH. Esta pérdida es compensada por la conversión del glicerol fosfato a glicerol por una fosfatasa (Opperdoes 1987).

Una vez realizados los estudios de caracterización bioquímica, aplicamos el tratamiento estadístico mediante el análisis jerárquico por individuos, para intentar establecer las relaciones filogenéticas entre los 7 aislados, para ello seleccionamos la distancia euclídea al cuadrado como base para medir las asociaciones entre los aislados, así como los diferentes procedimientos de agrupamiento. Hay que advertir que estamos en la clasificación de 7 aislados en los que se han medido 52 variables. Seleccionamos la distancia euclídea al cuadrado y los siguientes procedimientos de agrupamiento: linkaje simple, linkaje completo, linkaje promedio entre grupos, linkaje centroide ponderado, método de la mediana o centroide no ponderado y método de Ward.

MÉTODO	CORRELACIÓN COFENÉTICA
Linkaje Simple	0.7355322
Linkaje Completo	0.7518501
Linkaje Promedio	0.772639
Método del centroide	0.758612
Método de la mediana	0.7204136
Método de Ward	0.757071

Para medir el parecido de las clasificaciones obtenidas y tras comprobar si tienen un alto grado de parecido, determinamos el método idóneo mediante el coeficiente de correlación cofenético. Este coeficiente mide el grado de distorsión existente entre las relaciones, medidas en términos de distancias, originales de los individuos y las que al final del análisis existen. Si los dendogramas obtenidos guardan un alto parecido, seleccionaremos como óptimo el método con más alta correlación cofenética (linkaje promedio entre grupos).

En un principio este análisis matemático nos permite agrupar a nuestros aislados en dos Clusters: Cluster 1, formado por los aislados de *T. cruzi*, cepa Maracay, (TCI), y los aislados de Perú (TCII y TP) y un segundo Cluster formado por los aislados de Brasil, (TH, TRh y TM). El aislado TRa, es el único que discrepa en su inclusión en uno de estos dos Clusters, ya que sea cual sea el procedimiento estadístico seguido, el aislado TRa se une al final del agrupamiento o bien en una etapa intermedia entre los dos Clusters.

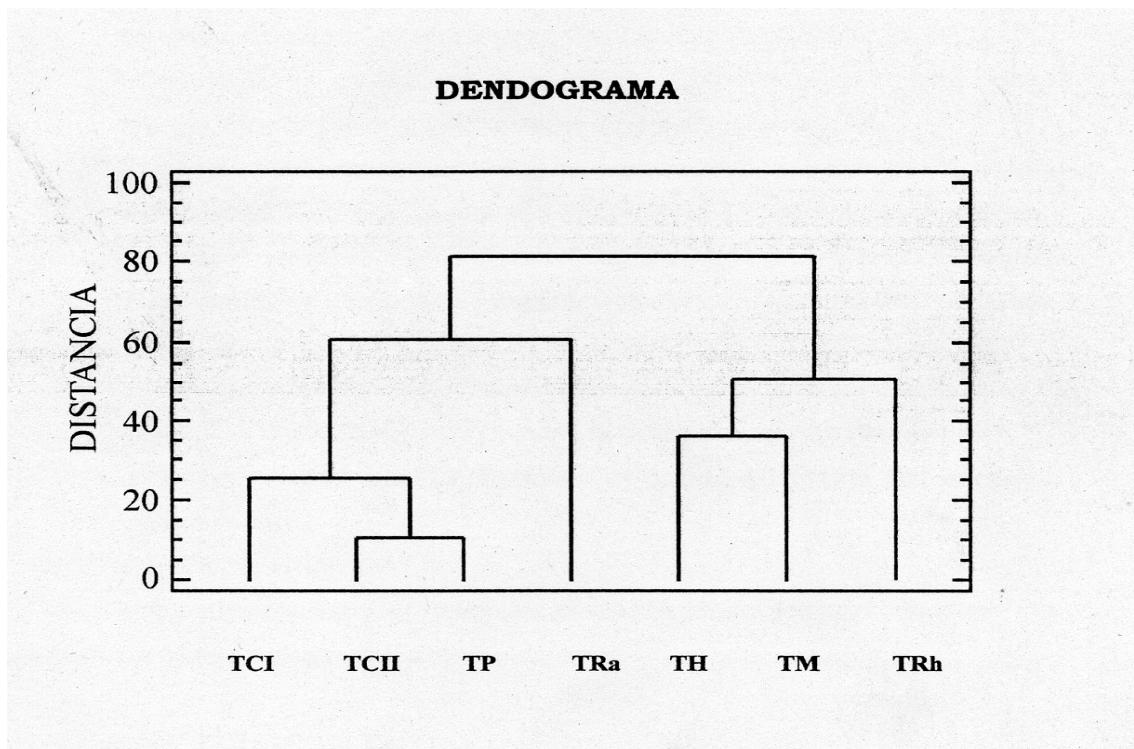
En nuestra opinión y para el método que ha sido seleccionado cabría plantearse una clasificación de los aislados en dos o tres Clusters. La diferencia entre ambas decisiones está en la ubicación de TRa. En efecto, para la clasificación en dos Clusters, quedaría englobado junto con la cepa de referencia y los dos aislados procedentes de Perú (TCII y TP), mientras que para la solución en 3 Clusters, quedaría como un Cluster unitario. Nosotros creemos que la segunda opción es la más realista, basándonos en el hecho de que en el resto de los procedimientos o bien le ocurre lo mismo o, incluso, es el último individuo en unirse, además,

conviene no olvidar que una forma tradicional de diferenciar *T. cruzi* y *T. rangeli*, es por el lugar de aislamiento de estos flagelados, en caso de *T. rangeli* se aísla de las glándulas salivales de los insectos. Por lo tanto, la configuración que proponemos es la que viene reflejada en el siguiente dendograma y que agrupa a nuestros aislados en tres Clusters:

Cluster 1: TCI, TCII y TP

Cluster 2: TH, TRh y TM

Cluster 3: TRa



VII. CONCLUSIONES

CONCLUSION GENERAL

La presencia de triatominos domésticos, peridomésticos y silvestres, el grado de infección con *T.cruzi* y/o *T.rangeli* han permitido actualizar la información sobre la distribución geográfica y prevalencia de algunas especies de triatominos: *Panstrongylus herreri*, *Triatoma carrioni*, *Rhodnius ecuadoriensis*, *Panstrongylus geniculatus*, *Panstrongylus chinai*, y *Hermanlenticia matsunoi*, y determinar que la región Nor oriental de Perú es un peligro potencial de la Enfermedad de Chagas.

CONCLUSIONES ESPECÍFICAS

1. Se ha recolectado e identificado seis especies de triatominos: *Panstrongylus herreri*, *Triatoma carrioni*, *Rhodnius ecuadoriensis*, *Panstrongylus geniculatus*, *Panstrongylus chinai*, y *Hermanlenticia matsunoi*, en la Región norte y nororiental del Perú. Especies que están mostrando fuerte comportamiento sinantropico, debido probablemente a su complejidad ecologica.
2. Se ha determinado los índices entomológicos de infestación triatomino-domiciliar, Índice de infección natural de los insectos por *Trypanosoma*, la densidad y potencial papel de vectorial de esas especies, parámetros básicos en la aplicación de programas de control.
3. En los estudios de morfometria, se ha observado variación entre individuos de *P. herreri* y *R. ecuadoriensis* procedentes de poblaciones naturales y de colonias de insectario. Las medidas morfométricas de hemélitros y cápsulas cefálicas de poblaciones naturales de *P. herreri* y *R. ecuadoriensis* presentan mayor tamaño respecto a la población de insectario.

4. Se ha caracterizado diversa cepas de *T. cruzi* y *T. rangeli* por métodos biológicos (infección experimental), bioquímicos (zimodemas o clústers).y moleculares.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.

1. Acosta L, Romanha AJ, Cosenza H, Krettli AU. (1991). Trypanosomatids isolates from Honduras: differentiation between *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*. *Am. J. Trop. Med. Hyg* 44: 676-683,
2. Acosta N, Maldonado M, Sanabria L, Yaluff G, Fuentes S, Torres S, Ferreira ME, Rojas de Arias A y Shozawa T. (1995). Characterization of Paraguayan *Trypanosoma cruzi* strains isolated from acute patients of Chagas disease. *Trop. Med. Parasitol.* 46(3):195-200.
3. Andrade SG. (1985). Morphological and behavioural characterization of *Trypanosoma cruzi* strains. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 18(suppl):39-46.
4. Arrarte Ovalle J. (1955). Nota preliminar acerca de la infección natural del *Panstrongylus chinai* (Del Ponte) por *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Med. Per.* 26: 247-248.
5. Ayaqui R. (1987). Tripanosomiasis Americana en el Valle de Vitor. Departamento de Arequipa: Infección natural de roedores sinantrópicos por *T.cruzi*, Chagas 1909. Tesis Biólogo EAP Biología. UNSAA.
6. Ayaqui R, Córdova E. (1988). Infección natural de *Rattus rattus* y *Cavia porcellus* por *Trypanosoma cruzi*. Chagas 1909 en la localidad de Murco, Arequipa 1988. IX Congreso Nacional de Biología, Piura. Perú. Res. 182.
7. Barreda G. (1995). Enfermedad de Chagas en el Perú. Proceedings of Internacional Workshop on population genetics and control of triatominae, Santo Domingo de los colorados, Ecuador. Editors; Pag.39.
8. Barreto P, Barretto M, Hurtado C (1988). Nuevos hallazgos de Colombia de *Panstrongylus geniculatus* (Latreille, 1811) y *Triatoma dispar* (Lent, 1950) (Hemiptera: Reduviidae). *Colombia Med* 19: 64-67.
9. Belhadj S, Pratlong F, Toumi NH, Kallel K, Mahjoub H, Babba H, Azaiez R, Dedet JP, Chaker E. (2002). Visceral leishmaniasis in Tunisia: result of the isoenzymatic characterization of 65 *Leishmania infantum* strains. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 96(6): 627-30

10. Ben Adberrazak S, Guerrini F, Mathieu-Daudé F, Truc P, Neubauer K, Lewicka K, Barnabé C y Tibayrenc M. (1993). Isoenzyme electrophoresis for parasite characterization. In: Hyde, J.E. ed. *Methods in Molecular Biology*, Vol. 21, Chapter 27. *Humana Press Inc.* Totowá. N.J.
11. Beyer WF y Fridovich I. (1987). Assaying for superoxide dismutase activity: Some large consequences of minor changes in conditions. *Anal. Biochem.* 161: 559-660.
12. Borges E. et al. (1999). Genetic variability in Brazilian triatomines and the risk of domiciliation. *Mem Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, 94(Suppl):371-373
13. Bradford M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
14. Brener Z. (1985). General review on *Trypanosoma cruzi* classification and taxonomy. *Rev Soc Bras Med Trop*, 18 (suppl):1-8.
15. Brisse S, Henriksson J, Barnabe C, Douzery EJP, Berkvens D, Serrano M, de Carvalho MR, Tibayrenc M. (2003). Evidence of genetic exchange and hybridization in *Trypanosoma cruzi* based on nucleotide sequences and molecular karyotype. *Infect. Gen. Evol.* 2: 173-183.
16. Brisse S, Barnabé C, Tibayrenc M. (2000). Identification of six *Trypanosoma cruzi* phylogenetic lineages by random amplified polymorphic DNA and multilocus enzyme electrophoresis. *Int. J. Parasitol* 30: 35-44.
17. Cáceres A, Troyes Lucinda, Gonzáles-Pérez Antero, (2002). Enfermedad de Chagas en la región nororiental del Perú. Triatomines (Hemiptera, *Reduviidae*) presentes en Cajamarca y Amazonas. *Rev Peru Med Exp Salud Publica* 19 (1): 333-341.
17. Calderón F. (1996). Chinchas triatomines (Hemiptera: Reduviidae) de la Región Grau. Piura. Perú. *Rev. Per. Ent.* 38:19-22
18. Cannata JJB y Cazzulo BM. (1985). The aerobic fermentation of glucose by *Trypanosoma cruzi*. *Comp. Biochem. Physiol.* 79:297-308.

19. Cassini, C.; J. Dujardin; M. Martinez, A. Percira and R. Salvatela. (1995). Morphometric differentiation evidenced between two geographic populations of *Triatoma infestans* in Uruguay. *Res. Rev. Parasitol.* 55(1): 25-30.
20. Castillo, R y Vargas, F. (1995). *Rhodnius ecuadoriensis* naturalmente infectado por *Trypanosoma cruzi* en el Valle de Saña Lambayeque Cong. Per. Parasit. Trujillo-Perú. Octubre, pp. 38.
21. Catarino LM, Serrano MG, Cavazzana M, Almeida ML, Kaneshina KE, Campaner M, Jankevicius JV y Teixeira MG. (2001). Clasification of trypanosomatids from fruits and seeds using morphological, biochemical and molecular markers revealed several genera among fruit isolates. *FEMS Microbiol. Letters* 11: 134-145.
22. Cazzulo JJ. (1994). Intermediate metabolism in *Trypanosoma cruzi*. *J. Bioenerg. Biomemb.* 26: 157-165.
23. Chagas C. (1924). Sobre a verificação do "*Trypanosoma cruzi*" em macacos do Pará (*Chysothrix sciureus*). *Scien. Med.* 2:75-76.
24. Clayton CE y Michel P (1996). Metabolic compartmentation in African Trypanosomes. *Parasitol. Today* 1: 2-12.
25. Córdova G. (1993). Detección de la infección por *Trypanosoma cruzi* mediante pruebas serológicas en 500 donadores de sangre de la ciudad de Arequipa. [Tesis de Bachiller], Arequipa-Perú: Facultad de Medicina UNSA;
26. Cuba CA. (1975). Estudio de una cepa peruana de *Trypanosoma rangeli*. IV Observações sobre a evolução e morfogênese do *T. rangeli* na hemocele e glândulas salivares de *Rhodnius ecuadoriensis*. *Rev. Inst. Méd. Trop. de São Paulo* 17: 284-297,
27. Cuba CA. (1998). Revisión de los aspectos biológicos y diagnósticos del *Trypanosoma* (Herpetosoma) *rangeli*. *Rev. Soc. Brasil. Med.Trop.* 31(2):207-220
28. Cuba CA, Abad-Franch F, Roldán RJ, Vargas VF, Pollack VL, Miles MA (2002). The triatomines of northern Peru, with emphasis on the ecology and infection by trypanosomes of *Rhodnius ecuadoriensis* (Triatominae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 97, 175-183.

29. Cuervo P, Cupolillo E, Segura I, Saravia N, Fernandez O. (2002). Genetic diversity of colombian sylvatic *Trypanosoma cruzi* isolates revealed by the ribosomal DNA. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 97: 877-880..
30. D'Alessandro A, Saravia NG. (1992). *Trypanosoma rangeli*. In: Kreier J, Baker JR (eds) *Parasitic protozoa*, 2nd edition, Academic Press, New York, Vol 2, p 1-45.
31. Denicola-Seoane A (1992). Succinate-dependent metabolism in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes *Mol. Biochem. Parasitol.* 54: 43-50
32. Dias JCP (2000). Epidemiología. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas, 2° ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p. 48-74
33. Dias JCP, Schoofield CJ. (1999). The evolution of Chagas *Discovery*, vol. 94, suppl. I: 103-121.
34. Dujardin JP. y col. (1997a). Metric differences between silvatic and domestic *Triatoma infestans* (Heteroptera, Reduviidae) in Bolivia. *J.Med.En.* 34(5): 544-551.
35. Dujardin JP y col. (1997b) The use of morfometric in entomological surveillance of sylvatic foci *Triatoma infestans* in Bolivia. *Acta tropica*, 66:145-153.
36. Dujardin, JP, M. Muñoz, N. Yaksic. (1998). Biología molecular: PCR-RAPD en vectores y parásitos intracelulares. La Paz-Bolivia.
37. Dujardín JP (1999a). Manual del primer curso internacional sobre morfometría y biología evolutiva. INLASA-IRD. La Paz, Bolivia. Pág. 20.22.
38. Dujardín JP M. Steindel, T. Chávez, E. Martínez, C.J. Schoofield. (1999b). Changes in the dimorphism of triatominae in the transition from natural to artificial habitats. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 94 (4): 565-569.
39. Ebert F. (1982). The identification of two main-groups of *Trypanosoma cruzi* stocks from Brazil by their isoenzyme patterns of isoelectrofocusing. *Tropenmed Pamsitol.* 33:140-146.
40. ECLAT (1998). European Community Latin American Research on triatominae. Proceeding second International Workshop on Population Genetics and control of Triatominae. Editores: CJ Schofield y Carlos Ponce. Tegucigalpa. Honduras

41. Fairban DJ. (1990). Factors influencing sexual size dimerphism in temperate waterstriders. *Am. Nat.*, 136, 61-86.
42. Feliciangeli D, Carrasco H, Patterson JS, Suarez B, Martínez C, Medina M (2004). Mixed Domestic Infestation By *Rhodnius Prolixus* Stål, 1859 And *Panstrongylus Geniculatus* Latreille, 1811, Vector Incrimination, And Seroprevalence For *Trypanosoma cruzi* Among Inhabitants In El Guamito, Lara State, Venezuela. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 71(4), pp. 501-505.
43. Frasch ACC, Goijman SG, Cazzulo JJ, Stoppani AOM. (1981). Constant and variable regions in DNA mini-circles from *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*: Application to species and stocks differentiation. *Mol. Biochem. Parasitol.* 4:163-170,
44. Futuyma DJ. (1986). *Evolutions Biology*. 2^{da} edic. Edit. Sinauer Associates, Inc. Massachusetts.
45. Ghosh DK, Ghosh AK, Ghosh KN y Bhattacharya A. (1990). Kinetoplastid flagellates: surface-reactive carbohydrates detected by fluorescein-conjugated lectins. *J. Parasitol.* 76(1):130-133.
46. Gilroy FV, Edwards MR, Nerton RS y O'Sullivan WJ. (1988). Metabolic studies of the protozoan parasite, *Crithidia lucidiae*, using proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Mol. Biochem. Parasitol.* 47: 297-303.
47. Grijalva MJ, Chiriboga R, Racines VJ, Escalante L, Rowland EC, (1997). Short report: Screening for *Trypanosoma cruzi* in the blood supply by the Red Cross Blood Bank in Quito, Ecuador. *Am J Trop Med Hyg* 57: 740–741.
48. Guhl F, Jaramillo C, Vallejo GA, Yockteng R, Cárdenas-Arroyo F, Fornaciari G, Arriaza, and Auderheide AC. (1999). Isolation of *Trypanosoma cruzi* DNA in 4,000-year-old mummified human tissue from northern Chile. *Am. J. Phys. Anthropol.* 108(4):401-407.
49. Guzmán-Marín ES, Zavalá-Castro JE, Acosta-Viana KY y Rosado Barrera ME. (1999). The importance of the characterization of *Trypanosoma cruzi* strains. *Rev. Bromed.* 10(3): 234-245.

50. Higo H, Yanagi T, Agatsuma, Cruz-Reyes A, UyemaN, Monroy C, Kanbara H y Tada I. (2000). Genetic structure of *Trypanosoma cruzi* in american continents: special emphasis on sexual reproduction in Central America. *Parasitol.* 121(4):403-408.
51. Hurtado E, Ruedas N, Huanca J, Cordova E. (2000). Evaluación del control vectorial de la enfermedad de Chagas en el distrito de Santa Isabel de Siguan. Dpto. Arequipa. 1998. Libro de resúmenes. IV Congreso de Parasitología. Setiembre 2000. p.251
52. Jaramillo N. O, Castilla D, Wolff. M (2001). XXXVII Annual Meeting on Basic research in Chagas Diseases Caxambú, MG, *Brasil. Abstract* VB 39, pg. 202.
53. Lent H, Wygodzinsky P (1979). Revision of the Triatominae (Hemiptera: *Reduviidae*), and their significance as vectors of Chagas disease. *Bull. Am. Museum Na. History*, 163, 123-520.
54. Lumbreras H. (1972). El problema de la enfermedad de Chagas en los diferentes departamentos del Perú. *Rev. Viernes Méd.* 23: 43-77
55. Machado CA, y Ayala FJ. (2001) Nucleotide sequences provide evidence of genetic exchange among distantly related lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Proc. Natl. Aca Sci USA*. 98: 7396-7401.
56. Machado PE, Mangrich Eger I, Rosa G, Koerich LB, Grisard EC y Steindel M. (2000). Differential susceptibility of triatomines of the genus *Rhodnius* to *Trypanosoma rangeli* from different geographical origins. Third Internet Conference on Salivarian Trypanosomes and other Trypanosomatids.
57. Marinkelle CJ, Vallejo GA, Guhl F, de Sánchez N. (1985). Differentiation between *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* in the intestine of the vector *Rhodnius prolixus*, based on the behaviour of these flagellates with regard to the lytic activity of complement. *Rev. Lat. Microbiol.* 27:21-25.
58. Marinkelle CJ, Vallejo GA, Schottelius J, Guhl F y De Sanchez N. (1986). The affinity of the lectins *Ricinus communis* and *Glycine maxima* to carbohydrates on the cell surface of various forms of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*, and the application of these lectins for identification of *Trypanosoma cruzi* in the feces of *Rhodnius prolixus*. *Acta Trop.* 43:215-223.

59. Mendonca MB, Nehme NS, Santos SS, Cupolillo R, Vargas N, Junqueira S, Naiff RD, Barret TB. (2002). Two main clusters within *Trypanosoma cruzi* zymodeme 3 are defined by distinct lineages of the ribosomal RNA cistron. *Parasitol.* 124: 177-184
60. Mendoza J, Miranda E, Velazco O, Tinoco O y Maciel M. 1995. Cardiopatía chagásica crónica. Presentación de 60 casos. *Arch. Inst. Cardiol. Mex.* 65:546-550.
61. Menezes DMF, Gontijo C, Figueiredo EM y Romanha AJ. (1996). Lectin interaction with *Leishmania amazonensis* promastigotes. *Inst. Mem. Oswaldo Cruz.* Vol. 91 (11):136.
62. Miles MA, Tøye PJ, Oswald SC y Godfrey DG. (1977). The identification by isoenzyme patterns of two distinct strain groups of *Trypanosoma cruzi*, circulating independently in rural area of Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 71: 217-225.
63. Miles MA, Souza A, Póvoa M, Shaw JJ, Laison R y Tøye PJ. 1978. Isoenzymic heterogeneity of *Trypanosoma cruzi* in the first autochthonous patients with Chaga's disease in Amazonian Brazil. *Nature* 272: 819-821.
64. Ministerio de Salud (2004). Manual de Procedimientos de identificación de triatominos (Hemiptera: *Reduviidae*) del Perú. Serie de Normas Técnicas N° 41.
65. Miralles DM, Marín C, Magán R, Fernández-Ramos C, Entrala E, Cordova O, Vargas F y Sánchez-Moreno M. (2002). In vitro culture and biochemical characterization of six trypanosome isolates from Peru and Brazil. *Exp. Parasitol.* 102(1): 23-29
66. Miranda IK y Pereira ME. 1984. Lectins discriminate between pathogenic and nonpathogenic South American trypanosomes. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 33(5):839-844.
67. Moncayo A. (1999). Progreso en la interrupción de la Enfermedad de Chagas en los países del cono Sur. *Medicina, Informes Técnicos* 59 (Supl. II): 120-124.
68. Morel C, Chiari E, Camargo EP, Mattei DM, Romanha AJ y Simpson L. (1980). Strains and clones of *Trypanosoma cruzi* can be characterized by patterns of restriction endonuclease products of kinetoplast DNA minicircles. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 77: 6810-6814.
69. Naquira, C. (2004). Situación de la enfermedad de Chagas en Perú y situación de su control. V Reunión de la Comisión Intergubernamental de la Iniciativa Andina. OPA/OMS. Lima-Perú, 6-7

70. Nunes LR, de Carvalho MRC y Buck GA. (1997). *Trypanosoma cruzi* strains partition into two groups based on the structure and function of the spliced leader RNA and rRNA gene promoters. *Mol. Biochem. Parasitol.* 86: 211-224.
71. Opperdoes FR. (1987). Compartmentation of carbohydrate metabolism of parasites. *Annu. Rev. Microbiol.* 41: 127-151.
72. Opperdoes F R. (1995). In *Biochemistry and Molecular Biology of Parasites* (Marr J.J. y Miller M. Eds), pp: 19-32. Academic Press.
73. Opperdoes FR y Michel P. (1991). The evolutionary origin of glycosomes. *Parasitol. Today.* 7: 105-109.
74. Opperdoes FR y Michel P. (2000). Enzymes of carbohydrates metabolism as potencial drug targets. Third Conference on Salivarian Trypanosomes and other Trypanosomatids.
75. OPS-ACDI (2004). Organización Panamericana de la Salud/ Organización Mundial de la Salud Agencia Canadiense para el Desarrollo Internacional. Proyecto de Eliminación de *Triatoma infestans* Visita de Monitoreo. Lima, Arequipa, Moquegua 11-15 julio
76. PAHO. (1982). Status of Chagas. Enfermedad in the region of the Ameritas. EPAHO. 3: 1-5.
77. Penin P, Sánchez-Moreno M y De Diego JA. (1998). Proton Nuclear Magnetic Resonance Analisis of Metabolism end products of the Bolivia strain of *Trypanosoma cruzi* and three of its clones. *Comp. Biochem. Physiol. Part A*, 120 (4): 571-574.
78. Pérez Cornelio M. (1999). Identificación de lectinas en frutas medicinales, su participación en la Hemaglutinación de la cepa *E. coli* enterohemorrágica 0157: H7. pp 11-15 (tesis).
79. Piazza RMF, Borges MM, Kloetzel JK y Stolf AMS. 1996. Reactivity of *Trypanosoma cruzi* strains with *Peanut Agglutinin* (PNA). Correlates with number of in vitro infected Host-Cells. *Acta Trop.* 61 (1): 41-50
80. Pinto, R.; S. Barbosa; J. Dujardin; C. Schofield; A. Maura and L. Diotaiuti. (1999). Characterization of *Rhodnius negletus* from two regions of Brazil using isoenzymes genitalia morphology and morphometry. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 161-166.

81. Ramírez ME, Noguera TB y Santos PS. (1998). Variación de zimodemos de *Trypanosoma cruzi* como efecto del cultivo y subcultivo en diferentes medios de mantenimiento. XXIX Cong. Nac. Microbiol. Oxatepec. 234.
82. Rassam MB, Al-Mudhaffar SA y Chance ML. (1979). Isoenzyme characterization of *Leishmania* species from Iraq. *Ann. Trop. Parasitol.* 73(6): 527-34.
83. Ray C. (1960). The application of Bergmann and Allen's rules to the poikilotherms. *J. Morphol.* 106: 85-108.
84. Reyes CP. (1995). Bioestadística aplicada: Agronomía, Biología y Química. 2^{da} edic. Edit. Trillas México. Pág. 34-36.
85. Rodríguez P, Montilla M, Nicholls S y col. (1998). Isoenzymatic Characterization of Colombian strains of *Trypanosoma cruzi*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Río de Janeiro. 93(6): 739-740.
86. Rogerson GW y Gutteridge WE (1980). Catabolism metabolism in *Trypanosoma cruzi*. *Int. J. Parasitol.* 10:131-135.
87. Roldán J. Vargas, F. (1996). Infección natural de *Panstrongylus chinai* con *Trypanosoma cruzi* en el Valle de Zaña. Lambayeque-Perú. *REBIOL.* 6(1-2): 96-97.
88. Sánchez-Moreno M, Laszity b, Coppens I y Opperdoes FR. (1992). Characterization of carbohydrate metabolism and demonstration of glycosomes in the *Phytomonas* spp. Isolated from *Euphorbia characias*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 54: 185-200.
89. Sánchez Moreno M, Fernandez Becerra. C, Castilla J y Osuna A. 1995. Metabolism studies by ¹HNMR of different forms of *Trypanosoma cruzi* as obtained in vitro culture. *FEMS. Microbiol. Lett.* 133: 119-25
90. Schoofield CJ. (1999). The process of domestication in triatominae. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. Rio de Janeiro, 94 (1): 375-378.
91. Schottelius J. (1982). Differentiation between *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* by their different complement sensitivity. *Trop. Med. Parasitol.* 33:147-150.
92. Schottelius J y Unlenbruck G. (1984). Intraspecific characterization of *Trypanosoma cruzi* stocks by the lectins from *Triticum vulgare* and *Arachis hypogaea*. *Zentralbl Bakteriol. Mikrobiol. Hyg.* 256(3):342-346.

93. Souto R P, Fernandes O, Macedo A M, Campbell D A, Zingales B (1996). DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 83: 141-152.
94. Steindel M, Dias-Neto E, Pinto CJ, Grisaard EC, Menezes CL, Murta SM, Simpson AJ, Romanha AJ. (1994). Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) and isoenzyme analysis of *Trypanosoma rangeli* strains. *J. Euk. Microbiol.* 41: 261-267.
95. Steindel M, Torna HK, Ishida MM, Murta SM, Carvalho Pinto CJ, Grisard EC, Schlemper BR, Ribeiro-Rodrigues R y Romanha AJ. (1995). Biological and isoenzymatic characterization of *Trypanosoma cruzi* strains isolated from sylvatic reservoirs and vectors from the state of Santa Catarina, Southern Brazil. *Acta Trop.* 60(3): 167-177.
96. Sturm N R, Degraeve W, Morel C, Simpson L (1989). Sensitive detection and schizodeme classification of *Trypanosoma cruzi* cells by amplification of kinetoplast minicircle DNA sequences: use in diagnosis of Chagas' disease. *Mol. Biochem. Parasitol.* 33: 205-214.
97. Sturm NSR y Simpson L. (1990). Kinetoplast DNA minicircle encode guide RNAs for editing of cytochrome oxidase subunit III RNA. *Cell.* 61:879-884.
98. Tarleton R. (2000). Parasite Persistence in the etiology of Chagas disease. Third Internet Conference on Salivarian Trypanosomes and other Trypanosomatids.
99. Tarleton R. (2001). Parasite persistence in the actiology of Chagas disease. *Int J Parasitol* 31: 550-554.
100. Tejera, (1920). *Tripanosoma (Herpetosoma) rangeli* en caseríos del distrito de Cascas, Contumazá, Cajamarca. *Rev. Soc Brasil Med Trop.* 31(2): 207
101. Tibayrenc M, Kjølberg F, Ayala F. (1990). A clonal theory of parasitic protozoa: the population structure of *Entamoeba*, *Giardia*, *Naegleria*, *Plasmodium*, *Trichomonas* and *Trypanosoma* and their medical and taxonomical consequences. *Proc. Natl Acad Sci URA*, 87: 2414-2418.
102. Toaldo CB, Steindel M, Sousa MA, Tavares CC. (2001). Molecular caryotype and chromosomal localization of genes encoding O-tubulina, Cisteina Proteinase, HSP 70 and Actin in *Trypanosoma rangeli*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 96:113-121.

103. Urbina JA. (1987). Intermediary metabolism of *Trypanosoma cruzi*. Arch. Biochem. Biophys. 258,186-195.
104. Valente VC. (1999). Potential for domestication of *Panstrongylus geniculatus* (Latreille, 1811) (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) in the municipality of Muaná, Marajó Island, State. Mem Inst Oswaldo Cruz. ,94 Suppl 1:399-400
105. Vallejo GA, Macedo AM, Chiari E, Pena SO. (1994). Kinetoplast DNA from *Trypanosoma rangeli* contains two distinct classes of minicircles with different size and molecular organization. Mol. Biochem. Parasitol. 67: 245-253.
106. Vallejo GA, Guhl F, Carranza JC, Triana O, (2003). Parity between kinoplast DNA and miniexon gene sequences support either clonal evolution in *Trypanosoma rangeli* strains isolated from *Rhodnius colombiensis*, *R.pallescens* and *R. prolixus* in Colombia. Infect. Gen. Evol. 3: 39-45
107. Vargas F, Castillo R, Torres P. (1986a). Tripanosomiasis en el norte peruano: *Trypanosoma rangeli* en triatominos del Valle Chicama, Departamento de La Libertad. VIII Congreso Nacional de Biología. Lima; p. 144
108. Vargas F, Castillo R, Torres P. (1986b). Trypanosomiasis en el norte peruano: *Trypanosoma cruzi* en *Panstrongylus chinai* en el valle de Jequetepeque, Departamento de La Libertad. VIII Congreso Nacional de Biología. Lima; p. 150.
109. Vargas F, castillo R, Torres, P. (1986c). Trypanosomiasis en el norte peruano: índice de infestación domiciliar y media de infestación triatomo/domiciliar por *Rhodnius ecuadoriensis*, en las localidades del Valle Chicama, Departamento La Libertad. VIII Congreso Nacional de Biología, Lima, p. 209.
110. Vargas F; Roldan Rodríguez, J; Pollack Velásquez, L; Cuba Cuba, C. (2000). Distribución de *Rhodnius ecuadoriensis* y su infección por *trypanosoma rangeli* en la provincia de Gran Chimú. La Libertad. Perú. Primer Congreso Peruano-Ecuatoriano de Medicina Tropical e Infectología del 30 Noviembre al 2 Diciembre 2000. U.N.T.
111. Vargas F, Ampuero C, Roldan J, Pollack L. (2002a) Ciclo biológico de *Panstrongylus herreri* (wygodzinsky, 1948) (Hemiptera: Reduviidae) en condiciones de laboratorio. Resúmenes IV Congreso Peruano de Parasitología del 22 –24 Setiembre 2000. Pág. 243.

112. Vargas F., Roldan-Rodriguez J, Ampuero-Rojas C., Varas-Jesus A., Vergara-Diaz C, y Cordova-Paz-Soldan O. (2002b). Impacto y residualidad de beta Ciflutrina en el control de *Rhodnius ecuadoriensis* en dos localidades del distrito de cascas, provincia Gran Chimú, La Libertad-Perú. V Congreso Peruano de Parasitología, 2-5 de Octubre. Trujillo-Perú. Pag.33
113. Vargas F. (2004). Biología de los vectores de la Enfermedad de Chagas en el norte de Perú. Ensayos sobre eliminación de *Rhodnius ecuadoriensis* .OPS. V Reunión de la Comisión Intergubernamental de la Iniciativa Andina. Lima-Perú (6-7 Mayo)
114. Vargas F. (2005). Control de la enfermedad de Chagas en el norte de Perú. Un reto a corto Plazo Primer Taller internacional sobre el control de la enfermedad de Chagas. Curso diagnóstico, Manejo y tratamiento de la enfermedad de Chagas. VI Reunión de la Iniciativa Andina para el control de la enfermedad de Chagas. OPS. Bogotá, Colombia, 2-6 Mayo. Pp.405-428.
115. Vera CV. (1999). Potential for Domestication of *Panstrongylus geniculatus* (Latreille, 1811) (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) in the Municipality of Muaná, Marajó Island, State of Pará, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* vol.94 s.1 Rio de Janeiro Sept.
116. WHO (2000). Challenges of Chagas Disease vector control in Central America. Position Paper WHO (CDS/WHOPES/GC/DPP/).
117. Zeledón R (1981). El *Triatoma dimidiata* y su relación con la Enfermedad de Chagas. Universidad Estatal a Distancia, San José, Costa Rica, p. 128-129.
118. Zubiaur F y Alonso P. 1985. Behaviour of *Naegleria Cavaniensis* and *N. gruberi* against different lectins. *Parasitologica* 2:267-272

INDICE

I. INTRODUCCION	7
II.- ANTECEDENTES	13
2.1. Vectores de la Enfermedad de Chagas	13
2.1.1 Vectores de la Enfermedad de Chagas en el Perú:	14
2.1.2 Ciclo Biológ2.1.2 Ciclo biológico de los vectores de la Enfermedad de Chagas	15
2.2. Los Parásito:	17
2.2.1 <i>Trypanosoma cruzi</i>	17
2.2.2 <i>Trypanosoma rangeli</i>	18
2.2.3. Índice de infección tripano/triatomino	19
2.3. Reservorios de la enfermedad de Chagas en el Perú:	21
2.4. Seroprevalencia de la Enfermedad de Chagas	21
2.5. Control de la Enfermedad de Chagas en el Perú	22
2.6. Caracterización bioquímica y molecular de cepas de <i>T. cruzi</i>/ <i>T. rangeli</i>	23
2.6.1 Aglutinación por Lectinas	24
2.6.2 Análisis Isoenzimáticos	26
2.6.3. Otras técnicas moleculares de caracterización	27
2.6.4. Metabolismo energético	30
III. OBJETIVOS	34
IV. MATERIAL Y METODOS	35
4.1 Estudio de Triatominos Vectores:	35
4.1.1. Área de Estudio	35
4.1.2. Captura de triatominos	36
4.1.2.1 Obtención de Datos climatológicos:	37
4.1.3. Identificación taxonómica y análisis de triatominos	37
4.1.4. Morfometría	37
4.1.4.1. Muestreo y tamaño muestral:	38

4.1.4.2. Obtención de la primera generación (F ₁) de <i>R. ecuadoriensis</i>	-----	39
4.1.4.3. Medidas morfométricas	-----	39
4.1.4.3.1. Medida alar y cefálica:	-----	39
4.1.4.3.2. Distancia entre los puntos homólogos	-----	42
4.1.5 Análisis numérico	-----	43
4.2 Aislamiento de cepas de <i>T. cruzi</i> / <i>T. rangeli</i>	-----	44
4.2.1 Origen de los Aislados	-----	44
4.2.2. Cultivo de los aislados	-----	45
4.2.2.1 Aislamiento	-----	45
4.2.2.2. Crioconservación	-----	46
4.2.2.3 Obtención de masa Celular	-----	46
4.2.3 Cuantificación de metabolitos	-----	47
4.2.3.1 Curvas de Crecimiento y de pH	-----	47
4.3 Caracterización de cepas de <i>T. cruzi</i> / <i>T. rangeli</i>	-----	47
4.3.1 Test de Aglutinación con Lectinas	-----	47
4.3.2 Caracterización Isoenzimática	-----	49
4.3.2.1 Bases teóricas	-----	49
4.3.2.2 Elección de los Sistemas Enzimáticos	-----	49
4.3.2.3 Técnica de Isoelectroenfoque	-----	50
4.3.3. Identificación de Metabolitos excretados por Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear de Protones (RMN ¹ H)	-----	52
4.4 Tratamiento Estadístico	-----	53
V. RESULTADOS	-----	54
5.1. Estudio de Triatomínos vectores	-----	54
5.1.1 Captura de Triatomínos por área de estudio	-----	55
5.1.2 Análisis Estadístico:	-----	61
5.2. Morfometría:	-----	63
5.3 Aislamiento de cepas de <i>T. cruzi</i> / <i>T. rangeli</i>	-----	71

5.3.1 Cultivo de los aislados	-----	71
5.4 Caracterización de cepas de <i>T. cruzi</i> / <i>T. rangeli</i>	-----	73
5.4.1 Aglutinación por Lectinas	-----	73
5.4.2 Análisis Isoenzimático	-----	74
5.4.3 Cuantificación de metabolitos	-----	77
VI. DISCUSIÓN	-----	81
6.1 Índice de infección Tripano/Triatomino:	-----	82
6.1.1 Vectores de la Costa Norte	-----	83
6.1.2 Vectores de los Valles Interandinos	-----	85
6.2. Morfometría	-----	87
6.3 Caracterización de cepas de <i>T. cruzi</i> / <i>T. rangeli</i>	-----	91
VII. CONCLUSIONES	-----	99
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	-----	101