

## ***Psammolestes arthuri* NATURALMENTE INFECTADO CON *Trypanosoma cruzi* ENCONTRADO EN SIMPATRÍA CON *Rhodnius prolixus* Y *Triatoma maculata* EN NIDOS DE AVES EN EL ESTADO ANZOÁTEGUI, VENEZUELA**

### ***Psammolestes arthuri* NATURALLY INFECTED WITH *Trypanosoma cruzi* FOUND IN SYMPATRY WITH *Rhodnius prolixus* AND *Triatoma maculata* ON BIRD NESTS IN ANZOÁTEGUI STATE, VENEZUELA**

PEDRO JOSÉ CRUZ-GUZMÁN<sup>1</sup>, ANTONIO MOROCOIMA<sup>1</sup>, JOSÉ DAVID CHIQUÉ<sup>1</sup>, JESMAR RAMONIS-QUINTERO<sup>1</sup>,  
MANUEL TOQUERO UZCÁTEGUI<sup>1</sup>, HERNÁN J. CARRASCO<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Universidad de Oriente, Núcleo de Anzoátegui, Escuela de Ciencias de la Salud, Centro de Medicina Tropical de Oriente, Barcelona, Venezuela, <sup>2</sup>Universidad Central de Venezuela, Facultad de Medicina, Instituto de Medicina Tropical, Laboratorio de Biología Molecular de Protozoarios, Caracas, Venezuela  
E-mail: amorocoima@gmail.com

#### **RESUMEN**

En Venezuela, la enfermedad de Chagas es un problema de salud pública con aproximadamente dos millones de personas infectadas y más de seis millones en riesgo de contraer la patología. En esta investigación se comprobó la presencia del chinche triatómido, *Psammolestes arthuri*, en nidos de diferentes especies de aves en comunidades rurales del estado Anzoátegui, algunos de ellos infectados naturalmente con *Trypanosoma cruzi*, en simpatria con otros triatomínos (*Rhodnius prolixus* y *Triatoma maculata*). Se recolectaron 3.277 triatomínos en 478 nidos de seis especies de aves (*Phacellodomus rufifrons*, *Troglodytes aedon*, *Icterus icterus*, *I. nigrogularis*, *Cacicus cela* y *Psarocolius decumanus*). Se encontró que 99,05% (3.246/3.277) eran ejemplares de *Ps. arthuri* y 0,95% (31/3.277) de otras especies de triatomínos, dentro de las cuales 0,57% (19/3.277) era *R. prolixus* y 0,37% (12/3.277) *T. maculata*. De los *Ps. arthuri* encontrados, 0,12% (4/3.246) presentaron infección natural por *T. cruzi*. La caracterización parasitológica de uno de los aislados de *T. cruzi* en ratones albinos machos de la cepa MNRI, mostró alta afinidad por células de musculatura cardíaca, esquelética y lisa, con una parasitemia máxima de  $2,4 \times 10^4$  parásitos/mL de formas sanguíneas de *T. cruzi* y una mortalidad de 100% de los ratones inoculados. Este aislado fue tipificado molecularmente como perteneciente al genotipo TcIII. Los resultados muestran que en el estado Anzoátegui, *P. arthuri* es una especie que se alimenta predominantemente de sangre de aves con bajo riesgo de transmisión vectorial de la enfermedad de Chagas a humanos.

**PALABRAS CLAVE:** Hemiptera, Reduviidae, Triatominae, Kinetoplastida, Trypanosomatidae, Aves, Passeriformes.

#### **ABSTRACT**

In Venezuela, Chagas' disease is a public health problem with around 2 million people infected and more than 6 million under risk of infection. In this study the presence of the triatomid *Psammolestes arthuri* is reported in nests of different species of birds from rural communities of Anzoátegui State, some of them found naturally infected with *Trypanosoma cruzi*, in sympatry with other species of triatomines (*Rhodnius prolixus* y *Triatoma maculata*). A total of 3,277 triatomine specimens were collected in 478 nests from 6 species of birds (*Phacellodomus rufifrons*, *Troglodytes aedon*, *Icterus icterus*, *I. nigrogularis*, *Cacicus cela* y *Psarocolius decumanus*). It was found that 99.05% (3246/3277) of specimens were *P. arthuri* and 0.95% (31/3277) other triatomine species, from which 0.57% (19/3277) were *R. prolixus* and 0.37% (12/3277) *T. maculata*. Only 0.12% (4/3246) of *P. arthuri* were infected with *T. cruzi*. The parasitological characterization of one *T. cruzi* isolate in white male NMRI mice showed high affinity for cardiac, skeletal and smooth muscle cells, with a peak parasitemia of  $2.4 \times 10^4$  parasites/mL blood stream forms of *T. cruzi* and 100% mortality of inoculated mice. This isolate was molecularly typed as belonging to TcIII genotype. The results show that in Anzoátegui State, *P. arthuri* predominantly feed on blood of birds, representing a low risk for vector transmission of Chagas' disease to humans.

**KEY WORDS:** Hemiptera, Reduviidae, Triatominae, Kinetoplastida, Trypanosomatidae, Aves, Passeriformes.

#### **INTRODUCCIÓN**

La enfermedad de Chagas o tripanosomosis Americana es una parasitosis crónica, que se desarrolla en una biogeosenosis compleja, cuyo agente etiológico es el protozooario hemoflagelado *Trypanosoma (Schizotrypanum)*

*cruzi* (Kinetoplastida, Trypanosomatidae). Este parásito circula entre numerosas especies de mamíferos que actúan como reservorios. Su transmisión se produce principalmente a través de la contaminación fecal, procedente de las deyecciones de insectos hematófagos del suborden Gymnocerata (Hemiptera; Reduviidae;

Triatominae) denominados triatominos, conocidos popularmente como chipos en Venezuela (Barretto 1979, Aché 1993, Herrera 2010, Carrasco *et al.* 2012, 2013).

Dentro de los triatominos, el género *Psammolestes* se compone de tres especies: *Ps. coreodes*, *Ps. tertius* y *Ps. arthuri* (Galvão *et al.* 2003). Se sugiere que éstas se especializaron para explotar microhábitats como nidos de aves en bosques abiertos (Lent y Wygodzinsky 1979, Abad-Franch y Monteiro 2007, Abad-Franch *et al.* 2009). Estas especies no se distinguen fácilmente desde el punto de vista morfológico (Lent y Wygodzinsky 1979, Aldana *et al.* 1996, Cazorla 2007); de allí que se insiste en la necesidad de complementar los estudios morfológicos tradicionales con la morfometría, electroforesis de isoenzimas o patrones de ADN/ARN (Costa *et al.* 1997, Schachter-Broide *et al.* 2004, Dos Santos *et al.* 2007). *Ps. arthuri* es el representante más septentrional del género, ampliamente distribuido en Venezuela y Colombia (Carcavallo *et al.* 1999, Gurgel-Gonçalves y Bandeira 2009).

*Psammolestes arthuri*, única especie del género presente en Venezuela (Lent y Wygodzinsky 1979, Soto-Vivas 2009, Soto-Vivas *et al.* 2011), fue identificada por Pinto (1926), a partir de insectos recolectados por Enrique Tejera y sus estadios ninfales fueron descritos por Aldana *et al.* (1996). Su distribución geográfica en Venezuela, comprende los estados: Anzoátegui, Aragua, Apure, Barinas, Carabobo, Cojedes, Guárico, Lara, Mérida, Miranda, Monagas, Portuguesa, Táchira, Trujillo y Yaracuy (Otero *et al.* 1975, Lent y Wygodzinsky 1979, Ramírez-Pérez 1985, Galvão *et al.* 2003). Se ubica en diversas zonas incluyendo el bosque muy seco tropical, bosque seco tropical, bosque espinoso premontano y el bosque seco premontano (Ramírez-Pérez 1987). *Ps. arthuri* es una especie de hábitos considerados generalmente estenofágicos, siendo asociada con nidos de aves paseriformes: *Phacellodomus rufifrons* (Cucarachero Marrón), *Troglodytes (aedon) aedon* (Cucarachero Jabado), *Troglodytes (aedon) musculosus* y *Campylorhynchus zonatus*, junto con roedores, ofidios y anfibios (Pifano 1938, Lent y Wygodzinsky 1979, Carcavallo *et al.* 1999). Ha sido encontrado naturalmente infectado con *T. cruzi* (Pifano 1938, Sherlock *et al.* 1997), lo cual indica que se alimenta de mamíferos u otros vertebrados, teniendo relativa importancia epidemiológica en la transmisión zoonótica de la Tripanosomosis Americana (Kierszbaum *et al.* 1976).

En esta investigación se comprobó, en comunidades rurales del estado Anzoátegui, la presencia de *Ps. arthuri*

en nidos de diferentes especies de aves y su infección natural por *T. cruzi*; además de su simpatria con otros triatominos (*Rhodnius prolixus* y *Triatoma maculata*).

## METODOLOGÍA

### Área de estudio

El estado Anzoátegui presenta altitudes de hasta 2.400 metros sobre el nivel del mar; con predominio de elevaciones de 1.500 metros. Exhibe relieves planos y ondulados con pendientes suaves mayores al 30%. Destacan dos sistemas montañosos bien definidos: la Serranía del Interior y el Macizo del Turimiquire, con relieve abrupto, fuertes pendientes y alturas superiores a los 2.000 metros. Existe variedad de paisajes que se observan desde la línea costera Unare-Neverí, la costa de Puerto La Cruz, Sierra de Bergantín y las riberas del río Orinoco. La fisonomía vegetal está estrechamente asociada a las unidades fisiográficas y las condiciones climáticas. La vegetación xerófila se presenta en todo el eje costero del estado, mientras que en las sabanas dominan las gramíneas. Las riberas de los ríos y sus zonas próximas están cubiertas con bosques semidecuidos, morichales y bosques de galería. La variabilidad climática de la región se debe a factores altitudinales, continentales y marítimos. Se caracteriza por altas temperaturas durante todo el año. La temperatura media anual es de 27°C y el periodo más caluroso va de marzo a mayo; la precipitación promedio entre 700 y los 1.400 mm<sup>3</sup> y el periodo de lluvia se extiende desde mayo a octubre (Huber y Alarcón 1988).

Se estudiaron los caseríos: Bergantín, Carinagua, Los Ranchos, El Hatico, Paraminal, vía Anzoátegui-Monagas, vía Anzoátegui-Caracas y Hacienda La Veguita (municipio Bolívar), Guastrantal, San José de Las Margaritas del Llano y Las Paraulatas de Las Margaritas del Llano (municipio Aragua), Boquerón y Pequín (municipio Sotillo) y Sabana de Uchire (municipio San Juan de Capistrano) (Fig. 1).

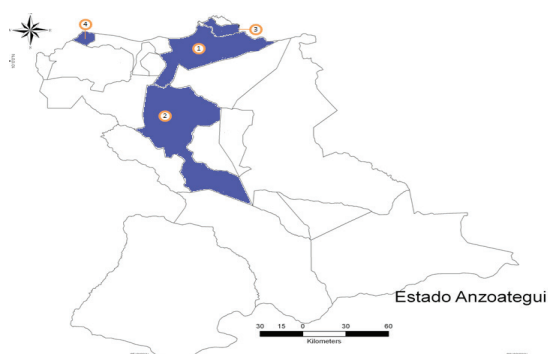


Figura 1. Área de estudio. Municipios del estado Anzoátegui donde se realizó la investigación sobre *Psammolestes arthuri*: (1) Bolívar, (2) Aragua, (3) Sotillo y (4) San Juan de Capistrano.

### Captura de los insectos e identificación

Se realizaron 39 salidas de campo durante la época de sequía, entre los meses de enero y abril de los años 2012, 2013 y 2014, donde los nidos de varias especies de aves se encontraban abandonados (Fig. 2a y 2b). Los nidos fueron derribados, sobre una lona blanca de 12 m x 6 m en el suelo, usando un plomo de pesca atado a una cuerda de nylon (Fig. 2c). Luego se procedió a la búsqueda de todos los estadios evolutivos (huevos, ninfas y adultos) de *Ps. arthuri* (Fig. 2d-f) y otros triatominos. Fueron recolectados mediante procura manual y colocados en envases de vidrio tapados con tela de tull. Los triatominos fueron trasladados al Centro de Medicina Tropical

de Oriente de la Escuela de Ciencias de la Salud del Núcleo de Anzoátegui, Universidad de Oriente, donde se identificaron taxonómicamente utilizando la clave de Lent y Wygodzinsky (1979). *Ps. arthuri* se caracteriza por presentar cabeza y tórax altamente pulidos; cabeza no estrangulada antes del cuello en el aspecto dorsal y lateral. En la cabeza presenta, en la parte dorsal, una ancha faja amarilla longitudinal ocupando todo el espacio interocular. Los pelos son largos en el ápice del segundo y en todo el tercer segmento rostral. Los ángulos antero-laterales del pronoto están dirigidos hacia adelante llegando a alcanzar el nivel de los ocelos (Lent y Wygodzinsky 1979, Soto-Vivas 2009, Soto-Vivas *et al.* 2011).

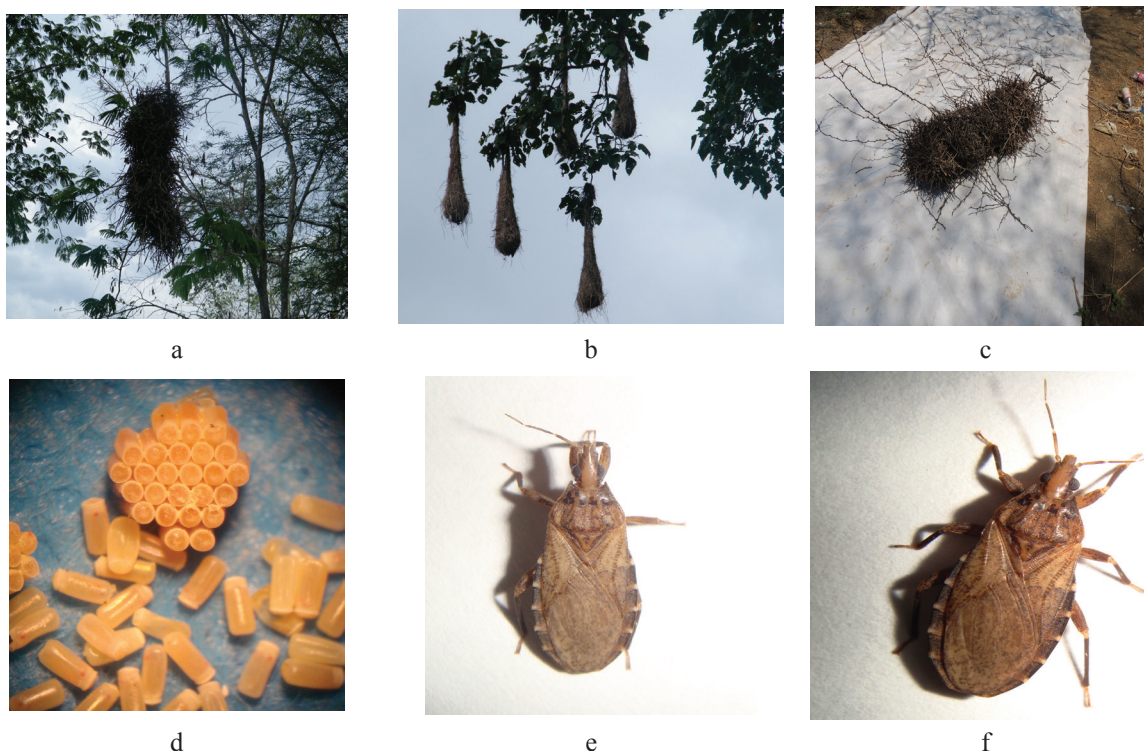


Figura 2. Nidos de aves y estadios de desarrollo de *Psammolestes arthuri*. (a) Nido de Cucarachero Marrón, (b) nidos de Conoto, (c) lona con un nido, (d) huevos de *Ps. arthuri*, (e) ninfa de *Ps. arthuri* y (f) adulto de *Ps. arthuri*.

### Estudio de los triatominos y su infección natural por *Trypanosoma cruzi*

Para la disección de los ejemplares, se empleó el protocolo de Barretto (1964) y Deane *et al.* (1984). La determinación de infección natural por *T. cruzi* en las heces se realizó a través de la disección completa del intestino del triatomino, mezclando su contenido con solución salina al 0,85% (m/v). Las muestras fueron observadas mediante examen directo al microscopio óptico con aumento de 400x. Con las muestras positivas se hicieron

frotis finos y se colorearon con Giemsa para determinar las características fenotípicas del parásito.

### Caracterización biológica de un aislado de *Trypanosoma cruzi* obtenido de *Psammolestes arthuri*

De los *Ps. arthuri* capturados que mostraron infección natural por *T. cruzi*, se tomó un aislado que se inoculó intraperitonealmente, a razón de 200 tripomastigotes metacíclicos por g de peso de ratón, en un lote de cinco ratones machos NMRI de 12 g/peso promedio, para su



caracterización biológica (periodo prepatente, curva de parasitemia, mortalidad de los ratones y tropismo tisular) según Jansen *et al.* (1997). Los ratones fueron examinados tres veces por semana a partir del tercer día de inoculación hasta finalizar el experimento con la muerte de los animales. Se examinaron frotis delgados teñidos con Giemsa al microscopio (1.000x) para identificar los parásitos sanguíneos, con base en los criterios de Hoare (1972) y Albuquerque y Barretto (1971).

### Periodo pre-patente

Esta fase se inició en los ratones hasta detectar la presencia de flagelados en sangre. Se determinó mediante el examen microscópico (400x) en fresco de muestras de sangre periféricas tomada de la vena de la cola de los animales infectados

### Nivel de parasitemia

La cuantificación de los niveles de parasitemia se llevó a cabo cada tres días a partir del inicio del periodo patente para obtener el número promedio de tripomastigotas/mL de sangre (Brenner 1962). La cuantificación se realizó hasta la muerte de los animales.

### Mortalidad

La mortalidad provocada por el aislado, en los animales experimentales, fue registrada diariamente.

### Tropismo

El parasitismo intracelular y el tropismo tisular causado en los animales de experimentación se determinó durante el periodo de parasitemia elevada. Para ello, un ratón del aislado de *Ps. arthuri* fue sacrificado mediante dislocación cervical, con el fin de extraer muestras de corazón, músculo esquelético, duodeno, colon, vejiga, páncreas, pulmón, hígado, bazo, tejido adiposo, médula ósea, cerebro, cerebelo, cartílago, hueso, glándula suprarrenal y globo ocular. Las muestras fueron fijadas inmediatamente en formol neutro amortiguado al 10% (v/v), embebidas en parafina, cortadas seriadamente (3  $\mu$  de espesor) y teñidas con hematoxilina-eosina.

Los cortes histológicos, de cada órgano, fueron examinados al microscopio (1.000x) para determinar la presencia de amastigotas y formas flageladas, aislados o formando pseudoquistes (nidos). Los parásitos encontrados en los frotis realizados con heces de triatomíneos naturalmente infectados y con sangre de

los ratones experimentales, así como en las secciones de las vísceras fueron fotografiados con cámara Nikon COOLPIX P510 de 16,1MP.

### Tipificación molecular del aislado de *Trypanosoma cruzi* obtenido de *Psammolestes arthuri*

El aislado de *Ps. arthuri* fue tipificado molecularmente utilizando la técnica RAPD según la metodología descrita por Carrasco *et al.* (2012). Los parásitos fueron crecidos en medio RPMI suplementado (Carrasco *et al.* 1996) y se recolectaron  $2 \times 10^7$  formas epimastigotas en fase exponencial de crecimiento mediante centrifugación a 3.000 g, por 6 minutos a 4°C. Luego se procedió a la extracción y purificación del ADN utilizando el estuche comercial Nucleon BACC 2, de Amersham, siguiendo las instrucciones del fabricante. Se determinó la concentración y pureza del ADN mediante determinación de la absorbancia a 260 y 280 nm, considerando como óptima una relación  $260/280 \geq 1,8 \pm 0,2$ ; y 1 unidad de densidad óptica a 260 = 50  $\mu$ g de ADN/mL. El ADN del aislado de *T. cruzi* fue analizado con la técnica RAPD. Para ello se utilizaron 5 ng de ADN del parásito en una mezcla de reacción contenitiva de los diferentes componentes para una reacción de PCR utilizando el cebador A2, en un volumen final de 20  $\mu$ L, siguiendo las condiciones descritas por Carrasco *et al.* (1996). El producto de amplificación fue analizado mediante electroforesis en agarosa al 2,5%, teñido con bromuro de etidio, visualizado en un transiluminador UV y fotografiado con un sistema de fotodocumentación Kodak D120. Los perfiles de bandas obtenidos con el aislado de *T. cruzi* de *Ps. arthuri* fueron comparados con los perfiles de bandas generados por cepas de *T. cruzi* de referencia internacional representativas de los genotipos I, III y IV.

## RESULTADOS

### Presencia de *Psammolestes arthuri* y otras especies de triatomíneos en nidos de aves

Se examinaron 478 nidos de seis especies de aves: Cucarachero Marrón (*Phacellodomus rufifrons*), Cucarachero Jabado (*Troglodytes aedon*), Gonzalito (*Icterus nigrogularis*), Turpial (*Icterus icterus*), Arrendajo (*Cacicus cela*) y Conoto (*Psarocolius decumanus*) en los cuales se capturaron 3.277 triatomíneos en diferentes estadios evolutivos (se excluyeron los huevos). El mayor porcentaje de nidos con presencia de *Ps. arthuri* fue el de *P. rufiformis* (Cucarachero Marrón) con 24,47% (117/478) y en segundo término el de *T. aedon* (Cucarachero Jabado) con 18,41% (88/478) (Tabla 1).

El porcentaje total de *Ps. arthuri* infectados naturalmente con *T. cruzi* fue de 0,12% (4/3.246). Solo el estadio de adultos de *Ps. arthuri* demostró infección natural (4/824; 0,49%). Los triatominos infectados se encontraron solo en los nidos de *P. rufifrons* y de *I. nigrogularis* (Tabla 1).

En 2,09% (10/478) de los nidos examinados se encontró *Ps. arthuri* en simpatria con *T. maculata* y *R. prolixus*. La mayor frecuencia se observó en los nidos de *P. rufifrons* (4/117) y en segunda instancia en los de *I. nigrogularis* (2/66). Se encontró infección natural por *T. cruzi* en 78,94% (15/19) de los ejemplares de *R. prolixus*

y 66,67% (8/12) de *T. maculata* (Tabla 1).

La mayor cantidad de triatominos de la especie *Ps. arthuri* se capturó en Bergantín (348/3.246) y en San José de Las Margaritas del Llano (346/3.246). De las comunidades estudiadas, la simpatria se encontró en 71,42% (10/14) de las comunidades evaluadas (Bergantín, El Hatico, Carinagua, Paraminal, vía Anzoátegui-Monagas, vía Anzoátegui-Caracas, San José de Las Margaritas del Llano, Boquerón, Pequín y Sabana de Uchire). Los cuatro *Ps. arthuri* infectados naturalmente por *T. cruzi* fueron recolectados en Bergantín, El Hatico, Paraminal y Sabana de Uchire (Tabla 2).

Tabla 1. Nidos de aves con triatominos sanos e infectados con *Trypanosoma cruzi*. Simpatria de *Psammolestes arthuri* con otros triatominos en comunidades rurales de la zona norte del estado Anzoátegui.

Especies de aves	N° Nidos	<i>Psammolestes arthuri</i>			Nidos con <i>Ps. arthuri</i> en simpatria con otros triatominos					Total triatominos
		Ninfas	Adultos		Total	N†	N‡ [R.p/T.m]	Infectados con <i>T. cruzi</i>		
			Sanos	Infectados con <i>T. cruzi</i>				R.p	T.m	
Cucarachero Marrón ( <i>Phacellodomus rufifrons</i> )	117	1.052	325	3	1.380	4	8 [5/3]	4	2	1.388
Cucarachero Jabado ( <i>Troglodytes aedon</i> )	88	460	157	0	617	1	3 [1/2]	1	1	620
Turpial ( <i>Icterus icterus</i> )	77	236	92	0	328	1	4 [3/1]	3	1	332
Conoto ( <i>Psarocolius decumanus</i> )	76	198	92	0	290	1	3 [1/2]	1	1	293
Gonzalito ( <i>Icterus nigrogularis</i> )	66	244	93	1	337	2	8 [6/2]	4	1	345
Arrendajo ( <i>Cacicus cela</i> )	54	232	62	0	294	1	5 [3/2]	2	2	299
Total	478	2.422	824	4	3.246	10	31 [19/12]	15	8	3.277

N† Número de nidos con *Psammolestes arthuri* en simpatria con *Rhodnius prolixus* y *Triatoma maculata*

N‡ Número de ejemplares de otros triatominos en simpatria con *Psammolestes arthuri*

R.p: Número de ejemplares de *Rhodnius prolixus*

T.m: Número de ejemplares de *Triatoma maculata*

Tabla 2. Comunidades de los municipios del estado Anzoátegui donde se capturó la especie *Psammolestes arthuri* en nidos de aves.

Municipios	Comunidades	<i>Psammolestes arthuri</i>		
		Total	Adultos	Infectados con <i>T. cruzi</i>
Bolívar	Bergantín	348	92	1
	Carinagua	263	57	0
	Los Ranchos	248	63	0
	El Hatico	245	73	1
	Paraminal	243	56	1
	Vía Anzoátegui-Monagas	237	57	0
	Vía Anzoátegui-Caracas	188	43	0
	Hacienda La Veguita	125	36	0
Aragua	San José de Las Margaritas del Llano	346	97	0
	Guastrantal	278	76	0
	Las Paraulatas de Las Margaritas del Llano	235	49	0
Sotillo	Boquerón	155	39	0
	Pequín	140	41	0
San Juan de Capistrano	Sabana de Uchire	195	45	1
Total		3.246	824	4

**Comportamiento biológico del aislado de *Trypanosoma cruzi* obtenido de *Psammolestes arthuri***

La cinética de infección en modelo murino con un aislado de *T. cruzi* de *Ps. arthuri*, reveló un periodo prepatente de 9 días, con parasitemia de  $2,4 \times 10^4$  y 100% de mortalidad de un lote de cinco ratones de la

cepa NMRI (Fig. 3).

Se observó tropismo tisular en 71,43% (10/14) de los tejidos estudiados en el ratón que cursó con máxima parasitemia. Los tejidos más intensamente invadidos fueron muscular cardiaco, muscular esquelético y páncreas; en segunda instancia glándula suprarrenal (Tabla 3 y Fig. 4).

Parasitemia	
Días post-infección	Tripomastigotas x $10^4$ mL de sangre
6	-
9	0,2
12	0,6
15	1
18	1,4
21	1,8
24	2,2
27	2,4
-	-

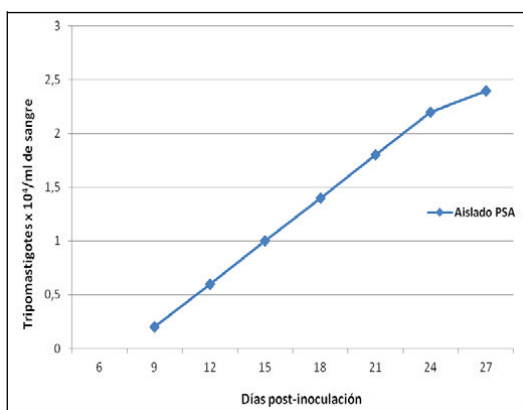


Figura 3. Cinética de infección de aislado de *Trypanosoma cruzi* obtenido de un ejemplar de *Psammolestes arthuri*. (a) Días post-infección y tripomastigotas sanguíneas encontrados por cada  $10^4$  mL de sangre de ratones blancos cepa NMRI experimentalmente infectados con un aislado de *Psammolestes arthuri*. (b) Curva de parasitemia.

Tabla 3. Tropismo tisular en un ratón NMRI infectado experimentalmente con un aislado de *Trypanosoma cruzi* obtenido de *Psammolestes arthuri* del estado Anzoátegui, Venezuela.

Tejido	Intensidad de la invasión
Músculo cardiaco	+++
Músculo esquelético	+++
Páncreas	+++
Glándula suprarrenal	++
Globo ocular (esclerótica)	+
Hígado	+
Pulmón	+
SNC	+
Vejiga	+
Intestino grueso	+
Intestino delgado	-
Riñón	-
Testículo	-
Bazo	-
Lengua	-

Abundancia de nidos por campo según Watkins (1966): +++ = muy abundante; ++ = abundante; + = escaso, - = ausente.

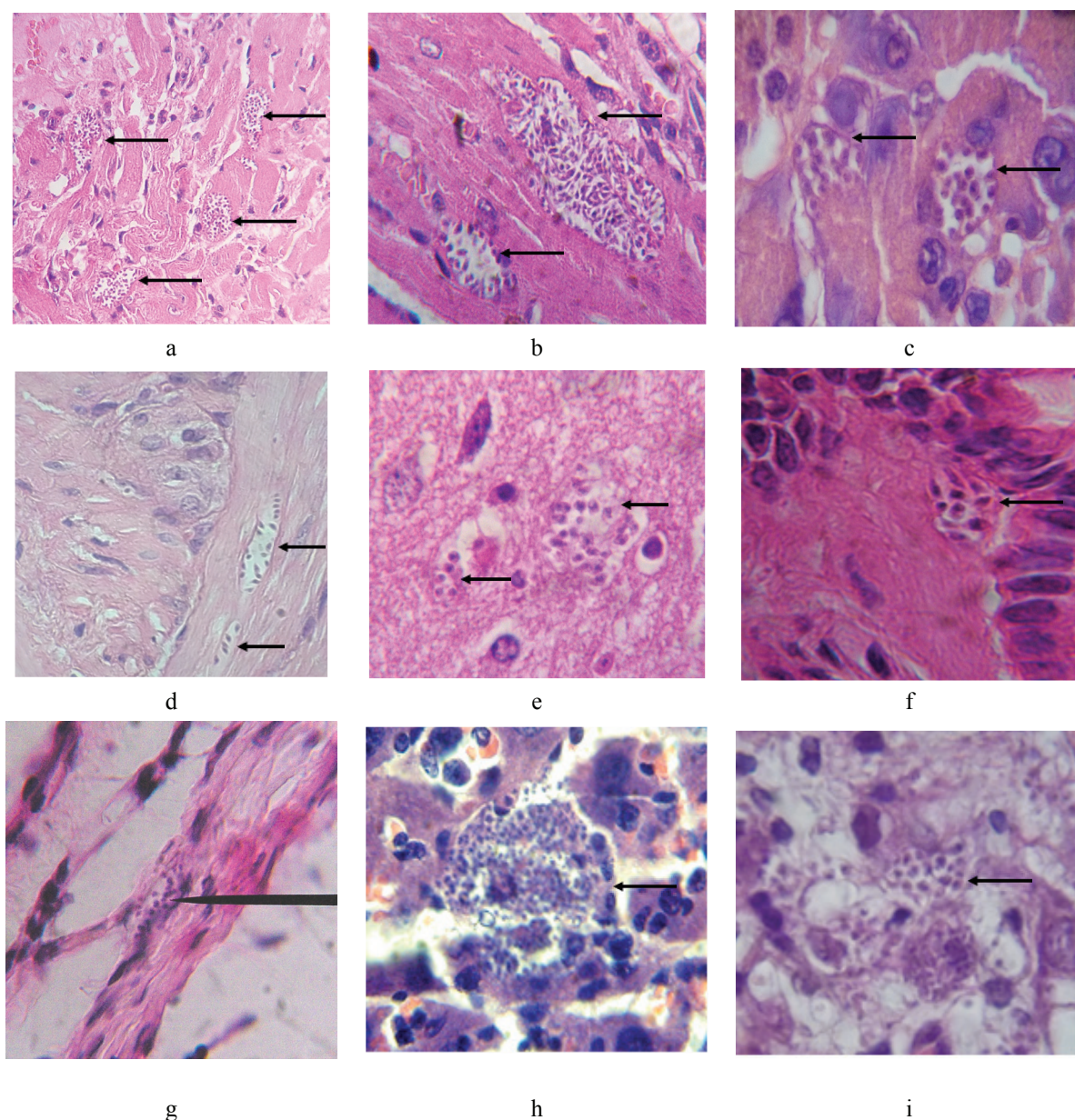


Figura 4. Microfotografías de secciones histológicas de un ratón NMRI infectado experimentalmente con un aislado de *Trypanosoma cruzi* obtenido de *Psammolestes arthuri*, teñidas con hematoxilina-eosina. (a) Nidos dispersos en tejidos muscular cardiaco (400x), (b) nidos de tejido muscular esquelético (1.000x), (c) nido en tejido pancreático (1.000x), (d) tejido muscular liso de intestino delgado (400x), (e) nido de sistema nervioso central (1000x), (f) tejido muscular liso en pulmón (1000x), (g) nido en globo ocular (esclerótica) (1.000x), (h) nido en tejido hepático (400x) e (i) nido en glándula suprarrenal (1.000x). Las flechas indican la presencia de los nidos.

#### Genotipo del aislado de *Trypanosoma cruzi* obtenido de *Psammolestes arthuri*

El aislado de *T. cruzi* obtenido de *Ps. arthuri*, en el ratón con máxima parasitemia, generó un perfil de bandas característico del genotipo (o DTU) TcIII. Tal como se puede apreciar en la Figura 5, al comparar el patrón de bandas generado por este aislado (carril 1), con el perfil

de bandas obtenido con las cepa de referencia para TcIII (carril 2), el cual es procedente de un cachicamo o armadillo (*Dasypus novemcinctus*), se puede apreciar un perfil de bandas muy similar entre ambas muestras. También se puede visualizar la presencia de bandas marcadoras distintivas del genotipo TcIII de aproximadamente 0,68; 1,3 y 1,9 kb (indicadas con flechas). De igual manera, en la Figura 5 se puede observar que el perfil de bandas



generado tanto por el aislado de *Ps. arthuri* como por la cepa de referencia para TcIII, es diferente al generado por las cepas de referencia para TcIV y TcI (carriles 3 y 4 respectivamente). Es importante destacar que el perfil de bandas generado por el aislado de *T. cruzi* obtenido *Ps. arthuri* con el cebador A2, fue reproducible a partir de dos aislamientos de ADN del mismo cultivo, así como en diferentes reacciones de RAPD con este cebador. Así mismo hay que resaltar que el genotipo TcIII del aislado de *Ps. arthuri* fue confirmado mediante la técnica PCR-RFLP según la metodología descrita por Carrasco *et al.* (2012) (resultados no mostrados).

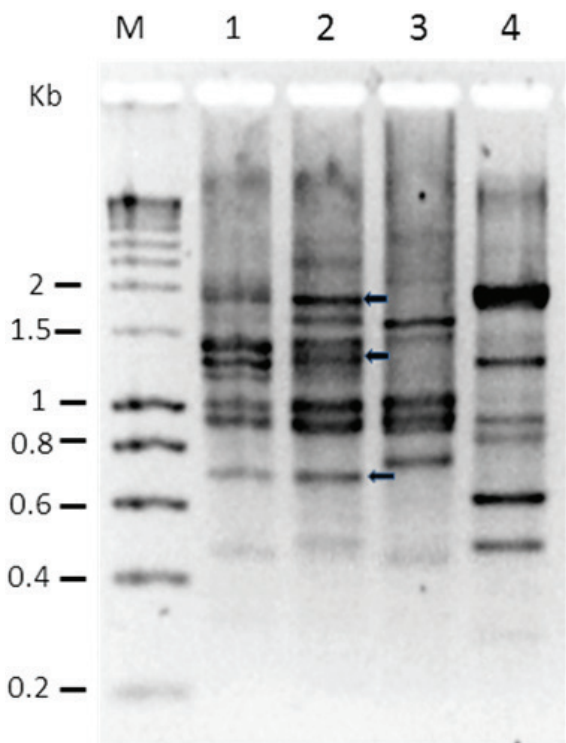


Figura 5. Perfil de RAPD generado con el cebador A2 para el aislado de *Trypanosoma cruzi* obtenido de *Psammolestes arthuri*. M = Hiperladder I; 1 = *T. cruzi* de *Ps. arthuri*; 2 = cepa de referencia para TcIII (Parama 6); 3 = cepa de referencia TcIV (XPMPRM10); 4 = cepa de referencia TcI (WA250 CL10B).

## DISCUSIÓN

Datos recientes indicaron que el estado Anzoátegui cuenta con todos los eslabones de la cadena epidemiológica de la enfermedad de Chagas, donde el 70% de los vectores presentan infección natural por *T. cruzi* (Morocoima *et al.* 2010), así como la presencia de mamíferos, tanto salvajes como domésticos, considerados reservorios del parásito (Herrera 2010). Factores bioecológicos y político-sociales así como la acción antrópica vienen incluyendo al hombre en este ciclo, facilitando así el desarrollo del llamado ciclo doméstico de este parásito, en el cual, el humano, así como

varias especies de animales domésticos, se comportan como reservorios (Feliciangeli *et al.* 2004).

En el continente americano existen 140 especies de vectores, 22 de las cuales se encuentran en Venezuela (Otero *et al.* 1975, Feliciangeli *et al.* 2004). En el estado Anzoátegui se han identificado nueve especies de triatominos: *R. prolixus*, *Rhodnius pictipes*, *T. maculata*, *Triatoma rubrofasciata*, *Panstrongylus geniculatus*, *P. rufotuberculatus*, *Eratyrus cuspidatus*, *E. mucronatus* y *Ps. arthuri* (Carcavallo *et al.* 1999, Morocoima 2002, Morocoima *et al.* 2010).

La especie *Ps. arthuri* (sinónimo de *Ps. salazari*) sólo ha sido encontrada en Venezuela (Cova-García y Suárez 1959, Lent y Jurberg 1965) y en Colombia (Galvão *et al.* 2003). Ramírez-Pérez (1987) reporta su distribución geográfica en Venezuela en los estados Anzoátegui, Aragua, Carabobo, Cojedes, Guárico, Miranda, Portuguesa y Yaracuy. Cova-García y Suarez (1959) incluyeron al estado Mérida. Otero *et al.* (1975) agregan Lara, Táchira y Apure. Carcavallo *et al.* (1975) lo encuentran en Barinas y Monagas. Los hábitats en que esta especie fue reportada incluyen nidos de aves, especialmente de *Phascellodomus rufifrons inornatus* y también *Troglodytes aedon albicans* y *Troglodytes musculus ave*. En esta investigación además de los nidos de las especies de aves anteriormente mencionadas fue hallada infestación por *Ps. arthuri* en nidos de *Icterus icterus*, *Psarocolius decumanus*, *Cacicus cela* e *Icterus nigrogularis*.

Carcavallo *et al.* (1975) describieron los estadios ninfales y el huevo de *Ps. arthuri*, informando 533 especímenes en 25 nidos con un promedio de 21,3 ejemplares por hábitat. De los nidos disecados por los autores, el 67,6% presentó infestación para esta especie, pero con ausencia de infección natural por *T. cruzi*. Morocoima (2002) en caseríos rurales de la parroquia El Carmen, municipio Bolívar de la zona norte del estado Anzoátegui, reportó 66 ejemplares de *Ps. arthuri* recolectados en dos nidos de *Phascellodomus rufifrons inornatus* sin infección natural por *T. cruzi*. En contraste, en esta investigación, 0,84% (4/478) de los nidos presentaron ejemplares de *Ps. arthuri* naturalmente infectados con *T. cruzi*. Al respecto, otros autores como Pifano (1938, 1339) y Sherlock *et al.* (1997) informaron sobre *Ps. arthuri* infectados naturalmente por *T. cruzi*; lo que les indicó que se alimentaban de mamíferos u otros vertebrados. Los datos obtenidos en este trabajo mostraron, que del total de 3.246 ejemplares de *Ps. arthuri* examinados, que sólo cuatro triatominos (0,12%)



estaban infectados naturalmente por *T. cruzi*; por lo cual este porcentaje posiblemente se debe a que los nidos representan un ecosistema donde cohabitan muchos artrópodos depredadores y vertebrados que pueden ejercer control sobre los triatomíneos. En muchos nidos no se localizó la presencia de huevos, ni de ninfas de 1, 2 o 3er estadio; solamente ninfas de 4 y 5 estadio y adultos, los cuales probablemente tengan mayor capacidad para desplazarse y defenderse de posibles depredadores como los escorpiones (Morocoima *et al.* 2011). Similarmente no se observaron los huevos de *Ps. arthuri* parasitados por otros artrópodos (Felicciangeli *et al.* 1978).

Existen aves como el Turpial (*Icterus icterus*), que ocupan los nidos del Cucarachero Marrón (*Phacellodomus rufifrons*). Alguna de estas aves, pueden transportar debajo de sus alas a los triatomíneos, entre ellos *Ps. arthuri* infectados con *T. cruzi*. Así mismo, en muchas especies de árboles se encontraron nidos de aves con presencia en su interior de ratas, ratones, ardillas, entre otros vertebrados. Algunos nidos se encontraban en árboles cuya base era hueca con la presencia del Oso Melero (*Tamandua tetradactyla*); otros ubicados en las cercanías de madrigueras donde habitaban Armadillo (*Dasypus novencinctus*), Lapa (*Cuniculus paca*) u Oso Melero; por lo tanto no se descarta que estos mamíferos pudieran jugar un rol como fuente de alimento para algunos de los *Ps. arthuri* encontrados en este trabajo. Con relación a los otros triatomíneos localizados en simpatria con *Ps. arthuri*, todos eran adultos en su mayoría infectados por *T. cruzi*; cuya fuente de infección estaría asociada a la presencia de roedores infectados en los nidos, y/o a los otros mamíferos ya mencionados que pudieron actuar como fuente alternativa de sangre para el mantenimiento de los triatomíneos que cohabitan en un mismo nido de ave. Barreto *et al.* (1984) en El Porvenir, localidad de los Llanos Orientales de Colombia encontró en nidos de *Phacellodomus rufifrons*, huevos, ninfas y adultos de ambos sexos de *Ps. arthuri*.

Rosa *et al.* (1997), en el departamento de Artigas-Uruguay, estudiaron 45 nidos de aves de la especie *Anumbius annumbis annumbis* (Pájaro Espinero). Del total de nidos examinados, ocho fueron positivos para la presencia de *Triatoma platensis* (en ausencia de otros triatomíneos como *Triatoma sordida*, *Ps. coreodes* que comparten distribución geográfica y ecotopo). Ninguno de los ejemplares recolectados presentó infección natural por *T. cruzi*. Los datos de ese estudio contrastan con los resultados de esta investigación, ya que de los 478 nidos, correspondientes a seis especies de aves (*Phacellodomus rufifrons*, *Troglodytes aedon*, *Icterus icterus*, *Icterus*

*nigrogularis*, *Cacicus cela* y *Psarocolius decumanus*), algunos ejemplares de *Ps. arthuri* fueron positivos a *T. cruzi* y se halló cohabitando en simpatria con *T. maculata* y *R. prolixus*.

Damborski *et al.* (2001) en cuatro departamentos de Argentina, recolectaron 571 triatomíneos de las especies *T. platensis* (60,5%) y *Ps. coreodes* (39,5%, sin infección natural por *T. cruzi*) en ecotopos silvestres. Almeida *et al.* (2009), en Brasil, capturaron 26 ejemplares de *Ps. tertius* en nidos de *Phacellodomus ruber* en el municipio de Porto Rico y *Ps. coreodes* en hábitats silvestres asociados a nidos de *Phacellodomus rufifrons*, *Phacellodomus sibilatrix*, *Psedoseisura lophotes*, *Myopsytta monacha* todos sin infección natural por *T. cruzi*. Además los mismos investigadores indicaron que *Ps. arthuri* solamente se encuentra distribuido en el territorio venezolano. Mientras Cabrera (2006), en Brasil, señaló a la palmera de la especie *Mauritia flexuosa* como ecotopo de importancia para el hábitat de *Ps. tertius*, encontrando este triatomíneo infectado naturalmente por *T. cruzi*. En el presente trabajo *Ps. arthuri* (perteneciente al mismo género de *Ps. coreodes* y *Ps. tertius*) se localizó con alta frecuencia (99,1%) en los nidos de aves construidos en árboles ubicados en el peridomicilio y en áreas selváticas aledañas a las comunidades estudiadas.

Uno de los cuatro aislados de *T. cruzi*, obtenidos de *Ps. arthuri*, fue seleccionado para el estudio de su comportamiento biológico. Para ello, se utilizó el que mostró máxima parasitemia en el modelo murino de la cepa NMRI. Este aislado reveló marcada tendencia a ubicarse preferencialmente en microhábitats tisulares de miocitos de musculatura cardíaca, estriada y lisa además de otros tejidos como sistema nervioso central, tejido glandular pancreático y la esclerótica que es una de la capas que conforman el globo ocular, reportada su invasión por *T. cruzi* por primera vez en Venezuela. En el país existen escasas investigaciones sobre los últimos tejidos mencionados. La invasión provocada por el aislado obtenido de *Ps. arthuri* se puede considerar que fue severa, ya que de los 14 tejidos analizados, 10 demostraron la presencia de nidos con diferentes fases del parásito.

Morocoima *et al.* (2008), obtuvieron un aislado de *T. cruzi* de un paciente preescolar de 6 años en el estado Anzoátegui. Este aislado fue estudiado en un modelo murino, encontrando la presencia de nidos de *T. cruzi* en 11 tejidos examinados incluyendo al tejido renal y con mortalidad del 100% del lote de ratones experimentales. Los aislados del estado Anzoátegui según otros estudios

son de alta patogenicidad, ya que son capaces de provocar paninfectividad en la fase aguda de ratones experimentales.

El estudio de histotropismo en modelo murino ayuda a entender la patogenia de la enfermedad de Chagas (Morocoima *et al.* 2006). Los hallazgos histotrópicos aquí presentados para el aislado de *T. cruzi* obtenido de *Ps. arthuri* es similar a trabajos previamente publicados (Camargos *et al.* 2000, Morocoima *et al.* 2008), en donde se demostró que los aislados evaluados eran esencialmente cardiotrópicos.

El aislado de *T. cruzi* obtenido de un ejemplar adulto de *Ps. arthuri* resultó perteneciente al genotipo TcIII. Este genotipo es el tercero reportado en Venezuela, el cual hasta la fecha no ha sido confirmado en pacientes venezolanos con enfermedad de Chagas. Este genotipo solo ha sido encontrado en Cachicamos y en *Panstrongylus geniculatus* (Carrasco *et al.* 2012). El genotipo TcIII no había sido encontrado en triatominos del estado Anzoátegui; siendo esta la primera vez que se obtiene de *Ps. arthuri*. Estudios previos han mostrado que los especímenes adultos de *R. prolixus* y *T. maculata* hallados en simpatria con *Ps. arthuri* en nidos de aves, se encontraban infectados con *T. cruzi* perteneciente al genotipo TcI. Nuestros resultados muestran que *Ps. arthuri* aparentemente presenta una preferencia de fuente de alimentación distinta a la de *R. prolixus* y *T. maculata*, siendo la especie de mamífero involucrada, posiblemente de hábitat terrestre. *Ps. arthuri* pudiera ingresar a las madrigueras de cachicamos en busca de alimento donde esta especie de mamífero está asociada con el ciclo natural de transmisión de TcIII (Carrasco *et al.* 2012, 2013).

Aun cuando se encontró un porcentaje muy bajo de *Ps. arthuri* naturalmente infectados con *T. cruzi*, este hecho demuestra que esta especie, además de su preferencia por aves, también puede alimentarse de sangre de mamíferos infectados, lo cual no escapa de ser un riesgo para los pobladores de diferentes comunidades estudiadas, por la existencia de nidos de aves en árboles aledaños a sus viviendas. Esto tiene particular relevancia cuando las aves abandonan los nidos obligando a los triatominos a desplazarse en busca de nuevas fuentes de alimento contribuyendo con el mantenimiento de la zoonosis de la enfermedad de Chagas.

#### DEDICATORIA

Dedicado al Profesor Servio Urdaneta-Morales por sus aportes a la parasitología y epidemiología del

*Trypanosoma cruzi* y de la Tripanosomosis Americana (Enfermedad de Chagas).

#### AGRADECIMIENTO

Los estudios moleculares fueron financiados a través del proyecto PEI-2012001250.

#### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABAD-FRANCH F, MONTEIRO F. 2007. Biogeography and evolution of Amazonian triatomines (Heteroptera: Reduviidae): implications for Chagas disease surveillance in humid forest ecoregions. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 102(Suppl 1):57-70.
- ABAD-FRANCH F, MONTEIRO F, JARAMILLO N, GURGEL-GONÇALVES R, DIAS F, DIOTAIUTI L. 2009. Ecology, evolution, and the long-term surveillance of vector-borne Chagas disease: a multi-scale appraisal of the tribe Rhodniini (Triatominae). Acta Trop. 110(2-3):159-177.
- ALBUQUERQUE R, BARRETTO M. 1971. Estudo sobre reservatórios e vetores silvestres do *Trypanosoma cruzi*. XLVIII. Infecção natural do marsupial *Philander opossum* quica pelo *Tripanosoma cruzi*. Rev. Bras. Biol. 31(3):371-376.
- ACHÉ A. 1993. Programa de control de la enfermedad de Chagas en Venezuela. Bol. Dir. Malariol. San. Amb. 33:11-17.
- ALDANA E, LIZANO E, RAMON, F, VALDERRAMA A. 1996. Nueva especie de *Psammolestes bergroth* de la región Sur Occidental de Venezuela (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). Caribbean J. Sci. 32(2):145-149.
- ALMEIDA P, GONÇALVES S, AMARAL G, DONIZETHE L, GENRO R, MEDINA C, TAKASHI W, SOARES J. 2009. Ocorrência de *Psammolestes coreodes* Bergroth, 1911 (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) no Estado de Mato Grosso do Sul. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 42(5):603-604.
- BARRETTO M. 1964. Reservorio do *Trypanosoma cruzi* nas Américas. Rev. Brasil. Malariol. D. Trop. 16:27
- BARRETTO M. 1979. Epidemiologia. En: *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas. BRENER Z, ANDRADE Z. (Eds.). Guanabara, Brasil, pp. 89-151.

- BARRETO M, BARRETO P, D'ALESSANDRO A. 1984. *Psammolestes arthuri* (Hemiptera: Reduviidae) and its parasite *Telenomus capito* (Hymenoptera: Scelionidae) in Colombia. J. Med. Entomol. 21(6):703-705.
- BRENER Z. 1962. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo. 4(6):389-396.
- CABRERA R. 2006. Notas breves sobre *Psammolestes tertius*, Bergroth, 1911 (Reduviidae: Hemiptera): un triatomino silvestre. An. Fac. Med. 67(4):345-346.
- CAMARGOS E, FRANCO D, GARCIA C, DUTRA A, TEIXEIRA A, CHIARI E, MACHADO C. 2000. Infection with different *Trypanosoma cruzi* populations in rats: myocarditis, cardiac sympathetic denervation, and involvement of digestive organs. Am. J. Trop. Med. Hyg. 62(5):604-612.
- CARCAVALLO R, OTERO R, ORTEGA R, TONN R. 1975. Notas sobre la biología, ecología e distribución geográfica de *Psammolestes arthuri* (Pinto, 1926) (Hemiptera, Reduviidae). Descripción de los estadios preimaginales. Bol. Dir. Malariol. San. Amb. 15(5):231-239.
- CARCAVALLO R, CURTO DE CASAS S, SHERLOCK I, GALÍNDEZ-GIRÓN I, JURBERG J, GALVAO C, MENA-SEGURA C, NOIREAU F. 1999. Geographic distribution and altitudinal dispersion. In: CARCAVALLO RU, GALINDEZ GIRON J, JUBERG J, LENT H. (Eds). Atlas of Chagas Disease Vectors in the Americas, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brasil, Vol. III, pp. 747-792
- CARRASCO H., FRAME IA, VALENTE SA, MILES M. 1996. Genetic exchange as possible source of genomic diversity in sylvatic populations of *Trypanosoma cruzi*. Am. J. Trop. Med. Hyg. 54(4):418-424.
- CARRASCO HJ, SEGOVIA M, LLEWELLYN M, MOROCOIMA A, URDANETA-MORALES S, MARTÍNEZ, C, MARTÍNEZ E, GARCIA C, RODRÍGUEZ M, ESPINOSA R, DE NOYA B, DÍAZ-BELLO Z, HERRERA L, YEO S, MILES M, FELICIANGELI M. 2012. Geographical Distribution of *Trypanosoma cruzi* Genotypes in Venezuela. PLoS Negl. Trop. Dis. 6(6): e1707. doi:10.1371/journal.pntd.0001707
- CARRASCO HJ, NESSI AJ, LONDONO JC, RODRIGUEZ AE, MOLEIRO F, MENDOZA I. 2013. Molecular epidemiology of Chagas disease in Venezuela. SOJ Microbiol. Infect. Dis. 1(1):6. dx.doi.org/10.15226/sojmid.2013.00101.
- COSTA J, FREITAS-SIBAJEV M, MARCHON-SILVA V, QUINHONES M, PACHECO, R. 1997. Isoenzymes detect variation in populations of *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 92(4):459-464.
- COVA-GARCÍA P, SUÁREZ M. 1959. Estudio de los triatominos en Venezuela. Publicación Nº11 División de Malariología, Tipografía Vargas, Caracas, Venezuela, pp. 207.
- CAZORLA D. 2007. Triatominae de Venezuela: distribución geográfica, aspectos taxonómicos, biológicos e importancia médica. Disponible en línea en: www.tauniversity.org/tesis/Tesis\_Dalmiro\_Cazorla\_2.doc (Acceso: 04.03.2014).
- DAMBORSKI M, BAR M, OSCHEROV E. 2001. Detección de triatominos (Hemiptera: Reduviidae) en ambientes domésticos y extradomésticos. Corrientes, Argentina. Cad. Saúde Pública. 17(4):843-849.
- DEANE M, JANSEN A, MANGIA R, GONCALVEZ A, MOREL C. 1984. Are our laboratory "strains" representative samples of *Trypanosoma cruzi* populations that circulate in nature? Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 79(Suppl):19-24.
- DOS SANTOS S, LOPES C, DUJARDIN J. 2007. Evolutionary relationships based on genetic and phenetic characters between *Triatoma maculata*, *Triatoma pseudomaculata* and morphologically related species (Reduviidae: Triatominae). Infect. Genet. Evol. 7(4):469-475.
- FELICIANGELI M, FERNÁNDEZ E, TONN R. 1978. A microhymenopteran parasite of eggs of *Psammolestes arthuri* (Hemiptera: Reduviidae) and observations of experimental parasitism of eggs of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae). J. Med. Entomol. 14(5):593-594.
- FELICIANGELI M, CARRASCO H, PATTERSON J, SUAREZ B, MARTÍNEZ C, MEDINA M. 2004. Mixed domestic infestation by *Rhodnius prolixus* Stal, 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):501-505.
- GALVÃO C, CARCAVALLO R, ROCHA, JURBERG J. 2003. A checklist of the current valid species of the subfamily Triatominae Jeannel, 1919 (Hemiptera, Reduviidae) and their geographical distribution, with nomenclatural and taxonomic notes. *Zootaxa.* 202:1-36.
- GURGEL-GONÇALVES R, BANDEIRA R. 2009. Analysis of the geographical distribution of *Psammolestes Bergroth* (Hemiptera: Heteroptera: Reduviidae: Triatominae) in South America, with new records of *Psammolestes tertius* Lent & Jurberg. *Zootaxa.* 2033:41-48.
- HERRERA L. 2010. Una revisión sobre reservorios de *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* (Chagas, 1909), agente etiológico de la Enfermedad de Chagas. *Bol. Mal. Salud Amb.* 50(1):3-15.
- HOARE C. 1972. The trypanosomes of mammals, a zoological monograph. Blackwell Scientific Publications, Oxford, UK, pp. 749.
- HUBER O, ALARCÓN C. 1988. Mapa de vegetación de Venezuela. Caracas: MARNR (Ministerio del Ambiente y de los Recursos Naturales Renovables). Dirección de Cartografía Nacional. Escala 1:2.000.000, 95x70,5 cm.
- JANSEN A, MADEIRA F, CARREIRA J, MEDINA E, DEANE M. 1997. *Trypanosoma cruzi* in the opossum *Didelphys marsupialis*: a study of the correlations and kinetics of the systemic and scent gland infection in naturally and experimentally infected animals. *Exp. Parasitol.* 86(1):37-44.
- KIERSZEMBAUM F, IVANYI J, BUDZCO D. 1976. Mechanisms of natural resistance to trypanosomal infection. Role of complement in avian resistance to *T. cruzi* infection. *Immunology.* 30(1):1-6.
- LENT H, JURBERG J. 1965. O gênero *Psammolestes* Bergroth, 1911, com um estudo sobre a genitália das espécies (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Rev. Bras. Biol.* 25:349-376.
- LENT H, WYGODZINSKY P. 1979. Revision of the triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vector of Chagas disease. *Bull. Am. Mus. Nat. Hist.* 163:123-520.
- MOROICOIMA A. 2002. Caracterización parasitológica y molecular de aislados de *Trypanosoma cruzi* obtenidos del estado Anzoátegui. Caracas: Universidad Central de Venezuela, Facultad de Medicina, Instituto de Medicina Tropical [Disertación Maestría en Parasitología], pp. 109.
- MOROICOIMA A, RODRÍGUEZ M, HERRERA L, URDANETA-MORALES S. 2006. *Trypanosoma cruzi*: Experimental parasitism of bone and cartilage. *Parasitol. Res.* 99(6):663-668.
- MOROICOIMA A, TINEO E, HERRERA L, FERRER E Y NUÑEZ M. 2008. Enfermedad de Chagas en el estado Anzoátegui, Venezuela: Registro de un caso agudo y caracterización parasitológica y molecular del aislado. *Bol. Malariol. Sal. Amb.* 48(2):121-126.
- MOROICOIMA A, CHIQUE J, HERRERA L, URDANETA-MORALES S. 2010. *Eratyrus mucronatus* (Stal, 1859) (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae): primer registro para el estado Anzoátegui (Venezuela). *Bol. Mal. Salud Amb.* 50(2):307-310.
- MOROICOIMA A, DE SOUSA L, HERRERA L, ROJAS L, VILLALOBOS M, CHIQUE J, BARROYETA R, BÓNOLI S. 2011. Simpatría de triatominos (Reduviidae) y escorpiones (Buthidae) en *Coco nucifera* y *Acrocomia aculeata* (Aracaceae) de Anzoátegui, Venezuela. *Bol. Mal. Salud Amb.* 51(2):187-198.
- OTERO M, JIMÉNEZ J, CARCAVALLO R, ORTEGA R, TONN R. 1975. Actualización de la distribución geográfica de Triatominae (Hemiptera, Reduviidae) en Venezuela. *Bol. Dir. Mal. San. Amb.* 15(5):217-230.
- PIFANO C. 1938. Anotaciones acerca de *Psammolestes arthuri* Pinto, 1926 (Hemiptera, Heteroptera: Triatominae), reduviedo hematófago encontrado en nidos de cucarachero de monte (probablemente Dendrocolaptidae) en un sector del valle del Yaracuy. Su importancia como posible vector en la naturaleza del *Schizotrypanum cruzi* Chagas, 1909. *Gac. Méd. Caracas.* 45(16):241-245.
- PIFANO F. 1939: Nota sobre la infestación experimental y en la naturaleza del *Psammolestes arthuri* (Pinto 1926) por el *Schizotrypanum cruzi* Chagas, 1909.

- Gac. Med. Caracas. 47(22):433-435.
- PINTO C. 1926. Triatomídeos da Venezuela, com a descrição de uma nova espécie do gênero *Eutritoma*. Ann. Fac. Med. São Paulo. 1:85-87.
- RAMÍREZ-PÉREZ J. 1985. Chipos de Venezuela. Publicación de la Dirección de Malariología y Saneamiento Ambiental, Ministerio de Sanidad y Asistencia Social, Maracay, Venezuela, pp. 108.
- RAMÍREZ-PÉREZ J. 1987. Revisión de los triatominos (Hemiptera, Reduviidae) en Venezuela. Bol. Dir. Mal. San. Amb. 27:118-146.
- ROSA R, BASMADJÁN Y, GONZALEZ M, SALVATELLA R. 1997. *Triatoma platensis* Neiva, 1913 (Hemiptera, Triatominae) en el departamento de Artigas y su perfil alimentario Rev. Med. Uruguay. 13(3): 207-212.
- SCHACHTER-BROIDE J, DUJARDIN J, KITRON U, GÜRTLER R. 2004. Spatial structuring of *Triatoma infestans* (Hemiptera, Reduviidae) populations from Northwestern Argentina using wing geometric morphometry. J. Med. Entomol. 41(4):643-649.
- SHERLOCK I, CARCAVALLO R, GALÍNDEZ I. 1997. List of natural and experimental flagellate infections in several triatominae species. In: CARCAVALLO R, GALÍNDEZ I, JURBERG J, LENT H. (Eds.). Atlas of Chagas' Disease Vectors in the Americas. Vol. II. Editora Fiocruz, Rio Janeiro, Brasil, pp. 289-297.
- SOTO-VIVAS A. 2009. Clave pictórica triatominos (Hemiptera: Triatominae) de Venezuela. Bol. Mal. Salud Amb. 49(2):259-274.
- SOTO-VIVAS A, LIRIA J, DE LUNA E. 2011. Morfometría geométrica y filogenia en Rhodniini (Hemiptera, Reduviidae) de Venezuela. Acta Zool. Mex. (n.s.). 27(1):87-102.
- WATKINS R. 1966. Comparison of infection produced by two strains of *Trypanosoma cruzi* in mice. J. Parasitol. 52:958-961.