Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América
Facultad de Ciencias Biológicas
Escuela Profesional de Microbiología y Parasitología

Evaluación de la cinética de crecimiento de *Crithidia fasciculata* (Kinetoplastea: Trypanosomatidae) en 4 medios de cultivo convencionales

TESIS

Para optar el Título Profesional de Biólogo Microbiólogo Parasitólogo

AUTOR

Diego Hernán TORRES MATUS

ASESORES

Julia Esther CASTRO HIDALGO
Merly Milagros SOVERO ZAVALETA (Coasesor)

Lima, Perú

2026



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Torres, D. (2026). *Evaluación de la cinética de crecimiento de Crithidia fasciculata (Kinetoplastea: Trypanosomatidae) en 4 medios de cultivo convencionales*. [Tesis de pregrado, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Ciencias Biológicas, Escuela Profesional de Microbiología y Parasitología]. Repositorio institucional Cybertesis UNMSM.

Metadatos complementarios

Datos de autor	
Nombres y apellidos	Diego Hernán Torres Matus
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	72896075
URL de ORCID	https://orcid.org/0009-0006-0437-0086
Datos de asesor	
Nombres y apellidos	Julia Esther Castro Hidalgo
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	07816323
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0002-4140-7013
Datos de coasesor	
Nombres y apellidos	Merly Milagros Sovero Zavaleta
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	10482515
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0002-4373-0295
Datos del jurado	
Presidente del jurado	
Nombres y apellidos	Juan Atilio Jimenez Chunga
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	06281952
Miembro del jurado 1	
Nombres y apellidos	Pedro Luis Castellanos Sanchez
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	09649588
Miembro del jurado 2	
Nombres y apellidos	Nora Yessenia Vera Obando
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	41851323

Datos de investigación	
Línea de investigación	B.2.1.2. Enfermedades Infecciosas y Parasitarias
Grupo de investigación	Salud Reproductiva e infecciones de transmisión sexual
Agencia de financiamiento	Perú. Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM). Vicerrectorado de Investigación y Posgrado (VRIP). Programa de Proyectos de Investigación con Financiamiento para Grupos de Investigación (PCONFIGI - 2024). Resolución Rectoral 004305-2024-R/UNMSM. Código de Proyecto A24010551.
Ubicación geográfica de la investigación	Edificio: Centro de Investigaciones Tecnológicas, Biomédicas y Medioambientales (CITBM) País: Perú Departamento: Callao Provincia: Callao Distrito: Bellavista Centro poblado: Callao Urbanización: Urbanización San Joaquín Manzana y lote: (No aplica) Calle: Calle José Santos Chocano 199 Latitud: -12.05833 Longitud: -77.08722
Año o rango de años en que se realizó la investigación	Septiembre 2024 - Diciembre 2025
URL de disciplinas OCDE	Biología https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.06.00 Parasitología https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#3.03.07 Biología celular, Microbiología https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.06.01

Universidad Nacional Mayor de San Marcos
(Universidad del Perú, Decana de América)

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ACTA DE SESIÓN PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE BIÓLOGO MICROBIÓLOGO PARASITÓLOGO

(MODALIDAD: SUSTENTACIÓN PRESENCIAL DE TESIS)

Siendo las ..11:10.. horas del 27 de agosto del 2026, en el Salón de Grados de la Facultad de Ciencias Biológicas y en presencia del jurado formado por los profesores que suscriben, se dio inicio a la sesión para optar al **Título Profesional de Biólogo Microbiólogo Parasitólogo** de **DIEGO HERNÁN TORRES MATUS.**

Luego de dar lectura y conformidad al expediente **N.º UNMSM-20260081677**, el titulando expuso su tesis: **EVALUACIÓN DE LA CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE *Crithidia fasciculata* (KINETOPLASTEA: TRYPANOSOMATIDAE) EN 4 MEDIOS DE CULTIVO CONVENCIONALES**, y el Jurado efectuó las preguntas del caso calificando la exposición con la nota ..19.. calificado: ..Aprobado con máximos honores..

Finalmente, el expediente será enviado a la Escuela Profesional de Microbiología y Parasitología, y al Consejo de Facultad para que se apruebe otorgar el **Título Profesional de Biólogo Microbiólogo Parasitólogo** de **DIEGO HERNÁN TORRES MATUS** y se eleva lo actuado al Rectorado para conferir el respectivo título conforme a ley.

Siendo las ..12:20.. horas se levantó la sesión.

Ciudad Universitaria, 27 de agosto de 2026.

JUAN ATILIO JIMENEZ CHUNGA
PRESIDENTE

JULIA ESTHER CASTRO HIDALGO
ASESORA

PEDRO LUIS CASTELLANOS SANCHEZ
MIEMBRO

NORA YESSENIA VERA OBANDO
MIEMBRO

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE
SAN MARCOS
Universidad del Perú, Decana de América

Anexo 1

CERTIFICADO DE SIMILITUD

Yo, JULIA ESTHER CASTRO HIDALGO, en mi condición de asesora acreditada mediante Dictamen N°000022-2026-EPMP-FCB/UNMSM de la tesis cuyo título es “Evaluación de la cinética de crecimiento de *Crithidia fasciculata* (Kinetoplastea: Trypanosomatidae) en 4 medios de cultivo” presentado por el bachiller DIEGO HERNAN TORRES MATUS, para optar al Título Profesional de Biólogo Microbiólogo Parasitólogo.

CERTIFICO que se ha cumplido con lo establecido en la Directiva de Originalidad y de Similitud de Trabajos Académicos, de Investigación y Producción Intelectual. Según la revisión, análisis y evaluación mediante la plataforma PIDS, el documento evaluado cuenta con el 1% de similitud, nivel PERMITIDO para continuar con los trámites correspondientes y para su publicación en el repositorio institucional.

Se emite el presente certificado en cumplimiento de lo establecido en las normas vigentes, como uno de los requisitos para la obtención del Título de Biólogo Microbiólogo Parasitólogo.

Lima, 09 de octubre del 2026

Firma del Asesor 

Nombres y Apellidos del asesor: **JULIA ESTHER CASTRO HIDALGO**

DNI: 07816323

ABREVIATURAS

BHI: *Brain Heart Infusion*

CITBM: Centro de Investigaciones Tecnológicas, Biomédicas y Medioambientales

LEMYG: Laboratorio de Epidemiología Molecular y Genética

LIB: *Liver Infusion Broth*

LIT: *Liver Infusion Tryptose*

NNN: Novy-MacNeal-Nicolle

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa

qPCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa Cuantitativa

SBF: Suero Bovino Fetal

SC: Subcultivo

SDM: *Schneider's Drosophila Medium*

ÍNDICE

ABREVIATURAS ii

ÍNDICE DE FIGURAS vi

ÍNDICE DE TABLAS viii

ÍNDICE DE ANEXOS ix

1. INTRODUCCIÓN 1

2. ANTECEDENTES 4

3. MARCO TEÓRICO 8

3.1. Caracterización biológica y genómica de *Crithidia* 8

3.2. Morfología y formas celulares 9

3.3. Taxonomía y clasificación 12

3.4. Ciclo de vida 14

3.5. Mecanismos de transmisión 16

3.6. Epidemiología 17

3.7. Patogenicidad 19

3.8. Diagnóstico de *Crithidia* spp. en infecciones humanas 21

3.9. Cultivo in vitro de *Crithidia* spp. 23

4. HIPÓTESIS 27

5. OBJETIVOS 28

5.1. Objetivo general 28

5.2. Objetivos específicos 28

6. MATERIALES 29

6.1. Tipo de estudio 29

6.2. Material biológico 29

6.3. Material de laboratorio 30

6.3.1. Equipos de protección personal 30

6.3.2. Reactivos y consumibles 30

6.3.3. Equipos 32

6.3.4. Otros 33

7. MÉTODOS 34

7.1. Identificación taxonómica de los aislamientos 34

7.2. Obtención, procesamiento y reactivación de los aislamientos 35

7.3. Preparación del extendido y tinción con Giemsa 35

7.4. Observación microscópica de las formas parasitarias 36

7.5. Recuento inicial de formas parasitarias en cámara de Neubauer 36

7.6. Criopreservación de alícuotas de trabajo y preparación del inóculo experimental 38

7.7. Medios de cultivo 39

7.8. Cinética de crecimiento 39

7.9. Determinación de la viabilidad de los cultivos 39

7.10. Análisis estadístico del crecimiento de *Crithidia* en los medios de cultivo 39

7.10.1. Variables analizadas 40

7.10.2. Transformación y preparación de los datos 41

7.10.3. Análisis de varianza (ANOVA) de dos vías 42

7.10.4. Modelos lineales mixtos para datos longitudinales 42

7.10.5. Software y criterios de significancia 44

8. RESULTADOS 45

8.1. Crecimiento de *Crithidia fasciculata* en medios de cultivo y a diferentes temperaturas 45

8.1.1. Crecimiento de *Crithidia fasciculata* a temperatura de 25 °C 45

8.1.2. Crecimiento de *Crithidia fasciculata* a temperatura de 26 °C 48

8.1.3. Crecimiento de *Crithidia fasciculata* a temperatura de 27 °C 50

8.2. Viabilidad de *Crithidia fasciculata* en medios de cultivo y a diferentes temperaturas 52

8.2.1. Viabilidad de *Crithidia fasciculata* a temperatura de 25 °C.....52

8.2.2. Viabilidad de *Crithidia fasciculata* a temperatura de 26 °C.....53

8.2.3. Viabilidad de *Crithidia fasciculata* a temperatura de 27 °C.....55

8.3. Análisis de varianza y regresión en variables de crecimiento 57

8.4. Modelo mixto lineal del crecimiento de *Crithidia fasciculata* 58

8.5. Modelo mixto lineal de la viabilidad de *Crithidia fasciculata* 59

9. DISCUSIÓN.....61

10. CONCLUSIONES 65

11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 66

12. ANEXOS.....78

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema general de *Crithidia spp.* Fuente: Modificado de Lakos et al. (2016) 9

Figura 2. Forma coanomastigote representativa de *Crithidia.* Fuente: Darío et al. (2021).....11

Figura 3. Árbol filogenético de la subfamilia Leishmaniinae, construido a partir de secuencias concatenadas de 18S rRNA y gGAPDH mediante inferencia bayesiana y máxima verosimilitud. Fuente: Barratt et al. (2017). 14

Figura 4. Ciclo de vida monoxénico de *Crithidia fasciculata* en insectos. Fuente: Modificado de Alcolea et al. (2014). 15

Figura 5. Esquema del ciclo de transmisión de *Crithidia bombi* en polinizadores. El parásito persiste durante la hibernación de la reina infectada (1), se mantiene al inicio de una nueva colonia (2), puede adquirirse durante el forrajeo en flores contaminadas (3 y 5), propagarse dentro de la colonia (4), acompañar la salida de machos (6) e infectar a nuevas reinas que reinician el ciclo en la siguiente temporada (7). Fuente: Adaptado de Schmid-Hempel, P., Wilfert, L., & Schmid-Hempel, R. (2019). 17

Figura 6. Flujograma metodológico del procesamiento inicial, preparación del extendido, tinción con Giemsa, observación microscópica y recuento inicial en cámara de Neubauer de *Crithidia fasciculata*. Fuente: Elaboración propia. 37

Figura 7. Curvas de crecimiento de *Crithidia fasciculata* en los medios BHI, LIT, SDM y USAMRU a 25 °C durante 15 días. 47

Figura 8. Curvas de crecimiento de *Crithidia fasciculata* en los medios BHI, LIT, SDM y USAMRU a 26 °C durante 15 días. 49

Figura 9. Curvas de crecimiento de *Crithidia fasciculata* en los medios BHI, LIT, SDM y USAMRU a 27 °C durante 15 días. 51

Figura 10. Curvas de viabilidad celular de *Crithidia fasciculata* en los medios BHI, LIT, SDM y USAMRU a 25 °C durante 15 días. 53

Figura 11. Curvas de viabilidad celular de *Crithidia fasciculata* en los medios BHI, LIT, SDM y USAMRU a 26 °C durante 15 días. 55

Figura 12. Curvas de viabilidad celular de *Crithidia fasciculata* en los medios BHI, LIT, SDM y USAMRU a 27 °C durante 15 días. 56

Figura 13. *Crithidia fasciculata* en medio LIT, 25° C, día 2, 400X 94

Figura 14. *Crithidia fasciculata* en medio LIT, 25° C, día 7, 400X 94

Figura 15. *Crithidia fasciculata* en medio LIT, 25° C, día 12, 400X 95

Figura 16. Tinción de suspensión de *Crithidia fasciculata* con azul de tripán 96

Figura 17. Células no viables de *Crithidia fasciculata* diferenciadas mediante tinción con azul de tripán 96

Figura 18. Coanomastigotes de *Crithidia fasciculata* en lámina teñida con Giemsa 97

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características morfológicas generales de las formas celulares de *Crithidia* spp. 11

Tabla 2. Secuencias genómicas complementarias agregadas a la base de datos *Protozoa* del software Kraken 2 34

Tabla 3. Parámetros cinéticos de *Crithidia fasciculata* a 25 °C en diferentes medios de cultivo. ..47

Tabla 4. Parámetros cinéticos de *Crithidia fasciculata* a 26 °C en diferentes medios de cultivo. ..49

Tabla 5. Parámetros cinéticos de *Crithidia fasciculata* a 27 °C en diferentes medios de cultivo. ..51

Tabla 6. Descriptivos de viabilidad a 25 °C. 53

Tabla 7. Descriptivos de viabilidad a 26 °C. 55

Tabla 8. Descriptivos de viabilidad a 27 °C. 57

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Preparación de medios de cultivo 78

Anexo 2. Conteo de *Crithidia fasciculata* en cultivos originales.....86

Anexo 3. Porcentaje de viabilidad de *Crithidia fasciculata* en cultivos originales.....90

Anexo 4. *Crithidia fasciculata* en cultivo in vitro 94

Anexo 5. Tinción de *Crithidia fasciculata* 96

1. INTRODUCCIÓN

El género *Crithidia* comprende protozoarios flagelados pertenecientes a la familia Trypanosomatidae, tradicionalmente reconocidos como parásitos monoxénicos debido a que su ciclo de vida se desarrolla principalmente en insectos, especialmente del orden Hymenoptera y Diptera. Sin embargo, en los últimos años se han reportado hallazgos que evidencian la presencia de especies de *Crithidia* en vertebrados, incluyendo diversos mamíferos y humanos, lo que ha generado un creciente interés en torno a su potencial relevancia en salud pública (Boucinha et al., 2022; Fadhil y Ali, 2024).

Por pertenecer a la familia Trypanosomatidae, *Crithidia* comparte similitudes morfológicas, fisiológicas y metabólicas con *Leishmania*. Algunos estudios han reportado la supervivencia de ciertas especies de *Crithidia* a temperaturas cercanas a 37 °C e incluso la capacidad de infectar líneas celulares de mamíferos en condiciones de laboratorio (Ghobakhloo et al., 2019), aunque aún no está completamente esclarecido si esta adaptabilidad es intrínseca o si depende de factores protectores del microambiente hospedero. Asimismo, se ha evidenciado la coexistencia de ambos parásitos en vectores hematófagos, lo que sugiere posibles interacciones en los ciclos de transmisión y plantea dificultades en el diagnóstico diferencial en áreas endémicas de leishmaniasis (Songumpai et al., 2022). En conjunto, estos resultados no solo amplían el espectro de hospedadores descritos para el género, sino que también han motivado una reevaluación de su condición estrictamente monoxénica (Boulanger et al., 2001; Cerone et al., 2022; Takamiya, 2023).

En los últimos años, en Irán, se han reportado casos de detección de *Crithidia* spp. en muestras clínicas humanas, tanto en pacientes inmunocomprometidos como inmunocompetentes, con manifestaciones clínicas similares a leishmaniasis (Ghobakhloo et al., 2019; Rogerio et al., 2023). En estos casos, la confirmación del agente etiológico se ha

realizado mediante técnicas moleculares, incluyendo la secuenciación de ADN y su comparación con bases de datos genómicas, lo que ha permitido diferenciar a *Crithidia* spp. de otros tripanosomátidos como *Leishmania* spp., inicialmente considerados en el diagnóstico presuntivo (Boucinha et al., 2022; Maruyama et al., 2019). De forma similar, en Brasil se han documentado casos de coinfección entre *Crithidia* spp. y *Leishmania* spp. determinados mediante PCR de marcadores genéticos y secuenciación, asociados a manifestaciones clínicas más severas y una menor respuesta al tratamiento convencional (Boucinha et al., 2022; Maruyama et al., 2019). Estas evidencias ponen de manifiesto la necesidad de mejorar las herramientas diagnósticas disponibles y fortalecer la vigilancia epidemiológica de *Crithidia* spp. en humanos.

En el contexto peruano, la evidencia sobre la presencia de *Crithidia* en humanos es aún limitada y reciente. Un estudio realizado en el país ha reportado la detección de este parásito en muestras clínicas humanas mediante técnicas moleculares. No obstante, su rol como agente etiológico primario ha sido interpretado con precaución, sugiriendo que su presencia podría estar asociada a coinfección con *Leishmania* spp., contaminación o a un papel secundario dentro del cuadro clínico (Barbosa dos Santos et al., 2025).

A pesar de estos avances, el diagnóstico de *Crithidia* spp. en humanos continúa siendo un desafío debido a la escasez de protocolos estandarizados para su aislamiento y cultivo a partir de muestras clínicas. La identificación molecular del parásito suele requerir alcanzar una alta densidad poblacional, la cual se obtiene mediante el cultivo previo de las muestras (Boucinha et al.,2022). En estos casos, la caracterización se realiza mediante la amplificación y secuenciación de marcadores genéticos ampliamente utilizados en tripanosomátidos, como el ARN ribosomal 18S (SSU rRNA), las regiones ITS1 y el gen gGAPDH, los cuales

permiten una adecuada diferenciación de *Crithidia* spp. frente a otros géneros relacionados (Maruyama et al., 2019).

En este contexto, la mayoría de los estudios ha empleado medios convencionalmente utilizados para el cultivo de *Leishmania* spp., tales como el medio Novy-MacNeal-Nicolle (NNN) suplementado con suero bovino fetal (SBF) inactivado, Schneider's Drosophila Medium (SDM), Liver Infusion Tryptose (LIT) y Brain Heart Infusion (BHI) (Boucinha et al., 2022). No obstante, la evidencia sobre la eficacia específica de estos medios para el crecimiento de *Crithidia* spp., particularmente en aislamientos provenientes de muestras humanas, sigue siendo limitada, ya que su aplicación para este género responde principalmente a su uso empírico en tripanosomátidos relacionados o en aislamientos de origen no humano, más que a protocolos específicamente desarrollados para *Crithidia* spp. (Nasiri et al., 2017; Ghobakhloo et al., 2019).

Por lo expuesto, en el presente estudio se evaluará la cinética de crecimiento y la viabilidad de un aislado clínico de *Crithidia fasciculata*, proveniente de una muestra humana y previamente caracterizada mediante secuenciación y análisis filogenético. Dicha evaluación se realizará en los medios de cultivo convencionales Schneider's Drosophila Medium, Brain Heart Infusion modificado, Liver Infusion Tryptose y USAMRU, con el objetivo de identificar las condiciones más eficientes para la proliferación y mantenimiento del parásito. Los resultados servirán de base para la estandarización de protocolos de obtención rápida de biomasa para ensayos moleculares, y aportarán parámetros fenotípicos clave para la optimización del diagnóstico diferencial de tripanosomátidos emergentes en Perú.

2. ANTECEDENTES

El género *Crithidia* comprende protozoarios flagelados pertenecientes a la familia Trypanosomatidae, que se localizan principalmente en el tracto digestivo de los insectos. Fue descrito por Léger en 1902 a partir del estudio de flagelados intestinales en mosquitos del género *Anopheles*, particularmente en *Anopheles maculipennis*. Posteriormente, diversas especies han sido identificadas en múltiples órdenes de insectos, incluyendo dípteros, hemípteros e himenópteros, lo que evidencia su amplia distribución entre hospedadores invertebrados (Frolov et al., 2021). Por ello, se considera que las especies de este género presentan un ciclo de vida monoxénico, desarrollado principalmente en este tipo de hospedadores.

Sin embargo, estudios recientes han evidenciado una amplia distribución del parásito en distintos grupos de insectos, lo que refleja una notable plasticidad ecológica dentro de estos hospedadores (Boucinha et al., 2022). Asimismo, se han reportado hallazgos de *Crithidia* spp. en vertebrados, lo que sugiere un posible proceso de adaptación a diferentes entornos fisiológicos. En este sentido, se ha planteado que la detección del parásito en insectos hematófagos podría favorecer su exposición a hospedadores no tradicionales, aunque los mecanismos de transmisión hacia vertebrados aún no han sido completamente establecidos (Songumpai et al., 2022).

Recientemente, *Crithidia mellificae* fue identificada en diversos vertebrados de distintos biomas en Brasil, confirmando su presencia mediante técnicas moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la secuenciación de marcadores genéticos, en mamíferos como coatíes (*Nasua nasua*), titíes (*Callithrix sp.*), murciélagos (*Carollia perspicillata, Myotis lavali, M. izecksohni, Artibeus lituratus*), zorros cangrejeros (*Cerdocyon thous*) y ocelotes (*Leopardus pardalis*) (Darío et al., 2021).

Esta evidencia sugiere que la presencia del parásito en vertebrados podría no ser un evento accidental, sino reflejar una posible ampliación de su rango de hospedadores. En el mismo estudio, los autores demostraron que *C. mellificae* puede crecer en cultivos in vitro, particularmente en medios convencionales para tripanosomátidos como NNN y LIT suplementados con 10% de SBF, a temperaturas de hasta 37°C, e inducir una respuesta inmune humoral en primates no humanos. Si bien estos reportes demuestran la capacidad de interacción del parásito con hospedadores vertebrados, aún no permiten establecer con claridad su rol en procesos patológicos.

A partir del creciente número de reportes de *Crithidia* spp. en mamíferos, surgió la hipótesis de su posible presencia en humanos. En este contexto, estudios realizados en Irán han reportado la detección de *Crithidia* spp. en pacientes con lesiones cutáneas, tanto en infecciones únicas como en coinfección con *Leishmania major*, incluso en individuos inmunocompetentes (Ghobakhloo et al., 2019). La identificación del parásito se realizó mediante técnicas moleculares, incluyendo la amplificación por PCR de marcadores como el gen gGAPDH, seguido de secuenciación y análisis comparativo con bases de datos genómicas, lo que permitió diferenciar *Crithidia* spp. de *Leishmania* spp. y confirmar la presencia de *Crithidia fasciculata* en biopsias de lesiones cutáneas. De igual manera, se observó la capacidad de estos aislados de infectar líneas celulares de macrófagos en condiciones experimentales y sobrevivir a 37 °C, aunque con menor eficiencia en comparación con *Leishmania* spp.

Por otra parte, se ha reportado la detección de *Crithidia* spp. en casos clínicos con manifestaciones atípicas compatibles con leishmaniasis, lo que ha generado interés en su posible participación dentro del cuadro infeccioso (Maruyama et al., 2019). En el estudio, la evidencia corresponde a un reporte de caso único, en el cual se obtuvieron dos aislados

parasitarios, LVH60 y LVH60a, a partir de un mismo paciente, cuya identificación se realizó mediante técnicas moleculares que facilitaron su diferenciación respecto a *Leishmania* spp. No obstante, dado que estos hallazgos corresponden a un solo caso clínico, no permiten establecer un rol patogénico definido de *Crithidia* spp.

Rogerio et al. (2023), en Brasil, reportaron un caso de leishmaniasis visceral refractaria al tratamiento en el que se detectó coinfección con *Crithidia* sp. y *Leishmania infantum*. Mediante secuenciación y análisis filogenético de muestras de médula ósea y piel, se confirmó la presencia simultánea de ambos parásitos, permitiendo su distinción a nivel molecular. La evolución del paciente fue consistente con formas graves de leishmaniasis visceral, atribuidas a *L. infantum*. Asimismo, los aislados descritos por Rogério et al. (2023) mostraron relación molecular con los aislados clínicos previamente reportados por Maruyama et al. (2019) en la misma región endémica, al agruparse dentro de un mismo linaje relacionado con *Crithidia* mediante análisis filogenéticos y genómicos, en un contexto en el que su presencia ha sido interpretada como oportunista dentro del proceso infeccioso.

Desde el punto de vista experimental, los estudios tradicionales sobre el cultivo de *Crithidia spp.* resaltan que este género puede mantenerse in vitro bajo condiciones relativamente simples, aunque con requerimientos nutricionales definidos. En este sentido, Kidder y Dutta (1958) demostraron que *Crithidia fasciculata* podía crecer en medios de cultivo muy básicos a base de agua peptonada, suplementados con hemina bovina o sangre, y evaluaron distintas concentraciones de aminoácidos, carbohidratos y otros suplementos nutricionales con el fin de optimizar un crecimiento rápido y abundante para estudios metabólicos, evidenciando un crecimiento consistente del parásito en medios que contenían histidina, fenilalanina, isoleucina, leucina, valina, lisina, arginina, tirosina, metionina y triptófano. Estos trabajos constituyen uno de los primeros antecedentes experimentales sobre las necesidades

nutricionales del parásito y establecieron bases importantes para investigaciones posteriores sobre su cultivo.

En reportes de infección por *Crithidia spp.* en mamíferos, incluyendo humanos, el medio Novy-MacNeal-Nicolle (NNN) ha sido empleado para el aislamiento primario del parásito, seguido por el uso de medios líquidos para su subcultivo y mantenimiento. En el estudio de Ghobakhloo et al. (2019), las muestras clínicas fueron inicialmente cultivadas en NNN a 25 °C y posteriormente subcultivadas en medio RPMI 1640 suplementado con 10% de SBF, además de evaluar la viabilidad a 37 °C en medio Schneider's Drosophila Medium (SDM-79). De forma similar, Darío et al. (2021) realizaron modificaciones del medio NNN para los subcultivos, incorporando una segunda fase con Liver Infusion Tryptose (LIT), mientras que Takamiya et al. (2023) emplearon SDM suplementado con 10% de SBF para optimizar el crecimiento del parásito.

Asimismo, algunas variantes del medio NNN, como el medio USAMRU (USM), han sido propuestas para mejorar el aislamiento primario de tripanosomátidos mediante una fase sólida con sangre de conejo y una fase líquida enriquecida con antibióticos (Bermúdez, 2005). En aislamientos procedentes de insectos, medios como LIT y Brain Heart Infusion (BHI) también han mostrado utilidad para el aislamiento primario y los subcultivos (Mundim et al., 1974; Popp et al., 2011).

3. MARCO TEÓRICO

3.1. Caracterización biológica y genómica de *Crithidia*

Crithidia pertenece a la familia Trypanosomatidae y comprende protozoarios flagelados con ciclo de vida predominantemente monoxénico, desarrollado principalmente en el intestino de insectos. Entre las especies más estudiadas destacan *Crithidia bombi*, parásito frecuente en abejorros y relevante en la ecología de polinizadores; y *Crithidia fasciculata*, ampliamente empleada como modelo experimental en estudios de biología celular y metabolismo de tripanosomátidos (Boulanger et al., 2001; Kaufer et al., 2017; Cerone et al., 2022).

Desde el punto de vista genómico, *Crithidia* presenta rasgos característicos de los tripanosomátidos, como un genoma nuclear compacto, genes organizados en unidades policistrónicas y regulación predominante a nivel postranscripcional. Asimismo, posee un cinetoplasto con ADN mitocondrial conformado por maxicírculos y minicículos. En comparación con *Leishmania* y *Trypanosoma*, conserva genes relacionados con rutas metabólicas centrales y el sistema antioxidante basado en tripanotión, aunque carece de expansiones génicas asociadas con patogenicidad en vertebrados. También destacan genes implicados en la adhesión y persistencia en el hospedador invertebrado, como las proteasas GP63 y proteínas de la familia amastina, lo que refuerza su adaptación al ambiente intestinal de los insectos (Lukeš et al., 2018; Boucinha et al., 2022).

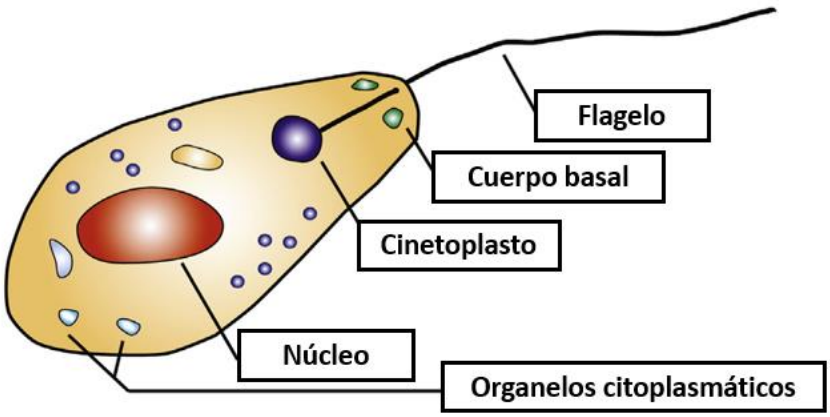


Figura 1. Esquema general de *Crithidia* spp. Fuente: Modificado de Lakos et al. (2016)

3.2. Morfología y formas celulares

El ciclo vital de *Crithidia* comprende distintos morfotipos celulares cuya presencia varía según la especie, el hospedador y las condiciones de cultivo. Entre las formas más representativas descritas para el género se reconocen la forma leptomonada, correspondiente al morfotipo promastigote; la forma coanomastigote, considerada característica del género; la forma haptomonada, asociada a la adhesión al epitelio del hospedador; y, bajo determinadas condiciones, formas redondeadas parecidas a amastigotes. Además, en algunas especies se han descrito formas nectomonadas, las cuales representan estadios flagelados móviles relacionados con la colonización intestinal.

La forma leptomonada corresponde a un estadio promastigote fusiforme y alargado, que mide entre 15 y 20 µm de longitud por 1 a 2 µm de ancho. Presenta núcleo central, cinetoplasto situado en el extremo anterior y un único flagelo libre emergente, sin membrana ondulante. Se considera un estadio intermedio presente durante la transición entre otras morfologías y asociado a procesos de multiplicación en el hospedador o en cultivo (Gossage et al., 2003; Mishra et al., 2007).

La forma coanomastigote, representativa de *Crithidia*, se distingue por su tamaño variable, cuerpo robusto, extremo posterior redondeado y extremo anterior truncado, del cual emerge un único flagelo de aproximadamente 20 µm de longitud a través de una bolsa flagelar con aspecto embudiforme. Además, muestra un collar flagelar prominente y el cinetoplasto ubicado ligeramente anterior al núcleo. Esta morfología predomina en el tracto digestivo del hospedador invertebrado y constituye el morfotipo clásicamente asociado al *género* (Darío et al., 2021; Hoare y Wallace, 1966; Wolfenson, 1985; Maslov et al., 2013; Yurchenko et al., 2008).

La forma nectomonada corresponde a un estadio flagelado móvil, de cuerpo delgado y alargado, con flagelo largo y completamente desarrollado. Se ha relacionado con la colonización activa del intestino del hospedador y ha sido descrita en algunas especies y condiciones particulares, por lo que no constituye el morfotipo más representativo del género (Frolov et al., 2021).

La forma haptomonada corresponde al estadio adherente de *Crithidia*, caracterizado por presentar un flagelo acortado y remodelado en una estructura especializada de fijación. Su morfología es más redondeada que la de las formas móviles, y puede disponerse en agregados tipo roseta durante la adhesión o en fases estacionarias de cultivo. En el extremo del flagelo modificado se desarrolla una placa hemidesmosomal que establece un contacto firme con el epitelio intestinal del hospedador invertebrado (Filosa et al., 2019; Buendía-Abad et al., 2021, 2022).

Bajo determinadas condiciones, *Crithidia* también puede presentar formas redondeadas parecidas a amastigotes, de morfología esférica u ovoide, con un diámetro aproximado de 2 a 5 µm y ausencia de flagelo libre externo. Presenta un núcleo excéntrico con cariosoma prominente, un cinetoplasto visible situado próximo al núcleo y un axonema rudimentario

que se extiende hasta el borde del cuerpo. Morfológicamente, es similar a los amastigotes de *Leishmania*, aunque se diferencia de estos por su localización extracelular y por no corresponder al estadio intracelular típico de los macrófagos (Alcolea et al., 2014; Maslov et al., 2013).



Figura 2. Forma coanomastigote representativa de *Crithidia.* Fuente: Darío et al. (2021)

Tabla 1. Características morfológicas generales de las formas celulares de *Crithidia* spp.

Morfología	Forma general y rasgos distintivos	Ubicación del cinetoplasto y núcleo	Flagelo y estructuras asociadas	Localización o asociación principal	Referencias
Leptomonada	Cuerpo fusiforme y alargado	Núcleo central. Cinetoplasto anterior	Un único flagelo libre. Sin membrana ondulante	Forma flagelada móvil asociada a la multiplicación y diferenciación	Gossage et al., 2003; Mishra et al., 2007
Coanomastigote	Cuerpo robusto, con extremo posterior redondeado y extremo anterior truncado con bolsa flagelar	Cinetoplasto ligeramente anterior al núcleo	Un único flagelo que emerge de una estructura embudiforme. Collar flagelar prominente	Tracto digestivo del hospedador invertebrado. Morfotipo característico del género	Hoare y Wallace, 1966; Wolfenson, 1985; Darío et al., 2021; Maslov et al., 2013; Yurchenko et al., 2008

Morfología	Forma general y rasgos distintivos	Ubicación del cinetoplasto y núcleo	Flagelo y estructuras asociadas	Localización o asociación principal	Referencias
Nectomonada	Cuerpo delgado y alargado	Núcleo central. Posición del cinetoplasto variable según la especie	Flagelo largo y completamente desarrollado. Membrana ondulante presente en algunas especies.	Forma móvil asociada a la colonización intestinal en ciertas especies o condiciones	Frolov et al., 2021
Haptomonada	Cuerpo más redondeado. Forma adherente	Cinetoplasto anterior al núcleo	Flagelo acortado transformado en estructura de fijación. Placa hemidesmosomal.	Fase de adhesión al epitelio intestinal o cultivo estacionario. Puede formar agregados tipo roseta	Filosa et al., 2019; Buendía-Abad et al., 2021, 2022; Karpov y Gorbunov, 2025
Forma parecida a amastigote	Cuerpo esférico u ovoide. 2–5 µm de diámetro	Núcleo excéntrico. Cinetoplasto próximo al núcleo	Sin flagelo libre. Axonema rudimentario interno	Forma extracelular descrita bajo determinadas condiciones.	Alcolea et al., 2014; Maslov et al., 2013

3.3. Taxonomía y clasificación

El género *Crithidia* fue descrito a inicios del siglo XX por Léger a partir del estudio de flagelados intestinales de insectos, y *Crithidia fasciculata* fue reconocida como la especie tipo del género. Su clasificación inicial, al igual que la de otros tripanosomátidos monoxénicos, se basó en características morfológicas distintivas, como su forma truncada y ancha, semejante a un grano de cebada, rasgo que inspiró el nombre *Crithidia* (Hoare y Wallace, 1966).

Con el desarrollo de la parasitología molecular, se evidenció que los caracteres morfológicos por sí solos no son suficientemente confiables para delimitar géneros dentro de Trypanosomatidae, debido a su variabilidad entre especies, poblaciones y condiciones de cultivo (Votýpka et al., 2013). En este contexto, estudios basados en marcadores moleculares como el ARNr 18S y el gen gGAPDH demostraron que varios géneros tradicionales de tripanosomátidos monoxénicos, entre ellos *Leptomonas*, *Crithidia* y *Blastocrithidia*, no

forman grupos monofiléticos bien definidos (Kostygov & Yurchenko, 2017a). Este hallazgo motivó una reorganización de la clasificación del grupo (Kostygov et al., 2017b).

Dentro de este marco, *Crithidia* es actualmente reconocido dentro de la subfamilia Leishmaniinae (Maslov y Lukeš, 2012). De acuerdo con el Taxonomy Browser del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI, 2025), su ubicación taxonómica comprende los niveles:

- Dominio: Eukaryota
- Supergrupo: Discoba
- Filo: Euglenozoa
- Clase: Kinetoplastea (Honigberg, 1963)
- Subclase: Metakinetoplastina (Vickerman, 2004)
- Orden: Trypanosomatida (Kent, 1880)
- Familia: Trypanosomatidae (Doflein, 1901)
- Subfamilia: Leishmaniinae (Maslov & Lukeš, 2012)
- Género: *Crithidia* Léger, 1902

La posición filogenética de *Crithidia* dentro de la subfamilia Leishmaniinae se evidencia en el árbol filogenético de Barratt et al. (2017) (Figura 3), el cual incluye géneros monoxénicos y dixénicos representativos y respalda su relación con *Leptomonas, Zelonia* y *Novymonas*, monoxénicos cercanos evolutivamente a *Leishmania*.

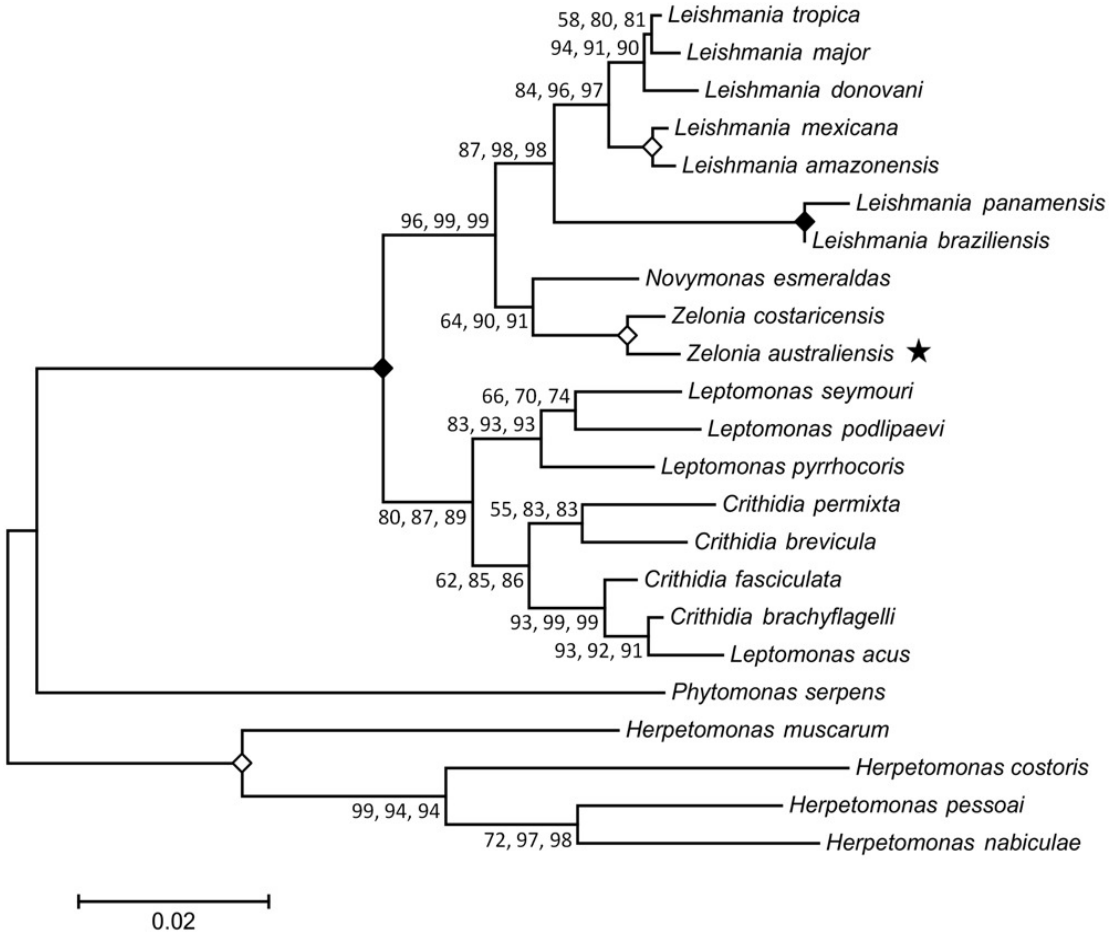


Figura 3. Árbol filogenético de la subfamilia Leishmaniinae, construido a partir de secuencias concatenadas de 18S rRNA y gGAPDH mediante inferencia bayesiana y máxima verosimilitud. Fuente: Barratt et al. (2017).

3.4. Ciclo de vida

El ciclo de vida de *Crithidia* es monoxénico y transcurre principalmente en el tracto digestivo de insectos, donde el parásito alterna entre formas morfológicas adaptadas a la colonización, multiplicación y transmisión (Figura 4).

La infección inicia con la ingestión de formas parecidas a amastigotes, eliminadas con las heces de individuos parasitados, las cuales pueden ser ingeridas por hospedadores en distintas fases de desarrollo, tales como larva, pupa o adulto. Una vez en el intestino medio del nuevo hospedador, estas formas se diferencian en morfotipos flagelados, entre los que

pueden encontrarse formas leptomonada, coanomastigote o nectomonada, según la especie y las condiciones del hospedador, los cuales presentan alta motilidad y capacidad proliferativa, favoreciendo la colonización del epitelio intestinal (Alcolea et al., 2014).

Posteriormente, algunas células se transforman en formas haptomonadas que se fijan firmemente al epitelio contribuyendo a su persistencia en el hospedador y al mantenimiento de la infección. En etapas finales, los parásitos vuelven a diferenciarse en formas parecidas a amastigotes, que se liberan con las heces, completando así el ciclo (Buendía-Abad et al., 2021, 2022).

Este patrón cíclico, con transiciones reversibles entre formas móviles y adherentes, permite a *Crithidia* spp. mantener infecciones persistentes en el hospedador invertebrado y asegurar la transmisión horizontal entre una amplia gama de insectos, incluyendo dípteros, hemípteros e himenópteros (Frolov et al., 2021).

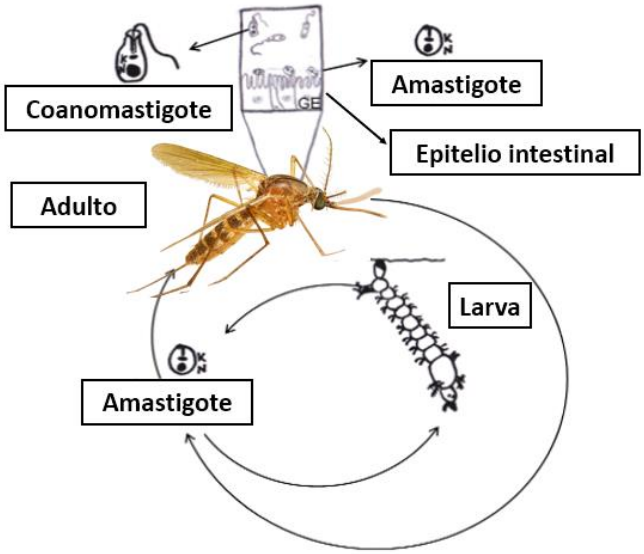


Figura 4. Ciclo de vida monoxénico de *Crithidia fasciculata* en insectos. Fuente: Modificado de Alcolea et al. (2014).

3.5. Mecanismos de transmisión

Crithidia vive en el intestino de los artrópodos y suele transmitirse de insecto a insecto por contaminación fecal. La forma de transmisión clásica es fecal-oral: los insectos infectados depositan formas infectantes eliminadas con las heces sobre flores u otras superficies, y otros insectos las ingieren al alimentarse de néctar o polen contaminados (Van Wyk et al., 2023). También se ha descrito la transmisión mecánica entre insectos, en la que insectos no hospedadores, moscas, pueden actuar como vectores mecánicos. Estas moscas, aunque no desarrollan la infección, defecan las formas infectantes viables después de ingerirlas y contaminan flores con ellas (Davis et al., 2021).

Aunque se ha planteado la participación de insectos hematófagos en la circulación de tripanosomátidos monoxénicos, la posible exposición de vertebrados a *Crithidia* spp. continúa siendo un tema de investigación y, hasta el momento, no se ha demostrado con claridad un mecanismo de transmisión vertebrado definido. (Songumpai et al., 2022).

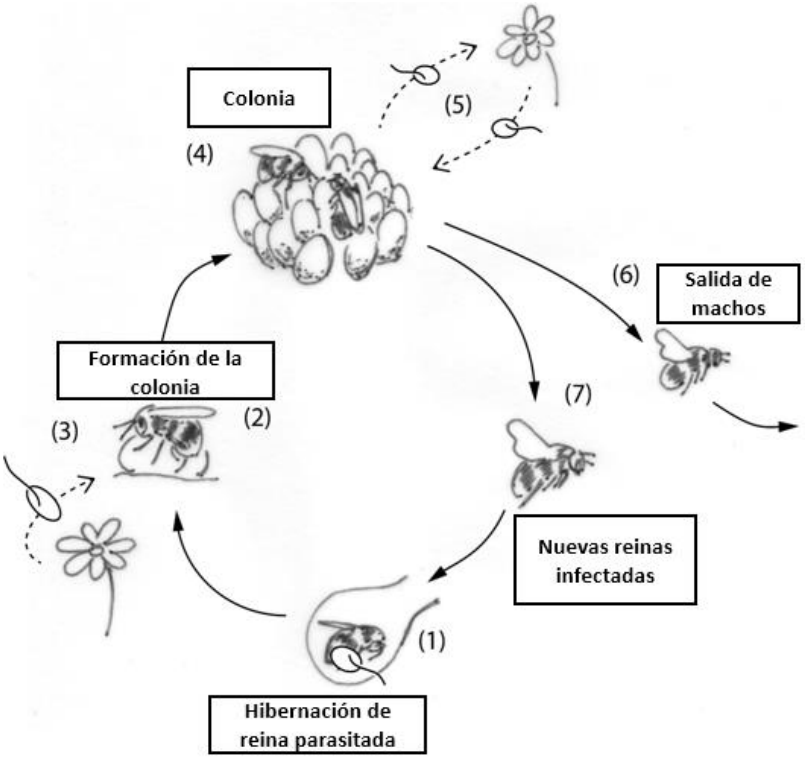


Figura 5. Esquema del ciclo de transmisión de *Crithidia bombi* en polinizadores. El parásito persiste durante la hibernación de la reina infectada (1), se mantiene al inicio de una nueva colonia (2), puede adquirirse durante el forrajeo en flores contaminadas (3 y 5), propagarse dentro de la colonia (4), acompañar la salida de machos (6) e infectar a nuevas reinas que reinician el ciclo en la siguiente temporada (7). Fuente: Adaptado de Schmid-Hempel, P., Wilfert, L., & Schmid-Hempel, R. (2019).

3.6. Epidemiología

3.6.1. Presencia de *Crithidia* en insectos hospederos

Las especies del género *Crithidia* presentan una distribución amplia y están asociadas principalmente a hospedadores invertebrados, especialmente insectos. Entre las especies más estudiadas, *Crithidia bombi* ha sido descrita en poblaciones de abejorros del género *Bombus* en América, Europa y Asia, mientras que *Crithidia mellificae* se ha reportado en abejas

melíferas (*Apis mellifera*) y en otros polinizadores silvestres y domesticados (Schmid-Hempel & Tognazzo, 2010; Schwarz et al., 2015).

Asimismo, en regiones tropicales, se han registrado aislamientos de *Crithidia spp.* en mosquitos de los géneros *Anopheles* y *Culex*, así como en otros dípteros, lo que sugiere una marcada plasticidad ecológica (Kaufer et al., 2017; Songumpai et al., 2022).

En estos hospedadores, la dispersión del parásito depende principalmente de la movilidad, el comportamiento y la dinámica poblacional de los insectos, más que de restricciones climáticas estrictas. Por ello, los insectos constituyen los hospedadores naturales conocidos y el principal componente del ciclo de transmisión de estos tripanosomátidos. Este patrón es consistente con su condición principalmente monoxénica y sirve de base para entender por qué los hallazgos en vertebrados y humanos continúan considerándose eventos inusuales dentro de su ecología (Frolov et al., 2021; Boucinha et al., 2022).

3.6.2. Implicancias epidemiológicas en vertebrados y humanos

Aunque *Crithidia* spp. se reconocen principalmente como parásitos de insectos, en los últimos años se han descrito hallazgos esporádicos en vertebrados no humanos y en muestras clínicas humanas, sobre todo en regiones endémicas de leishmaniasis. Desde el punto de vista epidemiológico, estos reportes no sustentan aún la existencia de un ciclo vertebrado bien establecido, pero sí sugieren que, bajo determinadas condiciones, algunos aislamientos podrían persistir transitoriamente en hospederos no habituales o detectarse en coinfección con otros tripanosomátidos de importancia médica (Boucinha et al., 2022; Darío et al., 2021; Rogerio et al., 2023).

La mayor parte de los reportes humanos se ha concentrado en escenarios donde existe circulación activa de *Leishmania*, como países del Medio Oriente y Sudamérica, lo que plantea una superposición epidemiológica relevante. En este contexto, la detección de

Crithidia spp. adquiere importancia no solo por su rareza, sino también por las dificultades diagnósticas que genera su similitud morfológica y cercanía filogenética con *Leishmania*. En consecuencia, parte de su interés epidemiológico reside en la posibilidad de subregistro, confusión diagnóstica o coinfección en pacientes con sospecha de leishmaniasis (Boucinha et al., 2022; Rogerio et al., 2023).

3.6.3. Factores asociados a su detección en humanos

Entre los factores propuestos para explicar la detección de *Crithidia* spp. en humanos se encuentran la inmunosupresión, la coexistencia con *Leishmania* spp., la exposición en zonas endémicas y ciertas características biológicas de algunas cepas, como su capacidad de tolerar temperaturas cercanas a 37 °C (Dedet et al., 1995; Darío et al., 2021; Boucinha et al., 2022). La inmunosupresión ha sido considerada un elemento relevante en infecciones oportunistas por tripanosomátidos monoxenos; sin embargo, también se han comunicado hallazgos en individuos inmunocompetentes, por lo que este factor no explica por sí solo todos los casos descritos.

De manera complementaria, la alteración ecológica, la presencia de reservorios silvestres y la mayor interacción entre humanos, vectores y otros hospederos en regiones endémicas podrían favorecer la ocurrencia de estos hallazgos. No obstante, hasta la fecha no existe evidencia concluyente de transmisión entre humanos ni de un ciclo vertebrado consolidado para *Crithidia* spp. Por ello, su detección en muestras humanas debe interpretarse con cautela y dentro de un contexto epidemiológico y diagnóstico amplio (Boucinha et al., 2022).

3.7. Patogenicidad

3.7.1. Efectos de la infección de *Crithidia* en insectos

Las infecciones por *Crithidia* spp. son comunes en insectos, particularmente en polinizadores, donde colonizan el intestino medio o posterior y compiten con el hospedador

por nutrientes. Esta invasión puede dañar el epitelio intestinal, reducir las reservas energéticas y alterar la respuesta inmunitaria, lo que disminuye la resistencia al estrés térmico y a otros patógenos (Chen et al., 2025).

Por ejemplo, en *Bombus spp.*, las infecciones por *Crithidia bombi* pueden afectar su fisiología y reproducción, causando retraso en el desarrollo ovárico de obreras y disminución de la fertilidad y, en casos más severos, esterilidad de reinas fundadoras (Schmid-Hempel et al., 2019). En *Apis mellifera*, la coinfección de *Crithidia mellificae* y *Lotmaria passim* se establece en el tracto digestivo y acorta la longevidad de insectos infectados. Ensayos experimentales han demostrado que estas infecciones incrementan la mortalidad de abejas en comparación con controles sanos (Schwarz et al., 2015).

Además de las alteraciones fisiológicas, la infección modifica el comportamiento de forrajeo y la capacidad cognitiva. En abejorros, *Crithidia bombi* reduce la habilidad para aprender y reconocer flores con mayor contenido de nutrientes, disminuyendo la frecuencia de visita a estas, afectando la eficiencia de recolección de néctar y polen. Se ha observado que estos efectos pueden mantenerse toda la vida del insecto, incluso si la carga parasitaria disminuye con el tiempo (Gegear et al., 2006; Chen et al., 2025).

3.7.2. Hallazgos en vertebrados no humanos

Aunque *Crithidia* spp. se reconocen principalmente como parásitos monoxénicos de insectos, en los últimos años se han descrito hallazgos en mamíferos no humanos, especialmente en Brasil, donde se ha detectado *C. mellificae* en coatíes, titíes, murciélagos, zorros cangrejeros y ocelotes (Cooper et al., 2018; Rangel et al., 2019; Darío et al., 2021). Además, algunos estudios experimentales han mostrado que esta especie puede crecer a 37 °C durante varios días e inducir respuesta inmune humoral en primates no humanos, lo que sugiere una capacidad de interacción con hospederos vertebrados. Sin embargo, estos

hallazgos aún no permiten establecer con claridad un papel patogénico definido, por lo que su relevancia biológica en vertebrados continúa en evaluación (Darío et al., 2021).

3.7.3. Evidencia de compromiso clínico por *Crithidia* en humanos

Los reportes disponibles sugieren que algunos aislamientos afines a *Crithidia* podrían estar asociados a manifestaciones clínicas persistentes o graves en humanos, especialmente en contextos de coinfección o de diagnóstico inicial de leishmaniasis. Sin embargo, la evidencia actual sigue siendo limitada y no permite establecer de manera concluyente un papel etiológico primario de *Crithidia* spp. en humanos, por lo que estos hallazgos deben interpretarse de manera crítica y en conjunto con la evidencia clínica, molecular y epidemiológica disponible (Maruyama et al., 2019; Rogerio et al., 2023).

3.8. Diagnóstico de *Crithidia* spp. en infecciones humanas

El diagnóstico de *Crithidia* spp. se inicia con métodos convencionales, como el examen directo, la coloración con Giemsa y el cultivo. Posteriormente, los métodos moleculares, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la secuenciación, permiten confirmar la identidad del parásito y contribuir a esclarecer su participación en las infecciones humanas.

3.8.1. Métodos convencionales

El primer acercamiento diagnóstico de *Crithidia* spp. aisladas de muestras humanas se basa en la microscopía y en el cultivo de los parásitos obtenidos a partir de aspirados o biopsias de lesiones cutáneas y viscerales. En esta etapa inicial se realizan los procedimientos convencionales, como la observación microscópica directa de extensiones teñidas con Giemsa, lo que permite visualizar la morfología general de los tripanosomátidos presentes en la muestra y detectar su presencia en el frotis. Sin embargo, la morfología de *Crithidia* spp. es indistinguible de la de *Leishmania* spp., de modo que estas técnicas no permiten

diferenciarlas. Por tal motivo, las muestras de pacientes con manifestaciones compatibles siguen el mismo flujo diagnóstico primario utilizado para los casos sospechosos de leishmaniasis.

Para el cultivo, se han empleado medios convencionales, como Novy–MacNeal–Nicolle (NNN) y RPMI-1640 suplementado con suero fetal bovino, que permitieron la observación de la morfología parasitaria y el análisis de su capacidad de crecimiento a diferentes temperaturas (Tannières et al., 2024). En algunos reportes también se utilizó medio líquido enriquecido como el medio Schneider suplementado con 10% de suero fetal bovino, que permitió el aislamiento del parásito y su posterior caracterización mediante frotis, examen histopatológico de biopsia cutánea y electroforesis isoenzimática (Boisseau-Garsaud, 2000).

Tanto la microscopía como el cultivo no son suficientes para el diagnóstico definitivo de *Crithidia* debido a la similitud morfológica y biológica con *Leishmania*. No obstante, continúan siendo una etapa fundamental, ya que proporcionan los aislamientos necesarios y la caracterización preliminar para el posterior análisis molecular (Boucinha et al., 2022).

3.8.2. Métodos moleculares

El uso de técnicas moleculares ha resultado fundamental para confirmar la identidad de *Crithidia* en muestras humanas. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ha sido la herramienta principal, empleando marcadores específicos como el gen de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (*GAPDH*), las regiones ribosomales (ITS1, SSU 18S) y el ADN minicircular (*kDNA*) (Kaufer et al., 2017; Podlipaev, 2001).

En el estudio de Mirzapour et al. (2019), el análisis por PCR-RFLP de la región ITS1-rDNA, complementado con análisis filogenético, permitió diferenciar aislamientos de *Crithidia fasciculata* de especies de *Leishmania* en pacientes con sospecha de leishmaniasis cutánea.

Asimismo, la secuenciación y los análisis filogenéticos han contribuido a mejorar la resolución taxonómica de tripanosomátidos morfológicamente similares, reforzando la utilidad de los enfoques moleculares en su diferenciación (Mirzapour et al., 2019; Schwarz et al., 2015; Kaufer et al., 2017).

Además, el desarrollo de PCR cuantitativa (qPCR) dirigida a blancos específicos de *Crithidia* y *Leishmania infantum* ha demostrado utilidad para detectar coinfecciones en pacientes con leishmaniasis visceral y para estimar la carga parasitaria en muestras humanas y animales (Takamiya et al., 2023). En conjunto, estos avances refuerzan la importancia de incorporar herramientas moleculares más discriminativas en el diagnóstico diferencial de tripanosomátidos en contextos clínicos complejos.

3.9. Cultivo in vitro de *Crithidia* spp.

3.9.1. Requerimientos nutricionales

Los primeros aislamientos de *Crithidia* se mantuvieron en medios complejos basados en infusiones tisulares y sangre, como el medio Rugai o el agar sangre al 40 %, que aportan proteínas, aminoácidos y factores de crecimiento esenciales (Kidder y Dutta, 1958). Posteriormente, se desarrollaron medios más estandarizados, como el Liver Infusion Tryptose (LIT), que combina triptosa, infusión de hígado, glucosa y hemina, y el medio Schneider's Drosophila Medium (SDM), ampliamente utilizado para tripanosomátidos cuando se suplementa con suero bovino (Costa et al., 2020; Tannières et al., 2024).

Kidder y Dutta (1958) demostraron que *C. fasciculata* requiere un amplio espectro de aminoácidos esenciales, siendo la treonina particularmente crítica para la multiplicación. Además, necesita fuentes exógenas de purinas como hipoxantina, adenina o nucleósidos, dado que no posee ruta de síntesis de novo. En esta especie, la glucosa constituye la principal

fuente de carbono y energía durante la fase de crecimiento exponencial, mientras que la hemina es indispensable para la síntesis de citocromos.

Asimismo, las especies de *Crithidia* dependen de diversas vitaminas del complejo B, entre ellas tiamina, riboflavina, ácido nicotínico, ácido pantoténico, piridoxal, biotina y ácido fólico, así como de pterinas como la biopterina. Para su crecimiento óptimo en medios definidos, también se requiere la adición de ácidos grasos y esteroles, que pueden incorporarse desde el suero o aportarse mediante Tween 80. En ausencia de suero, *Crithidia* sintetiza ergosterol como esterol predominante, mientras que en presencia de suero bovino fetal puede incorporar colesterol exógeno, lo que evidencia una marcada flexibilidad metabólica (Kidder y Dutta, 1958).

3.9.2. Aspectos metabólicos y fisiológicos

El metabolismo energético de *Crithidia* spp. comparte características con otros tripanosomátidos, como la glucólisis en glicosomas, que produce principalmente succinato, además de acetato y etanol (Opperdoes y Michels, 2007; Hoare y Wallace, 1966). Cuando la glucosa es escasa, el parásito activa rutas alternativas basadas en aminoácidos como glutamato y prolina, con liberación de amonio y mayor participación del ciclo de Krebs, lo que evidencia su flexibilidad metabólica (Cerone et al., 2022).

En cuanto a la síntesis de nucleótidos, *Crithidia* spp., al igual que otros tripanosomátidos, es incapaz de producir purinas de novo y depende de enzimas de rescate y transportadores para obtenerlas del hospedador (Venturelli et al., 2022). Sin embargo, conserva la enzima bifuncional dihidrofolato reductasa–timidilato sintasa (DHFR-TS), que le permite generar timidina a partir de ácido fólico, lo que resalta su dependencia de compuestos exógenos como folatos y aminoácidos (Cerone et al., 2022).

En relación con los lípidos, las especies de *Crithidia* son capaces de combinar la síntesis de ergosterol con la incorporación de esteroles externos, lo que les permite adaptarse a las condiciones del intestino de insectos, donde los nutrientes son limitados (Rodrigues et al., 2014; Cerone et al., 2022). Su superficie celular presenta glicoconjugados con D-arabinopiranosa, similares a los de *Leishmania*, que intervienen en la interacción con el hospedador y en la resistencia al estrés oxidativo (Venturelli et al., 2022).

Además, especies como *Crithidia thermophila* muestran respuestas al estrés térmico mediante la regulación de genes asociados al metabolismo energético, la protección mitocondrial y la producción de chaperonas, lo que confirma su plasticidad fisiológica y ayuda a explicar su capacidad para tolerar temperaturas cercanas a la de vertebrados (Cerone et al., 2022).

3.9.3. Crecimiento y evaluación cinética in vitro

El crecimiento in vitro de *Crithidia* spp. depende de factores bióticos y abióticos, especialmente de la disponibilidad de nutrientes, la composición del medio de cultivo y las condiciones de incubación, como la temperatura y el pH (Gómez-Moracho et al., 2020). En este contexto, Tannières et al. (2024) señalan que la evidencia experimental disponible ha permitido formular medios capaces de sostener un crecimiento eficiente y reproducible de *Crithidia,* aunque los requerimientos nutricionales específicos de este tripanosomátido aún no han sido completamente definidos.

La temperatura constituye otro factor crítico para la proliferación, ya que sus variaciones alteran la actividad enzimática y pueden provocar daño en proteínas y membranas, comprometiendo la viabilidad parasitaria (Barbosa dos Santos et al., 2025). Bajo condiciones controladas, el crecimiento de *Crithidia* spp. se puede describir mediante curvas sigmoideas que incluyen fases de latencia, crecimiento exponencial, fase estacionaria y

declive. Estas curvas se obtienen a partir de cultivos inoculados con densidades iniciales conocidas y mediante conteos celulares periódicos, lo que permite evaluar cuantitativamente la adaptación del parásito a las condiciones experimentales establecidas (Tannières et al., 2024).

En este sentido, el cultivo axénico in vitro constituye una estrategia ampliamente utilizada para la descripción, caracterización y posterior análisis molecular de tripanosomátidos. Finalmente, la evaluación cuantitativa del crecimiento se apoya en el análisis de parámetros cinéticos derivados de las curvas, como la densidad celular máxima alcanzada y el área bajo la curva (AUC), los cuales respaldan el diseño experimental del presente estudio (Popp y Lattorff, 2011).

4. HIPÓTESIS

Ho: La disponibilidad de componentes nutricionales en los medios de cultivo convencionales evaluados y las variaciones en la temperatura de incubación no ejercen un efecto significativo en la cinética de crecimiento ni en la viabilidad in vitro de *Crithidia fasciculata* aislada de muestras humanas.

H1: La disponibilidad de componentes nutricionales en los medios de cultivo convencionales evaluados permite alcanzar un crecimiento sostenido y prolonga la vida celular del parásito, mientras que el incremento de la temperatura de incubación provoca el declive temprano en todas las condiciones evaluadas del cultivo in vitro de *Crithidia fasciculata* aislada de muestras humanas.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Evaluar la cinética de crecimiento de *Crithidia fasciculata* aislada de muestras humanas en cuatro medios de cultivo convencionales bajo condiciones de laboratorio.

5.2. Objetivos específicos

- Determinar la densidad poblacional y la tasa de crecimiento de *Crithidia fasciculata* en los cuatro medios de cultivo seleccionados.
- Elaborar las curvas y tablas de crecimiento poblacional de *Crithidia fasciculata* y comparar su crecimiento entre los medios de cultivo evaluados.
- Evaluar la capacidad de mantenimiento de *Crithidia fasciculata* en los medios de cultivo mediante la comparación de la viabilidad y densidad poblacional.

6. MATERIALES

6.1. Tipo de estudio

El presente trabajo corresponde a un estudio de tipo experimental, longitudinal y comparativo, con enfoque cuantitativo. El presente estudio de investigación se realizó con el financiamiento del Centro de Investigaciones Tecnológicas, Biomédicas y Medioambientales (CITBM), en el marco de los resultados del concurso de Proyectos de Investigación Básica 2024-03, bajo el Contrato N° PE501089149-2024.

6.2. Material biológico

Se utilizaron aislamientos de *Crithidia fasciculata* pertenecientes al Centro de Investigaciones Tecnológicas, Biomédicas y Medioambientales (CITBM), donde se mantienen criopreservados en nitrógeno líquido. Estos aislamientos proceden de aspirados de pacientes con diagnóstico clínico presuntivo de leishmaniasis, recolectados en el departamento de Cusco en marzo de 2025. Para el desarrollo del estudio se empleó un aislamiento, identificado con el código *Leishmania* 30 (LES30), que se encontraba en su primer pasaje al momento de la criopreservación y recuperación para el estudio. La identificación taxonómica de los aislamientos fue realizada previamente en el CITBM y se describe en la sección correspondiente de métodos. La información relacionada con los aspectos éticos y regulatorios del uso secundario de estas muestras se encuentra relacionada al proyecto marco mencionado anteriormente, titulado: “Caracterización metagenómica de tripanosomátidos ocultos en leishmaniasis: Un enfoque innovador para el análisis de lesiones cutáneas y mucocutáneas y la identificación de coinfecciones en áreas endémicas”.

6.3. Material de laboratorio

6.3.1. Equipos de protección personal

- Mandil descartable
- Cofia
- Mascarilla quirúrgica
- Guantes de nitrilo

6.3.2. Reactivos y consumibles

- Schneider's Drosophila Medium con L-glutamina (Sigma-Aldrich, cat. N° S0146)
- Suero bovino fetal inactivado por calor (*Fetal Bovine Serum, Heat Inactivated)* (Sigma-Aldrich, cat. F4135 - 500ML)
- Hemina *(Hemin)* (Sigma-Aldrich, cat. N° H9039)
- Agar Sangre *(Blood Agar)* (Difco B45, cat. N° 245250)
- Caldo de infusión de hígado (Liver Infusion Broth / LI Broth) (HiMedia, ref. M153-500G)
- Caldo de infusión cerebro-corazón (Brain Heart Infusion Broth) (HiMedia, ref. M210-500G)
- Sangre de conejo desfibrinada (Donación institucional)
- Solución de penicilina-estreptomicina (Penicillin-Streptomycin Solution), 10 000 U de penicilina y 10 mg de estreptomicina/mL (Sigma-Aldrich, P4333-100ML)
- Solución salina tamponada con fosfato (Phosphate Buffered Saline, PBS), pH 7,4 (Sigma, cat. N.° P3813-10PAK)

- Solución de azul tripano al 0,4 % (Trypan Blue solution, 0.4%, for microscopy) (Sigma-Aldrich, cat. N.° 93595-50ML)
- Hidróxido de sodio (NaOH) (StainLab, REF SLS0220-1000)
- Ácido clorhídrico (HCl) (StainLab, REF SLS0221-1000)
- Cloruro de sodio (Sodium Chloride, NaCl) (Liofilchem srl, REF 611000)
- Cloruro de potasio (Potassium Chloride, KCl) (BBI Life Sciences, Molecular Biology Grade, cat. A610440-0500)
- Fosfato de potasio monobásico (Monopotassium Phosphate, KH2PO4) (BBI Life Sciences, Molecular Biology Grade, cat. A600445-0500)
- Fosfato de sodio dibásico (Disodium Phosphate, Na2HPO4) (BBI Life Sciences, Molecular Biology Grade, cat. A610404-0500)
- D-glucosa (D-Glucose) (Sigma-Aldrich, grado ACS, cat. N.° G8270)
- Triptosa (Tryptose) (Millipore / Sigma-Aldrich, cat. N.° 70937-500G-F)
- Metanol (Methanol) (Induquimica S. R. Ltda., cat. N.° 401)
- Dimetilsulfóxido (DMSO) (Merck / EMD Millipore, cat. N.° 317275-100ML)
- Frasco de cultivo celular estéril 25 cm² (60 mL) con filtro (SPL, código 70025)
- Unidades de filtración al vacío 150 mL (Thermo Scientific, estériles, membrana PES de 0.22 µm)
- Tips de micropipeta de 1000 µL (YongYue, estériles, con filtro, cat. YPT1000-T-F-SL)
- Tips de micropipeta de 100 µL (Bio-Seen, estériles, con filtro, cat. SGA100-L-S)

- Tips de micropipeta de 20 µL (YongYue, estériles, con filtro, cat. YPT0020-T-F-SL)
- Crioviales estériles (MIKRO, rosca externa, 2 mL)
- Pipetas serológicas estériles (SPL, código CD1K01A91025, 25 mL)

6.3.3. Equipos

- Autoclave Clase B, 45 litros (BIOBASE, modelo BKM-Z45B)
- Cabina de bioseguridad clase IIA (TELSTAR, modelo BIO II A)
- Incubador (MEMMERT, modelo INE500)
- Incubadora con CO2 (BIOBASE, modelo BJPX-C80)
- Baño maría (LABNET, modelo W 1106-230V)
- Microscopio binocular (CARL ZEISS, modelo PRIMOSTAR)
- Microscopio invertido (Cambridge Instruments, modelo PHOTOZOOM)
- Balanza analítica (ACCULAB, modelo ATL-224-I)
- Refrigeradora 4-8 °C (BIOBASE, modelo BPR-5V468)
- Congeladora -20 °C (FRIGIDAIRE, modelo FFFU-14M1QW)
- Ultracongeladora -80 °C (HAIER, modelo DW-86L729BPT)
- Destilador de agua (NUVE, modelo ND 4)
- pHmetro (HANNA, modelo HI98130)
- Termoagitador (NEUATION, modelo iSTIR HP320)
- Pipeteador automático (BRAND, modelo Accu Jet Pro)
- Micropipetas de 2-20 µL (Eppendorf)
- Micropipetas de 50-200 µL (PIPPET 4U)
- Micropipetas de 100-1000 µL (Eppendorf)
- Cámara de Neubauer (Marienfeld-Superior, modelo Neubauer-improved, REF 06 100 30)

- Matraz de 500 mL
- Probeta de 150 mL
- Beaker de 150 mL
- Tubos de vidrio de 16 x 100 mm

6.3.4. Otros

- Agua destilada
- Nitrógeno líquido
- Material de limpieza y desinfección en laboratorio (Alcohol al 70 %, hipoclorito de sodio, papel toalla)
- Material para descarte de material biocontaminado (Bolsas rojas de bioseguridad, recipientes para material punzocortante)
- Material de escritorio (Cuadernos, plumones indelebles, etiquetas, cinta masking tape, papel bond)

7. MÉTODOS

7.1. Identificación taxonómica de los aislamientos

El aislamiento *Leishmania* N°30 (LES30) fue identificado previamente en el Centro de Investigaciones Tecnológicas, Biomédicas y Medioambientales (CITBM) como *Crithidia fasciculata* mediante análisis bioinformático de secuencias de genoma completo con Kraken2 (Wood et al., 2019).

Las lecturas obtenidas pasaron inicialmente por un control de calidad y trimado, para luego proceder con su clasificación taxonómica utilizando la base de datos de referencia para el grupo *Protozoa*. Para obtener una mejor clasificación, se añadió a la base de datos inicial los genomas de parásitos adicionales (Tabla 2).

Tabla 2. Secuencias genómicas complementarias agregadas a la base de datos *Protozoa* del software Kraken 2

Especie	Cepa	Aislado	Accesión de Bioproject	Accesión de Ensamblado
Crithidia fasciculata	Cf-Cl	-	PRJNA165885	GCA_000331325.2
Crithidia sp.	LVH-60A	-	PRJNA940846	GCA_030078075.1
Leishmania braziliensis	MHOM/BR/75/M2903	-	PRJNA165955	GCA_000340355.2
Leishmania peruviana	-	LEM-1537	PRJEB7263	GCA_001403695.1
Leishmania peruviana	-	PAB-4377	PRJEB7263	GCA_001403675.1
Leishmania guyanensis	M4147	-	PRJNA872130	GCA_024970365.1
Leishmania shawi	ERC000039	MCEB/BR/1984/M8408	PRJEB64591	GCA_962240455.1
Leishmania lainsoni	216-34	-	PRJNA484340	GCA_003664395.1
Leishmania naiffi	ERC000039	MDAS/BR/1979/M5533	PRJEB64591	GCA_962239345.1

Especie	Cepa	Aislado	Accesión de Bioproject	Accesión de Ensamblado
Leishmania linderbergi	ERC000039	MHOM/BR/1966/M15733	PRJEB64591	GCA_962240435.1
Leishmania utingensis	ERC000039	ITUB/BR/1977/M4964	PRJEB64591	GCA_962240445.1

7.2. Obtención, procesamiento y reactivación de los aislamientos

Se seleccionó un vial criopreservado correspondiente al aislamiento LES30, priorizándolo por su mayor concentración de formas parasitarias reportada durante su almacenamiento. El vial fue extraído del tanque de nitrógeno líquido y descongelado en baño maría a 25 °C. Posteriormente, los parásitos fueron lavados mediante centrifugación a 2500 × g durante 10 minutos, repitiendo el procedimiento tres veces. Después de cada centrifugación, el pellet fue resuspendido en solución salina tamponada con fosfato (PBS) estéril. Estas etapas correspondieron al acondicionamiento inicial orientado a la recuperación del aislamiento antes de su establecimiento en cultivo.

A partir de la suspensión final se tomó una alícuota para preparar un extendido en portaobjetos con tinción Giemsa y otra para el recuento celular en cámara de Neubauer. Posteriormente, el aislamiento fue sembrado en un cultivo madre de recuperación en Schneider's Drosophila Medium suplementado con 10 % de suero bovino fetal, e incubado a 26 °C. Tras tres días de incubación, se evaluó la recuperación y proliferación inicial del aislamiento LES30, el cual presentó un crecimiento favorable para los ensayos posteriores (Teufel y dos Santos, 2024).

7.3. Preparación del extendido y tinción con Giemsa

El extendido se preparó a partir de una alícuota de la suspensión final obtenida tras el procesamiento de los viales criopreservados. Para ello, se dispensaron 50 µL de la suspensión sobre una lámina portaobjeto previamente limpiada y rotulada. El extendido se

dejó secar a temperatura ambiente y, una vez seco, la lámina se colocó en una bandeja de coloración.

La fijación de la lámina se realizó cubriendo completamente el área del extendido con metanol absoluto durante 3 minutos. Posteriormente, la lámina se colocó en posición vertical en un frasco Coplin y el extendido se cubrió en su totalidad con la solución de trabajo de Giemsa durante 25 minutos, siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Después de la tinción, el exceso de colorante se eliminó mediante un lavado suave con un chorro de agua corriente durante 1 a 2 minutos, evitando el contacto directo con la superficie teñida. Finalmente, la lámina se dejó secar en posición vertical sobre una gradilla, para luego proceder a la observación microscópica.

7.4. Observación microscópica de las formas parasitarias

La lámina teñida se colocó en la platina del microscopio y se agregó una gota de aceite de inmersión sobre la muestra. Posteriormente, se revisaron entre 100 y 200 campos del frotis para examinar la morfología de las formas parasitarias presentes. La observación microscópica permitió verificar la presencia predominante de formas compatibles con coanomastigotes, así como células con morfología conservada y algunas formas en división. Esta evaluación se utilizó como criterio morfológico complementario para confirmar la recuperación del aislamiento tras el procesamiento inicial.

7.5. Recuento inicial de formas parasitarias en cámara de Neubauer

Se tomó una alícuota de 10 µL de la suspensión parasitaria y se colocó en la cámara de Neubauer. El recuento se realizó al microscopio con un aumento de 400×, contabilizando las formas celulares presentes en los cuatro cuadrados grandes de la retícula. Posteriormente, se

obtuvo el promedio de los conteos y se aplicó la siguiente fórmula para determinar la concentración de parásitos:

$$\text{Parásitos/mL} = \text{promedio de conteo en 4 cuadrantes} \times 10^4 \times \text{Fd}$$

donde 10^4 corresponde al factor de conversión del volumen de la cámara y Fd al factor de dilución, cuando este fue aplicado. El valor obtenido se consideró como la densidad celular del cultivo, expresada en parásitos/mL.

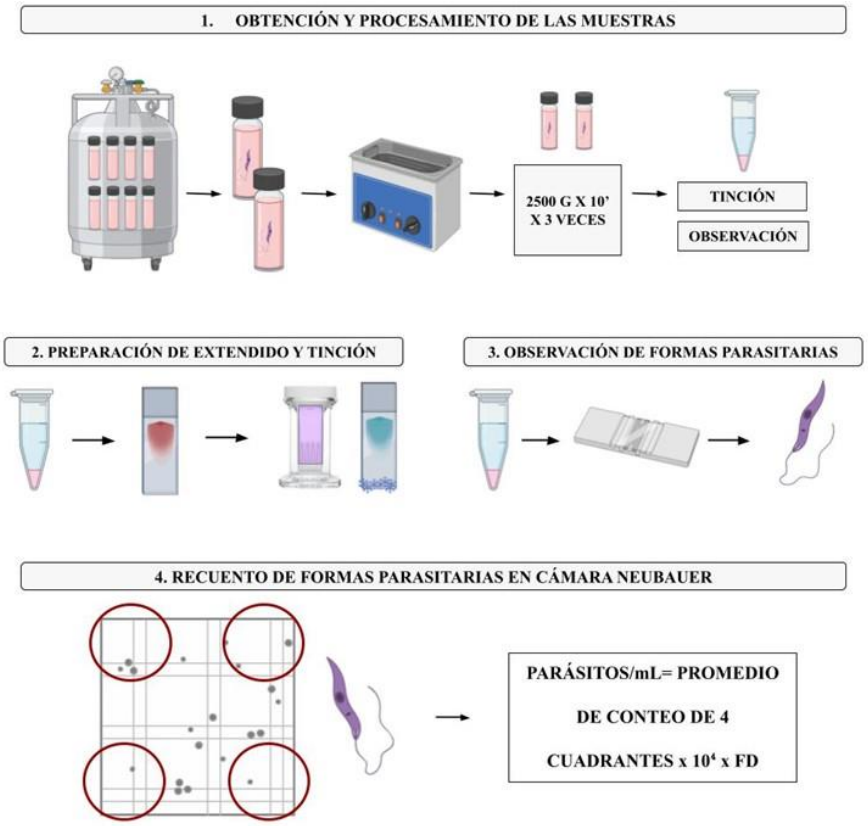


Figura 6. Flujograma metodológico del procesamiento inicial, preparación del extendido, tinción con Giemsa, observación microscópica y recuento inicial en cámara de Neubauer de *Crithidia fasciculata*. Fuente: Elaboración propia.

7.6. Criopreservación de alícuotas de trabajo y preparación del inóculo experimental

Con base en el recuento inicial obtenido, se calculó el volumen de suspensión parasitaria necesario para inocular un frasco de cultivo celular de 25 cm² que contenía 10 mL de Schneider's Drosophila Medium suplementado con 10 % de suero bovino fetal, de modo que la densidad inicial del cultivo madre se estableciera en 1×10^6 parásitos/mL, valor coherente con densidades de inicio empleadas en estudios de crecimiento y subcultivo de kinetoplástidos cultivados in vitro (Cunha et al., 2013; Santarem et al., 2012). A partir de este cultivo madre se prepararon alícuotas criopreservadas de trabajo con concentración conocida, con el fin de estandarizar el punto de partida biológico de las distintas corridas experimentales. Para ello, la suspensión parasitaria se distribuyó en crioviales que contenían una mezcla crioprotectora compuesta por 900 µL de suero bovino fetal y 100 µL de DMSO, proporción concordante con formulaciones de criopreservación empleadas en kinetoplástidos (Teufel y dos Santos, 2024; Martinez et al., 2022).

Cuando correspondió iniciar una nueva corrida experimental, se empleó una alícuota de trabajo derivada del cultivo madre, la cual fue reactivada en Schneider's Drosophila Medium suplementado con 10 % de suero bovino fetal e incubada a 26 °C. Tras tres días de incubación, se tomó una alícuota del cultivo reactivado para el recuento celular y, con base en este, se calculó el volumen necesario para inocular los medios experimentales con una densidad inicial de 1×10^6 parásitos/mL en 10 mL. De este modo, los ensayos se iniciaron a partir de inóculos estandarizados obtenidos del aislamiento previamente recuperado en cultivo, con el fin de reducir la variabilidad entre corridas asociada al estado inicial del cultivo.

7.7. Medios de cultivo

Se utilizaron los medios de cultivo USAMRU (USM), Schneider's Drosophila Medium (SDM), Liver Infusion Tryptose (LIT) y Brain Heart Infusion modificado (BHI). La preparación de los medios se realizó siguiendo los protocolos correspondientes. Los procedimientos detallados de preparación se presentan en el Anexo 1.

7.8. Cinética de crecimiento

Cada 48 horas se extrajo una alícuota de 10 µL de cultivo para realizar el conteo celular. El seguimiento de la curva de crecimiento se mantuvo hasta un máximo de 15 días, dependiendo de la capacidad del medio para sostener la proliferación de las formas parasitarias.

Los cultivos fueron evaluados mediante conteos cada 48 horas durante 15 días, lo que permitió construir curvas de crecimiento completas y calcular parámetros resumen, como el pico de crecimiento, el área bajo la curva (AUC) y el día del pico.

7.9. Determinación de la viabilidad de los cultivos

Cada 48 horas se tomó una alícuota de 10 µL de cultivo para evaluar la viabilidad celular mediante la tinción con azul de tripán, según las recomendaciones de Strober (2015). Las células viables e inviables fueron diferenciadas por microscopía óptica y cuantificadas.

7.10. Análisis estadístico del crecimiento de *Crithidia* en los medios de cultivo

El análisis estadístico se realizó para evaluar el efecto de los factores experimentales sobre los datos obtenidos del seguimiento longitudinal del crecimiento y la viabilidad de *Crithidia fasciculata.* Se utilizó una estrategia que combinó medidas resumen y modelos para el análisis de datos repetidos.

7.10.1. Variables analizadas

Variables dependientes. Se definieron como variables de respuesta aquellas que reflejan el desempeño biológico de *Crithidia fasciculata* en cada condición experimental:

- Densidad celular (parásitos/mL): Se obtuvo a partir de los recuentos en cámara de Neubauer, calculada según la fórmula descrita, y considerada como una medida directa de la proliferación parasitaria en cada tiempo de muestreo.
- Viabilidad celular (%): Estimada mediante la tinción con azul de tripán, a partir de la proporción de parásitos viables respecto del total observado en cada alícuota. Esta variable expresa la capacidad de los cultivos para mantener células vivas a lo largo del tiempo.
- Pico de crecimiento: Expresado como la máxima densidad celular (parásitos/mL) registrada en la curva de crecimiento de cada combinación medio–temperatura. Este parámetro resume la capacidad máxima de proliferación alcanzada por el parásito bajo cada condición.
- Área bajo la curva (AUC): Obtenida a partir de los recuentos seriados de parásitos/mL para cada combinación medio–temperatura. Se empleó como una medida resumen del crecimiento acumulado, permitiendo comparar la eficiencia de los medios de cultivo en términos de producción de biomasa parasitaria.

Variables independientes. Se consideraron los siguientes factores experimentales como variables explicativas del estudio:

- Medio de cultivo: Presentó cuatro niveles (BHI, LIT, SDM, USM), que varían en su composición nutricional y en el tipo de fase, ya sea monofásico o bifásico.

- Temperatura de incubación: Presentó tres niveles (25, 26 y 27 °C), seleccionados en función del rango térmico reportado como óptimo para el crecimiento de tripanosomátidos.
- Tiempo de cultivo: Expresado en días, con mediciones realizadas cada 48 horas hasta el día 15. Generó series de datos longitudinales para cada combinación medio–temperatura–réplica.

7.10.2. Transformación y preparación de los datos

Los conteos celulares y las medidas derivadas de ellos, pico de crecimiento y área bajo la curva, presentaron una distribución asimétrica y valores de dispersión que aumentaban con la media. Asimismo, los porcentajes de viabilidad se mantuvieron dentro del rango comprendido entre 0 y 100 %, con varianza dependiente de la media. Con el fin de cumplir los supuestos de normalidad y homocedasticidad requeridos por los modelos paramétricos, se realizaron las siguientes transformaciones:

- Los valores de densidad celular (parásitos/mL) y las áreas bajo la curva (AUC) se transformaron mediante el logaritmo natural (ln), obteniendo las variables ln(conteo), lnPico y lnAUC. Esta transformación permitió disminuir la asimetría, estabilizar la variabilidad y aproximar los datos a una distribución normal en las diferentes combinaciones de medio y temperatura.
- Los porcentajes de viabilidad se transformaron mediante la función arcoseno de la raíz cuadrada de la proporción ($\arcsin\sqrt{p}$), donde p corresponde a la fracción de células viables, en un rango 0–1. Esta transformación permitió estabilizar la variabilidad y disminuyó el efecto de los valores extremos cercanos a 0 o 100 %.
- Las transformaciones se aplicaron antes del ajuste de los modelos de análisis de varianza y de los modelos lineales mixtos. Los valores descriptivos como medias y

desviaciones estándar reportados se presentaron en la escala original, mientras que los análisis inferenciales se basaron en las variables transformadas.

7.10.3. Análisis de varianza (ANOVA) de dos vías

Para evaluar el efecto de los factores experimentales, medio y temperatura, sobre las medidas resumen del crecimiento, ln(Pico) y ln(AUC), se llevó a cabo un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías, considerando ambos factores como efectos fijos.

Se construyeron modelos separados para cada variable de respuesta transformada. En cada modelo se incluyeron como términos principales el medio de cultivo y la temperatura, así como el término de interacción entre ambos factores. Se verificó el cumplimiento de los supuestos estadísticos de normalidad de los residuos y homogeneidad de varianzas, revisando los gráficos de residuos y aplicando pruebas estadísticas. Una vez confirmados los supuestos, se procedió al cálculo de los valores de F, sus correspondientes valores de p, y el tamaño del efecto (η^2 parcial), para estimar qué parte de la variación se debe a cada factor y a su interacción.

El nivel de significancia estadística se estableció en $\alpha = 0,05$. Cuando se encontraron efectos principales o interacciones significativas, se interpretaron junto con las tendencias de las curvas de crecimiento y los resultados de los modelos mixtos, con el objetivo de ofrecer una comprensión completa del comportamiento de *Crithidia fasciculata* bajo las distintas condiciones de medio y temperatura.

7.10.4. Modelos lineales mixtos para datos longitudinales

Los datos de densidad celular y viabilidad correspondieron a medidas repetidas en el tiempo dentro de cada frasco de cultivo (réplica), por lo que no fueron considerados como observaciones independientes. Para representar correctamente la relación entre las réplicas

y usar toda la información obtenida durante los 15 días de seguimiento, se ajustaron modelos lineales mixtos estimados con máxima verosimilitud restringida (REML).

En el caso del crecimiento, el modelo se ajustó sobre el logaritmo del conteo celular y se tomó como efectos fijos el medio de cultivo, la temperatura y, cuando se requirió, el tiempo de incubación y sus interacciones de primer orden. Adicionalmente, se agregó un intercepto aleatorio para cada réplica, a fin de reconocer que los frascos podían presentar diferencias en su nivel inicial de densidad celular debido a variaciones no controladas en la siembra o en las condiciones de cultivo.

La estructura general del modelo se resumió de la siguiente manera:

$$\ln(\text{conteo}) = \beta_0 + \beta(\text{Medio}) + \beta(\text{Temperatura}) + \beta(\text{Tiempo}) + \beta(\text{interacciones}) + u_0[\text{réplica}] + \varepsilon$$

Donde β_0 representa el intercepto fijo, β los coeficientes asociados a los factores experimentales, u_0[réplica] el efecto aleatorio de cada frasco, que se tomó con distribución normal de media cero y varianza σ^2_u, y ε el término de error residual, con varianza σ^2_e. La significancia de los efectos fijos se determinó mediante pruebas de razón de verosimilitud (χ^2), comparando modelos anidados para evaluar si la incorporación de un factor aportaba una mejora real al modelo. Asimismo, se calcularon criterios de información AIC y BIC para valorar la calidad del ajuste.

Para el análisis de viabilidad, se realizó un procedimiento similar, ajustando modelos mixtos sobre los valores transformados $\arcsin\sqrt{p}$, con medio, temperatura, día y sus interacciones como efectos fijos y réplica como efecto aleatorio.

Las medias ajustadas obtenidas a partir de los modelos mixtos para días específicos de incubación se utilizaron para comparar el rendimiento de los medios y temperaturas en puntos clave del ensayo. Los contrastes pareados entre condiciones experimentales se interpretaron de manera descriptiva, dando prioridad a la coherencia biológica y la concordancia con los resultados del ANOVA y con las curvas de crecimiento y viabilidad.

7.10.5. Software y criterios de significancia

Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el paquete Stata 19 SE (StataCorp LLC, College Station, TX, EE.UU.). El nivel de significancia se estableció en $\alpha = 0,05$ para todas las pruebas.

8. RESULTADOS

Se evaluó el crecimiento y la viabilidad de *Crithidia fasciculata* en los medios de cultivo SDM, BHI, LIT y USAMRU, a 25, 26 y 27 °C, con tres réplicas para cada combinación de medio y temperatura. Los recuentos de parásitos y los registros de viabilidad se realizaron cada 48 horas hasta el día 15. Con los datos obtenidos se construyeron curvas de crecimiento y viabilidad, y se calcularon indicadores resumen como el pico máximo, el área bajo la curva (AUC) y el día de mayor crecimiento. Asimismo, se aplicaron modelos estadísticos para evaluar el efecto del medio de cultivo, la temperatura y el tiempo sobre ambas variables.

8.1. Crecimiento de *Crithidia fasciculata* en medios de cultivo y a diferentes temperaturas

Las curvas de crecimiento de *Crithidia fasciculata* mostraron patrones distintivos según el medio de cultivo y la temperatura. En el medio BHI se observaron picos tempranos de alta densidad, seguidos por una disminución marcada en etapas posteriores. Por su parte, el medio LIT mostró un crecimiento más sostenido, alcanzando picos en días intermedios y mantenimiento de densidades elevadas durante un mayor intervalo de tiempo. El medio SDM presentó un comportamiento intermedio, con picos de magnitud moderada y una reducción progresiva posterior. El medio USAMRU, en contraste, presentó un comportamiento más irregular, con picos tempranos de menor amplitud y variaciones posteriores en la densidad celular.

8.1.1. Crecimiento de *Crithidia fasciculata* a temperatura de 25 °C

A 25 °C, la cinética de crecimiento de *C. fasciculata* evidenció diferencias significativas según el medio de cultivo evaluado (Figura 7, Tabla 3). En el medio BHI, se observó un crecimiento inicial rápido que alcanzó su máxima densidad celular en el día 2, con un promedio de $8{,}23 \times 10^7 \pm 4{,}01 \times 10^6$ parásitos/mL. A partir de este punto, la densidad

poblacional disminuyó de forma drástica. Hacia la fase final del seguimiento, entre los días 10 y 15, los recuentos se estabilizaron numéricamente en 10 000 parásitos/mL. Sin embargo, este valor no representa una persistencia biológica del parásito, sino que corresponde al límite inferior de cuantificación de la cámara de Neubauer. Dado que en estos mismos días la viabilidad celular registrada fue del 0,0%, las formas cuantificadas en este rango basal correspondían a detritos celulares o población inviable.

En el medio LIT, el crecimiento se sostuvo durante más tiempo, alcanzando su pico máximo en el día 6 con una densidad de $8{,}22 \times 10^7 \pm 2{,}25 \times 10^6$ parásitos/mL. Además, este medio registró el mayor crecimiento acumulado, evidenciado por un área bajo la curva (AUC) de $6{,}31 \times 10^8 \pm 3{,}53 \times 10^6$, el más alto entre las condiciones evaluadas a esta temperatura.

Por su parte, el medio SDM mostró un comportamiento intermedio, alcanzando su pico de densidad en el día 4 con $6{,}16 \times 10^7 \pm 2{,}06 \times 10^6$ parásitos/mL. Su crecimiento global, estimado mediante el AUC de $3{,}62 \times 10^8 \pm 8{,}76 \times 10^6$, fue inferior al observado en el medio LIT.

Finalmente, el medio USAMRU registró un primer pico en el día 2 con $5{,}12 \times 10^7 \pm 2{,}04 \times 10^6$ parásitos/mL y un repunte tardío hacia el día 10, alcanzando una densidad secundaria de $3{,}14 \times 10^7 \pm 6{,}76 \times 10^6$ parásitos/mL. Este medio evidenció inestabilidad a lo largo del tiempo evaluado, presentando un AUC de $3{,}83 \times 10^8 \pm 2{,}51 \times 10^7$.

Tabla 3. Parámetros cinéticos de *Crithidia fasciculata* a 25 °C en diferentes medios de cultivo.

Medio de cultivo	Día del pico	Densidad máxima (parásitos/mL)	Área bajo la curva (AUC)
BHI	2	$8{,}23 \times 10^7 \pm 4{,}01 \times 10^6$	$3{,}26 \times 10^8 \pm 1{,}53 \times 10^7$
LIT	6	$8{,}22 \times 10^7 \pm 2{,}25 \times 10^6$	$6{,}31 \times 10^8 \pm 3{,}53 \times 10^6$
SDM	4	$6{,}16 \times 10^7 \pm 2{,}06 \times 10^6$	$3{,}62 \times 10^8 \pm 8{,}76 \times 10^6$
USAMRU	2*	$5{,}12 \times 10^7 \pm 2{,}04 \times 10^6$	$3{,}83 \times 10^8 \pm 2{,}51 \times 10^7$

*Los valores se expresan como media ± desviación estándar de 3 réplicas biológicas.

*El medio USAMRU presentó un pico máximo inicial en el día 2 y un repunte secundario hacia el día 10.

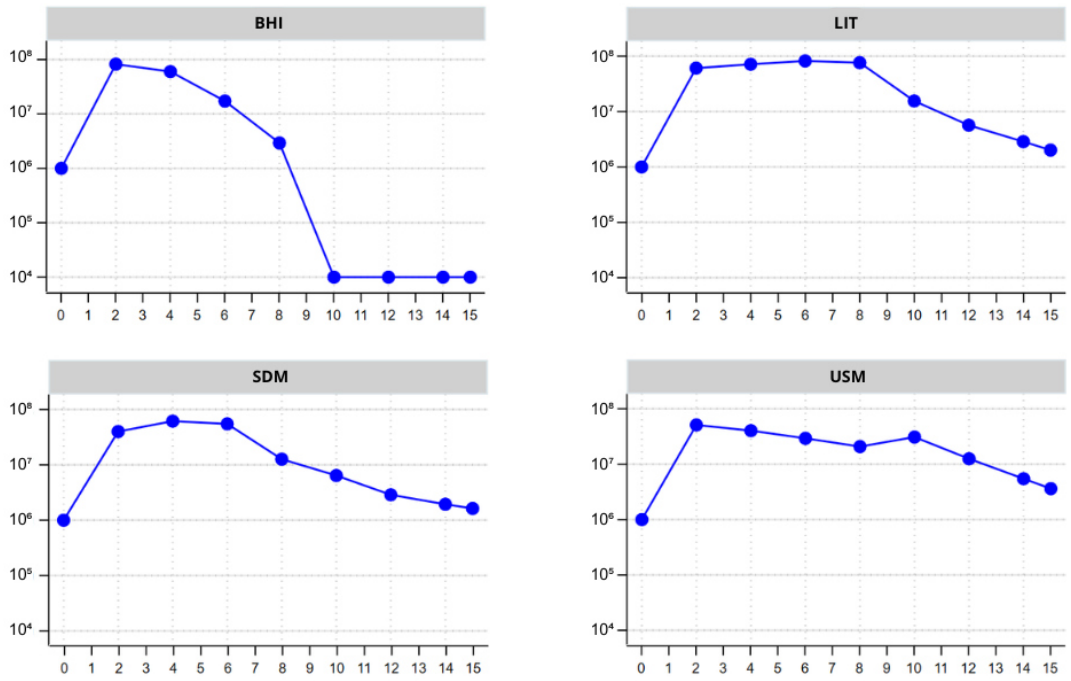


Figura 7. Curvas de crecimiento de Crithidia fasciculata en los medios BHI, LIT, SDM y USAMRU a 25 °C durante 15 días.

8.1.2. Crecimiento de *Crithidia fasciculata* a temperatura de 26 °C

A 26 °C, se presentó un incremento general en la intensidad del crecimiento parasitario en comparación con 25 °C para la mayoría de las condiciones (Figura 8, Tabla 4). En el medio BHI, se observó un crecimiento acelerado que alcanzó su pico en el día 4, exhibiendo la mayor densidad celular registrada en todo el ensayo, que fue $1{,}19 \times 10^8 \pm 1{,}55 \times 10^7$ parásitos/mL. Este medio también generó el mayor crecimiento acumulado, con un AUC de $5{,}15 \times 10^8 \pm 2{,}39 \times 10^7$. Posteriormente, la población experimentó un declive sostenido.

El medio LIT exhibió un patrón de crecimiento estable pero menos intenso, alcanzando su pico máximo también en el día 4 con $7{,}67 \times 10^7 \pm 3{,}21 \times 10^6$ parásitos/mL y un AUC de $4{,}34 \times 10^8 \pm 9{,}26 \times 10^6$.

El medio SDM experimentó una caída notable en su rendimiento comparado con la temperatura anterior, alcanzando su máxima densidad en el día 4 con $1{,}60 \times 10^7 \pm 7{,}35 \times 10^5$ parásitos/mL y un AUC de $1{,}26 \times 10^8 \pm 5{,}93 \times 10^6$.

En contraste, el medio USAMRU confirmó su inestabilidad y falta de reproducibilidad en etapas posteriores del cultivo. Aunque logró un pico inicial en el día 2 con $2{,}56 \times 10^7 \pm 1{,}23 \times 10^6$ parásitos/mL, las réplicas mostraron un comportamiento altamente irregular en los días siguientes. Esta dispersión extrema se reflejó en el crecimiento acumulado global, con un AUC de $1{,}88 \times 10^8 \pm 1{,}11 \times 10^8$.

Tabla 4. Parámetros cinéticos de *Crithidia fasciculata* a 26 °C en diferentes medios de cultivo.

Medio de cultivo	Día del pico	Densidad máxima (parásitos/mL)	Área bajo la curva (AUC)
BHI	4	$1{,}19 \times 10^8 \pm 1{,}55 \times 10^7$	$5{,}15 \times 10^8 \pm 2{,}39 \times 10^7$
LIT	4	$7{,}67 \times 10^7 \pm 3{,}21 \times 10^6$	$4{,}34 \times 10^8 \pm 9{,}26 \times 10^6$
SDM	4	$1{,}60 \times 10^7 \pm 7{,}35 \times 10^5$	$1{,}26 \times 10^8 \pm 5{,}93 \times 10^6$
USAMRU	2*	$2{,}56 \times 10^7 \pm 1{,}23 \times 10^6$	$1{,}88 \times 10^8 \pm 1{,}11 \times 10^8$

*Los valores se expresan como media ± desviación estándar de 3 réplicas biológicas.

*El medio USAMRU presentó un pico inicial en el día 2 y un repunte secundario hacia el día 8.

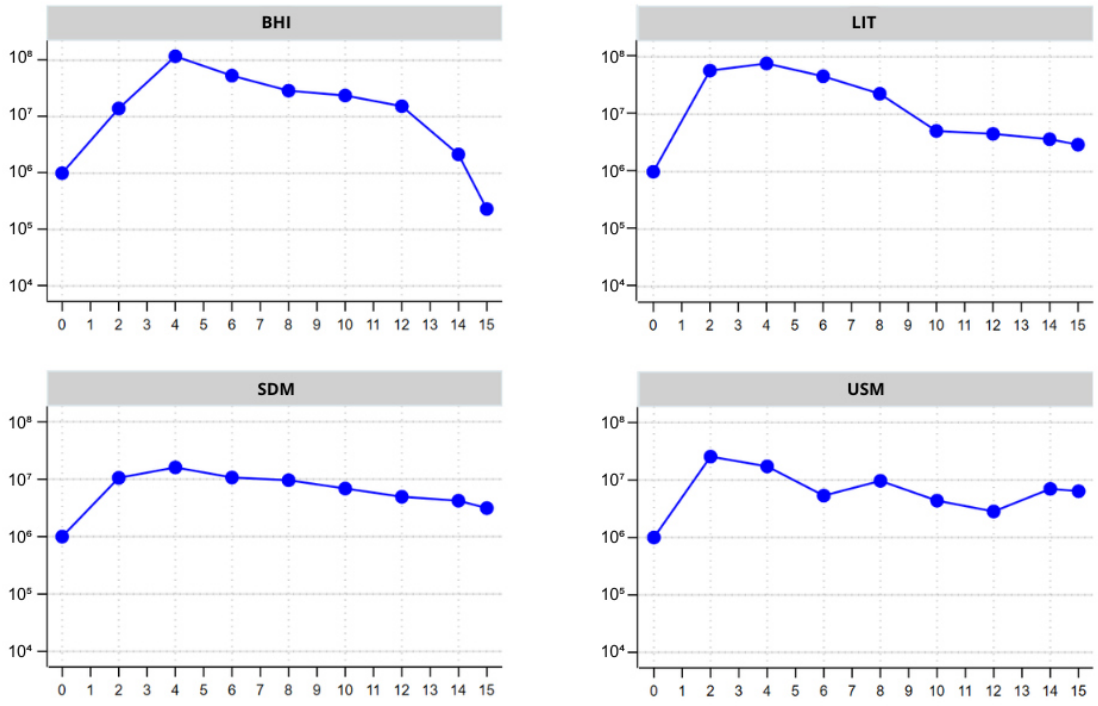


Figura 8. Curvas de crecimiento de *Crithidia fasciculata* en los medios BHI, LIT, SDM y USAMRU a 26 °C durante 15 días.

8.1.3. Crecimiento de *Crithidia fasciculata* a temperatura de 27 °C

A 27 °C, las curvas de crecimiento evidenciaron un marcado estrés térmico, caracterizado por un rápido incremento de la densidad celular que alcanzó su pico en el día 2 para todos los medios evaluados, seguido de un declive drástico (Figura 9, Tabla 5). El medio BHI registró la densidad inicial más alta con $1{,}02 \times 10^8 \pm 6{,}51 \times 10^6$ parásitos/mL. Sin embargo, experimentó una caída abrupta, estabilizándose numéricamente en 10 000 parásitos/mL desde el día 6 hasta el final del seguimiento. Como se mencionó anteriormente, este valor corresponde al límite inferior de detección metodológico.

El medio LIT logró un pico temprano de $7{,}37 \times 10^7 \pm 1{,}38 \times 10^6$ parásitos/mL, pero su crecimiento poblacional global, representado con un AUC de $2{,}47 \times 10^8 \pm 3{,}74 \times 10^6$, se redujo drásticamente en comparación a las temperaturas inferiores.

El medio SDM alcanzó un pico inicial de $6{,}25 \times 10^7 \pm 2{,}31 \times 10^6$ parásitos/mL. Aunque reportó el AUC promedio más alto para esta temperatura, siendo $3{,}37 \times 10^8 \pm 4{,}67 \times 10^6$, la densidad celular descendió continuamente en los días posteriores sin presentar estabilidad en los recuentos.

Finalmente, el medio USAMRU presentó nuevamente un bajo rendimiento, con un pico temprano de $3{,}20 \times 10^7 \pm 4{,}61 \times 10^5$ parásitos/mL y un AUC de $1{,}53 \times 10^8 \pm 6{,}92 \times 10^6$, ratificando su ineficiencia para promover el crecimiento bajo condiciones de estrés térmico sostenido.

Tabla 5. Parámetros cinéticos de Crithidia fasciculata a 27 °C en diferentes medios de cultivo.

Medio de cultivo	Día del pico	Densidad máxima (parásitos/mL)	Área bajo la curva (AUC)
BHI	2	$1{,}02 \times 10^8 \pm 6{,}51 \times 10^6$	$3{,}22 \times 10^8 \pm 1{,}39 \times 10^7$
LIT	2	$7{,}37 \times 10^7 \pm 1{,}38 \times 10^6$	$2{,}47 \times 10^8 \pm 3{,}74 \times 10^6$
SDM	2	$6{,}25 \times 10^7 \pm 2{,}31 \times 10^6$	$3{,}37 \times 10^8 \pm 4{,}67 \times 10^6$
USAMRU	2	$3{,}20 \times 10^7 \pm 4{,}61 \times 10^5$	$1{,}53 \times 10^8 \pm 6{,}92 \times 10^6$
*Los valores se expresan como media ± desviación estándar de 3 réplicas biológicas.			

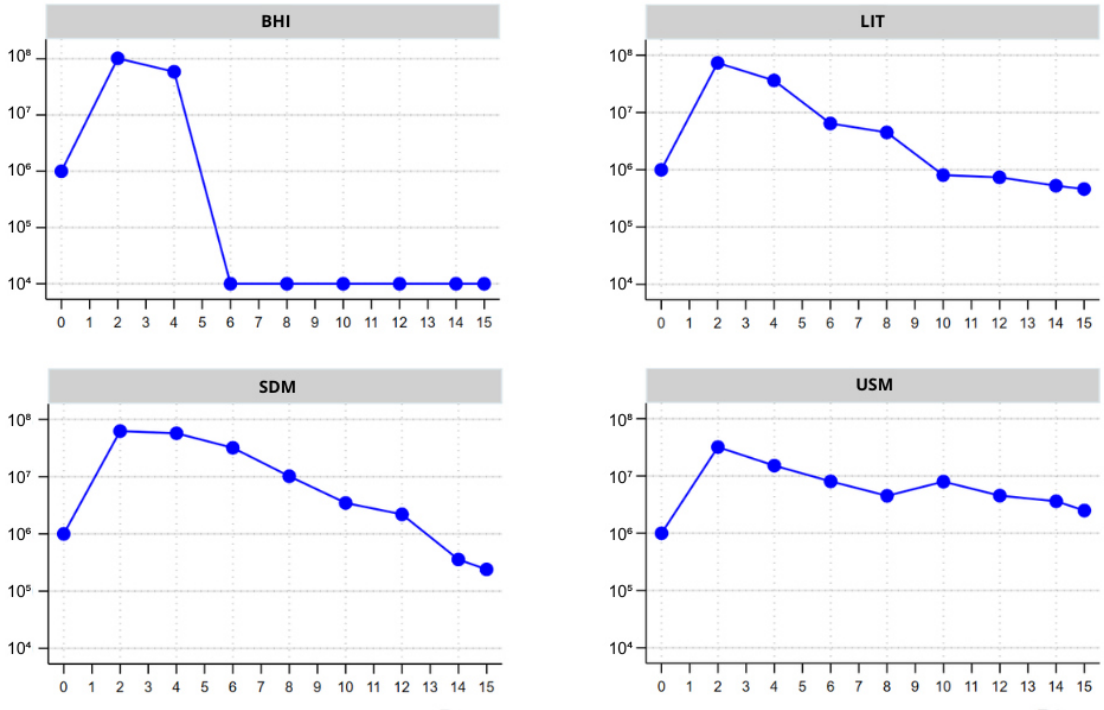


Figura 9. Curvas de crecimiento de *Crithidia fasciculata* en los medios BHI, LIT, SDM y USAMRU a 27 °C durante 15 días.

8.2. Viabilidad de *Crithidia fasciculata* en medios de cultivo y a diferentes temperaturas

Los registros de viabilidad celular mostraron una tendencia general de valores iniciales altos y una disminución progresiva con el tiempo en todas las combinaciones de medio y temperatura, que se relacionó al envejecimiento del cultivo y la acumulación de metabolitos. La viabilidad inicial, día 0, fue del 100% en todos los frascos.

8.2.1. Viabilidad de *Crithidia fasciculata* a temperatura de 25 °C

A 25 °C, se observaron diferencias entre medios en la conservación de la viabilidad a lo largo del tiempo (Figura 10, Tabla 6). En el medio BHI, la viabilidad fue alta al inicio, con un valor de 96,8 % al día 2. Sin embargo, disminuyó rápidamente a partir del día 4, cayendo a 26,2% en el día 6 y alcanzando un 0,0% en el día 10, manteniéndose nula hasta el final del ensayo.

En el medio LIT, se mantuvieron proporciones altas de células viables durante la primera mitad del seguimiento, con valores de 88,6 % al día 2 y 81,9 % al día 4. Posteriormente, se registraron descensos progresivos, cayendo a 18,9 % en el día 10, hasta finalizar con un 3,1 % en el día 15.

El medio SDM mantuvo los porcentajes más altos de viabilidad a lo largo del ensayo, con 100,0 % en el día 2, 99,0 % en el día 4, 88,7 % en el día 6 y 46,4 % en el día 10. Luego, exhibió una reducción lenta hasta cerrar con un 19,6 % de células viables en el día 15.

Por el contrario, el medio USAMRU evidenció una disminución temprana, con un valor de 93,0% en el día 2 y 82,3% en el día 4. A partir de ese punto, presentó reducciones drásticas, con un valor de 31,7 % en el día 6 y a 13,7 % en el día 10. En los días posteriores, la viabilidad continuó cayendo hasta llegar a 2,9 % en el día 15.

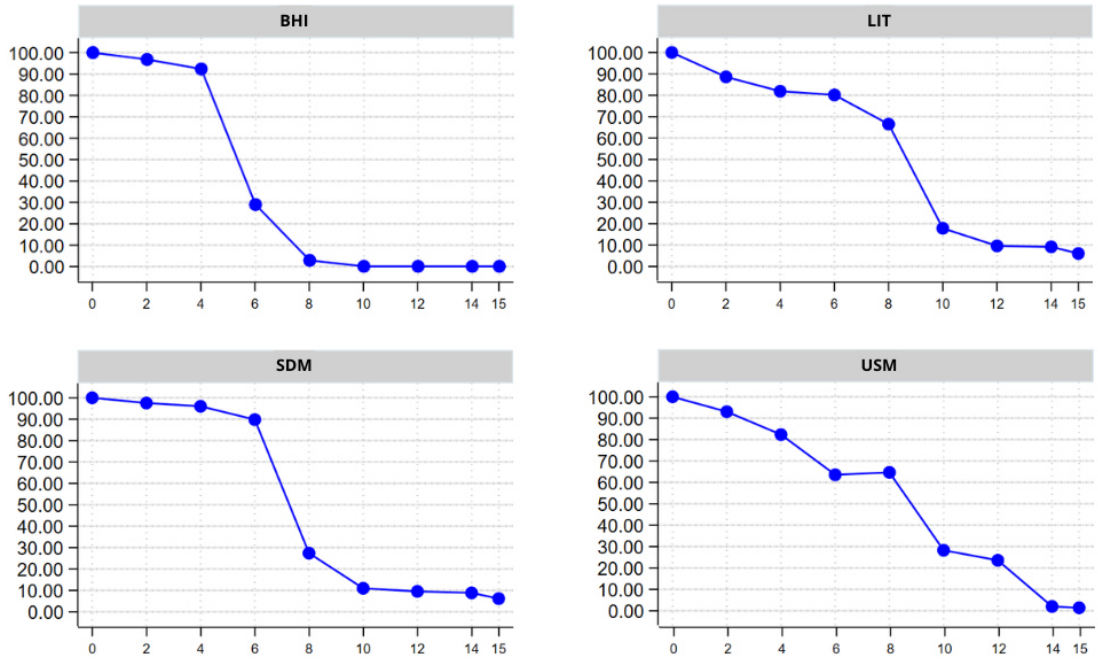


Figura 10. Curvas de viabilidad celular de *Crithidia fasciculata* en los medios BHI, LIT, SDM y USAMRU a 25 °C durante 15 días.

Tabla 6. Descriptivos de viabilidad a 25 °C.

Medio de cultivo	Día 2 (%)	Día 6 (%)	Día 10 (%)	Día 15 (%)
BHI	96,8	26,2	0,0	0,0
LIT	88,6	68,5	18,9	3,1
SDM	100,0	88,7	46,4	19,6
USAMRU	93,0	31,7	13,7	2,9
*Los valores se expresan como porcentaje promedio de viabilidad celular en días clave del cultivo.				

8.2.2. Viabilidad de *Crithidia fasciculata* a temperatura de 26 °C

A 26 °C, las curvas mostraron una conservación de la viabilidad más prolongada en la mayoría de los medios (Figura 11, Tabla 7). En el medio BHI, la viabilidad inicial fue

absoluta con un valor de 100,0 % en el día 2 y se mantuvo elevada hasta el día 4 con 99,6 %. Posteriormente, la mortalidad aumentó, reduciendo la población viable al 56,5 % en el día 6 y a solo 6,0 % en el día 10, para finalizar en un 1,6 % en el día 15.

En el medio LIT, la viabilidad también fue alta durante la primera mitad del ensayo, con valores de 97,8 % en el día 2 y 92,6 % en el día 4. A partir del día 6, se registró un descenso gradual con 74,0 % y 5,7 % en el día 10. Los valores continuaron disminuyendo hasta llegar a 2,0 % en el día 15.

Nuevamente, el medio SDM presentó los valores más altos y estables, conservando porcentajes superiores al resto de los medios, con 100,0 % en el día 2, 90,7 % en el día 6 y 72,7 % en el día 10. Recién en la fase tardía los porcentajes disminuyeron gradualmente, cerrando con 25,9 % en el día 15.

El medio USAMRU mostró una disminución más temprana, con 95,1 % en el día 2 y 75,6 % en el día 4, reduciéndose posteriormente a 32,3 % en el día 6 y 10,3 % en el día 10, hasta culminar en 2,4 % en el día 15.

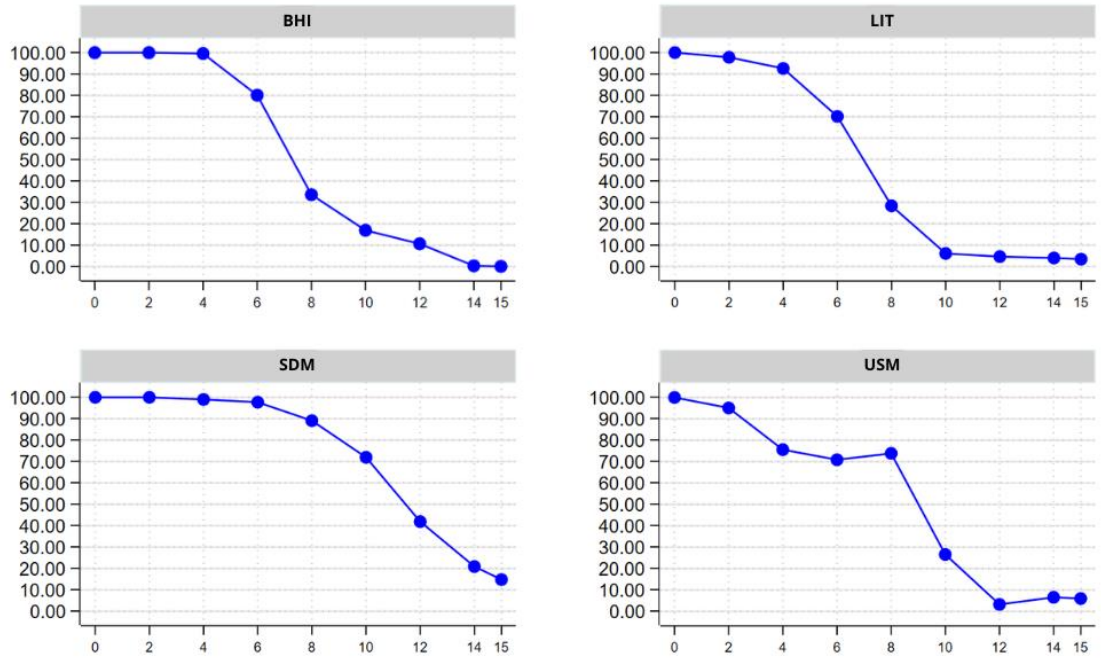


Figura 11. Curvas de viabilidad celular de *Crithidia fasciculata* en los medios BHI, LIT, SDM y USAMRU a 26 °C durante 15 días.

Tabla 7. Descriptivos de viabilidad a 26 °C.

Medio de cultivo	Día 2 (%)	Día 6 (%)	Día 10 (%)	Día 15 (%)
BHI	100,0	56,5	6,0	1,6
LIT	97,8	74,0	5,7	2,0
SDM	100,0	90,7	72,7	25,9
USAMRU	95,1	32,3	10,3	2,4
*Los valores se expresan como porcentaje promedio de viabilidad celular en días clave del cultivo.				

8.2.3. Viabilidad de *Crithidia fasciculata* a temperatura de 27 °C

A 27 °C, el efecto del estrés térmico provocó una pérdida de viabilidad celular mucho más acelerada y marcada en todos los medios (Figura 12, Tabla 8). En el medio BHI, aunque la viabilidad fue de 98,7 % en el día 2 y 92,4 % en el día 4, colapsó rápidamente, registrando un 1,0 % en el día 6 y 0,0 % desde el día 10 hasta el final del ensayo.

En el medio LIT, se registraron valores de 98,5 % en el día 2 y 70,1 % en el día 4, seguidos por un descenso muy pronunciado con 41,4 % en el día 6 y 1,9 % en el día 10. La viabilidad de este medio cayó a 0,0 % hacia el final del ensayo en los días 14 y 15.

El medio SDM mantuvo la mayor proporción de células viables dentro de esta temperatura, con 96,4 % en el día 2, 69,0 % en el día 6 y 19,8 % en el día 10. La reducción continuó de forma gradual, cerrando el ensayo con 6,5 % de viabilidad en el día 15.

Finalmente, el medio USAMRU mostró los valores más bajos y la caída más abrupta, iniciando con 87,2 % en el día 2 y descendiendo rápidamente a 23,1 % en el día 6 y 6,9 % en el día 10, para culminar con 1,0 % en el día 15.

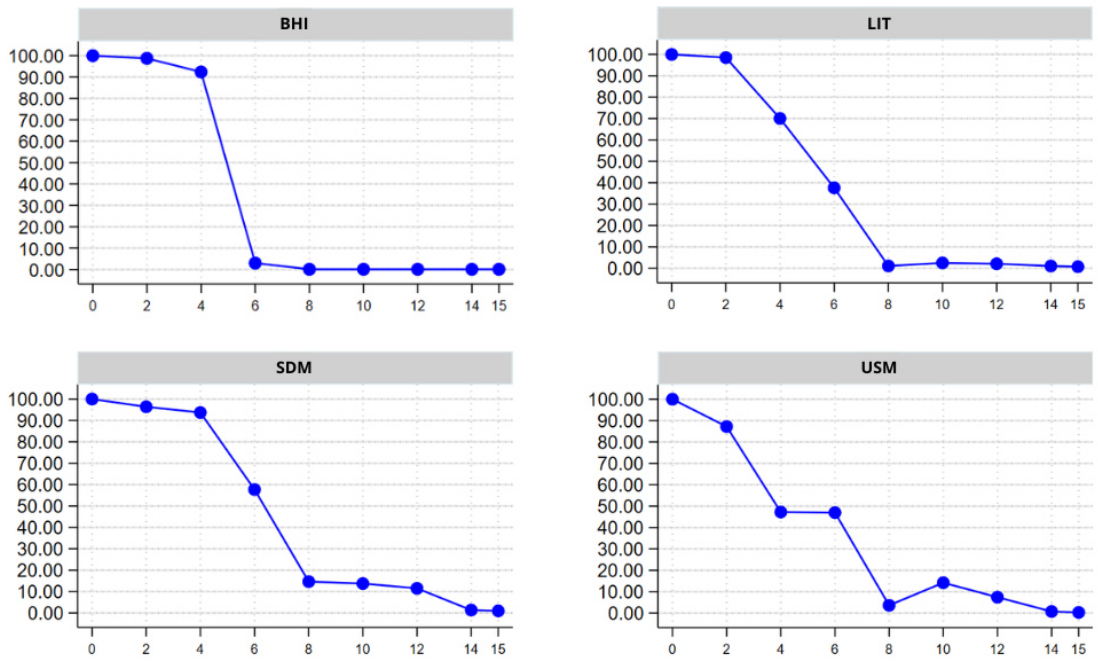


Figura 12. Curvas de viabilidad celular de Crithidia fasciculata en los medios BHI, LIT, SDM y USAMRU a 27 °C durante 15 días.

Tabla 8. Descriptivos de viabilidad a 27 °C.

Medio de cultivo	Día 2 (%)	Día 6 (%)	Día 10 (%)	Día 15 (%)
BHI	98,7	1,0	0,0	0,0
LIT	98,5	41,4	1,9	0,0
SDM	96,4	69,0	19,8	6,5
USAMRU	87,2	23,1	6,9	1,0
Los valores se expresan como porcentaje promedio de viabilidad celular en días clave del cultivo.				

8.3. Análisis de varianza y regresión en variables de crecimiento

Se realizaron análisis de varianza y modelos de regresión lineal sobre las variables resumen del pico de crecimiento y el área bajo la curva transformadas mediante logaritmo natural, ln(Pico) y ln(AUC), para cumplir los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas requeridos por los modelos paramétricos.

En el análisis de ln(Pico), se observaron efectos significativos del medio de cultivo, la temperatura y su interacción. El efecto principal del medio fue significativo con un valor $F(3,96) = 4,31$, $p = 0,0068$ y $\eta^2_p = 0,119$; al igual que el efecto de la temperatura, el cual mostró alta significancia, con $F(2,96) = 17,89$, $p < 0,0001$ y $\eta^2_p = 0,272$. De igual manera, la interacción entre medio y temperatura resultó significativa, con $F(6,96) = 4,97$, $p = 0,0002$ y $\eta^2_p = 0,237$.

Para la variable ln(AUC), el efecto de medio fue significativo con un valor $F(3,96) = 4,09$, $p = 0,0089$ y $\eta^2_p = 0,113$; mientras que el efecto de temperatura mostró una alta significancia, con un valor $F(2,96) = 14,54$, $p < 0,0001$ y $\eta^2_p = 0,232$. Asimismo, se observó una interacción significativa entre medio y la temperatura con valor $F(6,96) = 3,74$; $p = 0,0022$; y $\eta^2_p = 0,190$.

El modelo de regresión lineal obtuvo valores de R^2 ajustado de 0,41 para ln(Pico) y 0,38 para ln(AUC), indicando que entre el 38 % y el 41 % de la variabilidad total fue explicada por los factores medio, temperatura y su interacción.

8.4. Modelo mixto lineal del crecimiento de *Crithidia fasciculata*

Se ajustó un modelo mixto lineal con efecto aleatorio por réplica para analizar la dinámica del crecimiento de *C. fasciculata* a lo largo del tiempo. El análisis se realizó sobre el logaritmo del conteo celular mediante máxima verosimilitud restringida (REML). El modelo incluyó como efectos fijos el medio de cultivo, la temperatura y su interacción. En notación simplificada:

$$\ln(\text{conteo}) = \beta_0 + \beta(\text{Medio}) + \beta(\text{Temperatura}) + \beta(\text{Medio}\times\text{Temperatura}) + u_0[\text{réplica}] + \varepsilon.$$

El modelo ajustado presentó un log-likelihood de −936,31, con valores de AIC de 1948,63 y BIC de 2106, 7. El coeficiente de correlación intraclase (ICC) fue prácticamente nulo, con un valor de $9{,}18 \times 10^{-16}$. La desviación estándar del intercepto aleatorio fue de $5{,}82 \times 10^{-8}$, mientras que la desviación estándar residual alcanzó 1,921, equivalente a una varianza aproximada de 3,691.

Las pruebas globales de efectos fijos mostraron diferencias significativas para el medio, con un valor de $\chi^2(3)=52{,}90$ y $p < 0.001$, como para la temperatura con un valor de $\chi^2(2)=70{,}86$ y $p < 0.001$. Así mismo, la interacción medio y temperatura fue significativa, con un valor de $\chi^2(6) = 50{,}32$ y $p < 0.001$).

Las medias ajustadas mostraron variaciones en la densidad celular según el medio y la temperatura. En el día 6, los medios LIT y BHI registraron las mayores densidades a 25–26 °C, mientras que a 27 °C todas las combinaciones mostraron valores más bajos. En el día 10,

el medio LIT mantuvo densidades superiores a BHI y SDM a 25–26 °C, mientras que USAMRU se mantuvo en los valores más bajos en todas las condiciones.

Los resultados del modelo mixto fueron coherentes con los obtenidos en las variables resumen de pico y AUC, demostrando que los tratamientos con valores más altos en estas medidas también alcanzaron mayores densidades ajustadas a lo largo del tiempo.

8.5. Modelo mixto lineal de la viabilidad de *Crithidia fasciculata*

Se empleó un modelo mixto lineal con efecto aleatorio por réplica para analizar la evolución de la viabilidad celular de *C. fasciculata* durante los 15 días de cultivo. El análisis se realizó a partir de los valores transformados mediante la función arcoseno de la raíz cuadrada, arcsen(√p), de las proporciones de viabilidad, con el objetivo de cumplir los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas para los modelos paramétricos. El modelo fue estimado mediante máxima verosimilitud restringida (REML) e incluyó como efectos fijos el medio de cultivo, la temperatura, el día de muestreo y sus interacciones.

En notación simplificada:

$$viab_{tr} = \beta_0 + \beta(\text{Medio}) + \beta(\text{Temperatura}) + \beta(\text{Día}) + \beta(\text{Medio}\times\text{Temperatura}) + \beta(\text{Medio}\times\text{Día}) + \beta(\text{Temperatura}\times\text{Día}) + \beta(\text{Medio}\times\text{Temperatura}\times\text{Día}) + u_0[\text{réplica}] + \varepsilon$$

El modelo mostró un valor de log-likelihood de −48,08, con criterios de información AIC = −88,76 y BIC = 371,72, lo que indica una convergencia estable y una adecuada representación de los datos experimentales. Las varianzas de los efectos aleatorios fueron prácticamente nulas, con var intercepto = $6{,}31 \times 10^{-11}$ y var pendiente = $3{,}83 \times 10^{-12}$, mientras que la varianza residual fue de 0,055. El coeficiente de correlación intraclase ICC evidenció una mínima variabilidad entre réplicas.

Las pruebas globales de los efectos fijos revelaron diferencias significativas en la viabilidad celular para los factores medio de cultivo ($\chi^2_{(3)}$ = 10,68, p = 0,0136), temperatura ($\chi^2_{(2)}$ = 15,73, p = 0,0004) y día ($\chi^2_{(1)}$ = 172,80, p < 0.001). Por su parte, las interacciones entre estos factores no mostraron efectos estadísticamente significativos. Estos resultados revelan que la viabilidad celular fue afectada de manera independiente por los factores principales.

Las medias ajustadas evidenciaron variaciones en los valores de viabilidad tanto a lo largo del tiempo como entre las diferentes condiciones experimentales. En los primeros días, destacando el día 6, los medios SDM y LIT presentaron las mayores proporciones de células viables, especialmente a 26 °C, mientras que BHI mostró valores intermedios y USAMRU los valores más bajos. A medida que avanzó el cultivo hacia el día 15, la viabilidad disminuyó en todos los tratamientos, aunque el medio SDM mantuvo consistentemente los valores más altos.

El modelo confirmó que la pérdida de viabilidad siguió un patrón biológico similar en todos los medios y temperaturas, con diferencias significativas en los valores iniciales, pero con una reducción paralela conforme avanzó el tiempo de cultivo, asociada al agotamiento nutricional.

9. DISCUSIÓN

Los resultados del presente estudio demuestran que tanto el crecimiento como la viabilidad de *Crithidia fasciculata* dependen de forma significativa del medio de cultivo y de la temperatura, con patrones de comportamiento biológicos típicos de los tripanosomátidos cultivados *in vitro*. Respecto a los componentes del medio, nuestros hallazgos coinciden con lo reportado por Cerone et al. (2022), quienes destacaron la influencia de la suplementación adecuada para el crecimiento de *Crithidia*, y con lo señalado por Barbosa dos Santos et al. (2025), quienes reportaron que este tripanosomátido se desarrolla óptimamente en medios complejos con alto contenido de aminoácidos, hemina y suero bovino fetal. Las diferencias observadas entre los medios reflejan el papel de la disponibilidad de nutrientes esenciales.

El medio LIT permitió alcanzar altas densidades y mantener la proliferación de *C. fasciculata* de manera más prolongada, coincidiendo con estudios previos que confirman su eficacia gracias al equilibrio de fuentes de carbono y nitrógeno, y la estimulación de la síntesis de citocromos por la hemina (Costa et al., 2020; Seiwert, 2020).

Por el contrario, el medio BHI mostró un crecimiento inicial acelerado (pico temprano) seguido de un colapso poblacional marcado. Esto sugiere un pronto agotamiento de nutrientes y la rápida acidificación del entorno por acumulación de metabolitos tóxicos derivados de un metabolismo explosivo, un fenómeno de consumo exacerbado previamente descrito en tripanosomátidos cultivados en medios ricos en hemina (Silva et al., 2023; Gómez-Moracho et al., 2020). Zimna y Krol (2024) advirtieron que los medios altamente enriquecidos como BHI requieren complementos o renovaciones para sostener cultivos prolongados.

El medio SDM proporcionó un crecimiento intermedio y la pérdida de viabilidad más lenta (conservando células vivas hasta el día 15). Este comportamiento es similar al obtenido por Darío et al. (2021) en *Crithidia mellificae*. La menor concentración de compuestos nitrogenados en el SDM parece brindar un entorno menos propenso a la acumulación rápida de subproductos letales.

Por su parte, el medio bifásico USAMRU presentó inestabilidad y baja eficiencia a largo plazo. De Oliveira et al. (2024) y la OMS (WHO, 2010) respaldan que, aunque las formulaciones bifásicas facilitan el aislamiento primario de las muestras clínicas, su capacidad para mantener biomasas altas en subcultivos sostenidos es inferior a la de los medios líquidos definidos.

Además de las variables nutricionales, para entender la estabilidad inicial, se tuvo en cuenta los factores preanalíticos. Es importante considerar la aplicación de fuerza de centrifugación de 2 500 x g durante tres lavados sucesivos inmediatamente después de la descongelación térmica, ya que representó un estrés mecánico inicial que afectó a todas las alícuotas de trabajo por igual antes de los experimentos en los medios de cultivo. Pese a que se sugiere el uso de fuerzas moderadas entre 800 x g y 1 200 x g para mitigar el riesgo de lisis celular (Teufel y dos Santos, 2024), el uso de 2 500 x g durante 10 minutos se utiliza en protocolos enfocados en garantizar la sedimentación y empaquetamiento eficiente de la biomasa parasitaria, asegurando un inóculo óptimo en medios definidos de composición básica o con limitaciones nutricionales (Nasiri et al., 2017). La viabilidad absoluta del 100 % registrada en el día 0 y el crecimiento posterior exitoso en los medios monofásicos evidenciaron que, aunque la centrifugación pudo inducir la pérdida selectiva de la población celular más lábil, las células supervivientes pudieron proliferar sin problema, por lo que el lavado inicial no afectó los resultados ni alteró el comportamiento de los cultivos.

Respecto a la temperatura, el crecimiento máximo y la mayor conservación de la viabilidad ocurrieron a 25 °C y 26 °C, coincidiendo con la temperatura óptima de desarrollo reportada para el género (Boucinha et al., 2022; Darío et al., 2021). Sin embargo, el hallazgo más significativo fue el marcado estrés térmico observado a 27 °C, donde la densidad celular cayó drásticamente y la viabilidad fue nula de forma temprana, sugiriendo alteraciones en la permeabilidad de membrana y estrés oxidativo (Ishemgulova et al., 2017).

Este fenotipo de termosensibilidad estricta in vitro, donde el parásito es incapaz de tolerar 27 °C, se contradice con su procedencia biológica. Estudios sugieren la posibilidad de que tras periodos de criopreservación y pasajes in vitro en medios axénicos a 25 °C, el aislado LES30 haya perdido la plasticidad o los mecanismos de adaptación genómica necesarios para tolerar el estrés térmico humano (Santarem et al., 2012; Sinha et al., 2018).

Complementariamente, estudios recientes como el de Barbosa dos Santos et al. (2025) han demostrado que cepas de *Crithidia fasciculata* aisladas de humanos muestran un comportamiento no patogénico y no logran sobrevivir a temperaturas mamíferas (32-34 °C) ni infectar macrófagos cuando se cultivan de manera aislada in vitro. Esto apoya la hipótesis de que *Crithidia* podría actuar como un co-infectante transitorio u oportunista en lesiones previamente establecidas por *Leishmania* spp., donde el ambiente intracelular o la respuesta inflamatoria modificada del hospedero podrían brindar un microambiente que proteja temporalmente a *Crithidia* de la temperatura sistémica (Barbosa dos Santos et al., 2025).

El modelo mixto lineal confirmó efectos significativos del medio, de la temperatura y de su interacción ($p < 0.001$), confirmando que la respuesta de *C. fasciculata* depende del entorno nutricional en el que se encuentre. La interacción significativa entre ambos factores indica

que la capacidad del parásito para multiplicarse no depende únicamente de la temperatura o de los nutrientes por separado, sino del equilibrio entre ambos (Barbosa dos Santos et al, 2025).

En contraste, el modelo mixto lineal para el análisis de viabilidad mostró un declive uniforme a lo largo del tiempo independiente de la interacción medio-temperatura, confirmando que el envejecimiento del cultivo y el agotamiento del microambiente son los factores limitantes principales (Calderón-Arguedas et al., 2006; Cerone et al., 2025)

Finalmente, la caracterización de estas cinéticas tiene un impacto directo en la optimización del diagnóstico diferencial entre *Crithidia* spp. y *Leishmania* spp., especialmente en regiones endémicas donde ambos parásitos pueden coexistir (Boucinha et al., 2022). Dado que *Crithidia* spp. ha sido reportada como un coinfectante frecuente en pacientes con cuadros clínicos cutáneos y viscerales, su identificación errónea puede alterar significativamente las decisiones terapéuticas. Identificar que el medio BHI a 26 °C permite obtener picos masivos de biomasa de la cepa en tan solo 2 a 4 días resulta idóneo, ya que garantiza obtención rápida de células viables destinadas a la extracción de ácidos nucleicos. Esta biomasa constituye el insumo más importante para aplicar ensayos moleculares específicos, como la PCR y qPCR, permitiendo distinguir genéticamente a *Crithidia* de *Leishmania*. Asimismo, la marcada intolerancia térmica observada in vitro de nuestro aislado puede aplicarse metodológicamente como un criterio adicional en el ámbito clínico para su diferenciación frente a cepas de *Leishmania* spp. que presentan resistencia térmica.

10.CONCLUSIONES

- El medio BHI a 26 °C genera la mayor biomasa de *Crithidia fasciculata* en el menor tiempo, convirtiéndolo en el medio óptimo para la obtención rápida de células destinadas a la extracción de ácidos nucleicos y diagnóstico molecular diferencial.

- Los medios líquidos definidos son más eficientes para el mantenimiento in vitro a largo plazo. El medio LIT genera la mayor biomasa total acumulada, mientras que el medio SDM favorece la conservación más prolongada de la viabilidad celular, manteniendo parásitos vivos hasta el día 15.

- El medio bifásico USAMRU presenta inestabilidad cinética, baja reproducibilidad y pérdida temprana de viabilidad, demostrando no ser apto para el crecimiento y mantenimiento del aislado bajo las condiciones evaluadas.

- El rango de temperatura óptimo para el desarrollo in vitro de la cepa se encuentra entre 25 °C y 26 °C. A 27 °C, el parásito presenta una intolerancia térmica estricta, caracterizada por un colapso poblacional drástico y mortalidad temprana.

- El crecimiento y la densidad máxima alcanzada por el parásito dependen de una interacción estadística altamente significativa entre la composición nutricional del medio y la temperatura. En cambio, la pérdida de viabilidad celular se da de manera independiente a esta interacción, disminuyendo progresivamente en función exclusiva del tiempo de cultivo.

11.REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alcolea, P. J., Alonso, A., García-Tabares, F., Toraño, A., & Larraga, V. (2014). An Insight into the Proteome of *Crithidia fasciculata* Choanomastigotes as a Comparative Approach to Axenic Growth, Peanut Lectin Agglutination and Differentiation of *Leishmania* spp. Promastigotes. *PLoS ONE*, 9(12), e113837. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0113837

Barbosa dos Santos, J. F., Martins, C. B., Andrade-Neto, V. V., Lemos-Silva, T., dos Santos, R. F., Gonçalves da-Silva, S. A., Traub-Csekö, Y. M., Menna-Barreto, R. F. S., Torres-Santos, E. C., d'Avila, C. M., & Ennes-Vidal, V. (2025). *Crithidia fasciculata* Shows Non-Pathogenic Behavior in *Leishmania* Co-Infection Related to Temperature Stress, In Vitro and In Vivo Infections, and Amphotericin B Susceptibility. *Microorganisms*, 13(10), 2335. https://doi.org/10.3390/microorganisms13102335

Barratt, J., Kaufer, A., Peters, B., Craig, D., Lawrence, A., Roberts, T., Lee, R., McAuliffe, G., Stark, D., & Ellis, J. (2017). Isolation of Novel Trypanosomatid, *Zelonia australiensis* sp. nov. (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) Provides Support for a Gondwanan Origin of Dixenous Parasitism in the Leishmaniinae. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, *11*(1), e0005215. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005215

Bermúdez, H., Solano, M., Torrico Rojas, M. C., Carballo Montero, M., Lafuente Covarrubias, O., Lara Arias, M. del P., & Paredes Torrico, P. (2005). Diagnóstico de leishmaniasis utilizando medio de cultivo TSTB en pacientes del trópico de Cochabamba. Gaceta Médica Boliviana, 28(2), 31–35.

Boisseau-Garsaud, A. M., Cales-Quist, D., Desbois, N., Jouannelle, J., Jouannelle, A., Pratlong, F., & Dedet, J. P. (2000). A new case of cutaneous infection by a presumed monoxenous trypanosomatid in the island of Martinique (French West Indies). *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 94(1), 51–52. https://doi.org/10.1016/S0035-9203(00)90435-8

Boucinha, C., Andrade-Neto, V. V., Ennes-Vidal, V., Branquinha, M. H., Santos, A. L. S. dos, Torres-Santos, E. C., & d'Avila-Levy, C. M. (2022). A stroll through the history of monoxenous trypanosomatids infection in vertebrate Hosts. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 12, 804707. https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.804707

Boulanger, N., Ehret-Sabatier, L., Brun, R., Zachary, D., Bulet, P., & Imler, J. L. (2001). Immune response of *Drosophila melanogaster* to infection with the flagellate parasite *Crithidia* spp. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 31(2), 129–137. https://doi.org/10.1016/S0965-1748(00)00096-5

Buendía-Abad, M., García-Palencia, P., de Pablos, L. M., Martín-Hernández, R., & Higes, M. (2022). The Haptomonad Stage of *Crithidia acanthocephali* in *Apis mellifera* Hindgut. *Veterinary Sciences*, 9(6), 298. https://doi.org/10.3390/vetsci9060298

Buendía-Abad, M., García-Palencia, P., Pablos-Torró, L. M. de, Alunda, J. M., Osuna, A., Martín-Hernández, R., & Higes, M. (2021). First description of *Lotmaria passim* and *Crithidia mellificae* haptomonad stage in the honeybee hindgut. *BioRxiv*, 2021.04.12.439428. https://doi.org/10.1101/2021.04.12.439428

Centers for Disease Control and Prevention. (2024). *Leishmaniasis*. CDC Yellow Book. https://www.cdc.gov/dpdx/leishmaniasis/index.html

Cerone, M., Roberts, M., & Smith, T. K. (2022). The lipidome of Crithidia fasciculata and its plasticity. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 12, 945750. https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.945750

Chen, H., Bashir, N. H., Li, Q., Liu, C., Naeem, M., Wang, H., Gao, W., Corlett, R. T., Liu, C., & Vidal, M. C. (2025). The Role of Pathogens in Bumblebee Decline: A Review. *Pathogens*, 14(1), 94. https://doi.org/10.3390/pathogens14010094

Cooper, C., Keatley, S., Northover, A., Gofton, A. W., Brigg, F., Lymbery, A. J., Pallant, L., Clode, P. L., & Thompson, R. C. A. (2018). Next generation sequencing reveals widespread trypanosome diversity and polyparasitism in marsupials from Western Australia. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 7(1), 58–67. https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2018.01.005

Costa, A. F. P., de Brito, R. C. F., Carvalho, L. M., Cardoso, J. M. de O., Vieira, P. M. de A., Reis, A. B., Aguiar-Soares, R. D. de O., & Roatt, B. M. (2020). Liver infusion tryptose (LIT): the best choice for growth, viability, and infectivity of *Leishmania infantum* parasites. *Parasitology Research*, 119(12), 4185–4192. https://doi.org/10.1007/s00436-020-06893-z

Cunha, J., Carrillo, E., Sánchez, C., Cruz, I., Moreno, J., & Cordeiro-da-Silva, A. (2013). Characterization of the biology and infectivity of *Leishmania infantum* viscerotropic and dermotropic strains isolated from HIV+ and HIV- patients in the murine model of visceral leishmaniasis. *Parasites & Vectors*, 6(1), 122. https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-122

Darío, M. A., Lisboa, C. V., Silva, M. V., Herrera, H. M., Rocha, F. L., Furtado, M. C., Moratelli, R., Rodrigues Roque, A. L., & Jansen, A. M. (2021). *Crithidia mellificae* infection in different mammalian species in Brazil. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 15, 58–69. https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2021.04.003

Dedet, J. P., Roche, B., Pratlong, F., Cales-Quist, D., Jouannelle, J., Benichou, J. C., & Huerre, M. (1995). Diffuse cutaneous infection caused by a presumed monoxenous trypanosomatid in a patient infected with HIV. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 89(6), 644–646. https://doi.org/10.1016/0035-9203(95)90432-3

Fabiano, L., Nunes Santos, F., & de Freitas Campos Miranda, L. (2024). Standardization of the Miniculture Technique for isolation of *Leishmania* spp. v1. *Protocols.io*. https://doi.org/10.17504/protocols.io.n92ldry5og5b/v1

Fadhil, S. A., & Ali, M. J. (2024). Molecular identification of *Crithidia* sp. from naturally infected dogs. *Iraqi Journal of Veterinary Sciences*, 38(4), 831–837. https://doi.org/10.33899/ijvs.2024.150337.3695

Filosa, J. N., Berry, C. T., Ruthel, G., Beverley, S. M., Warren, W. C., Tomlinson, C., Myler, P. J., Dudkin, E. A., Povelones, M. L., & Povelones, M. (2019). Dramatic changes in gene expression in different forms of *Crithidia fasciculata* reveal potential mechanisms for insect-specific adhesion in kinetoplastid parasites. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 13(7), e0007570. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007570

Frolov, A. O., Kostygov, A. Y., & Yurchenko, V. (2021). Development of Monoxenous Trypanosomatids and Phytomonads in Insects. *Trends in Parasitology*, 37(6), 538–551. https://doi.org/10.1016/j.pt.2021.02.004

Gegear, R. J., Otterstatter, M. C., & Thomson, J. D. (2006). Bumble-bee foragers infected by a gut parasite have an impaired ability to utilize floral information. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 273(1590), 1073–1078. https://doi.org/10.1098/rspb.2005.3423

Ghobakhloo, N., Motazedian, M. H., Naderi, S., & Ebrahimi, S. (2019). Isolation of *Crithidia* spp. from lesions of immunocompetent patients with suspected cutaneous leishmaniasis in Iran. Tropical Medicine & International Health, 24(1), 116–126. https://doi.org/10.1111/tmi.13042

Hoare, C. A., & Wallace, F. G. (1966). Developmental stages of trypanosomatid flagellates: a new terminology. Nature, 212(5068), 1385–1386. https://doi.org/10.1038/2121385a0

Hong, A., Zampieri, R. A., Shaw, J. J., Floeter-Winter, L. M., & Laranjeira-Silva, M. F. (2020). One Health Approach to Leishmaniases: Understanding the Disease Dynamics through Diagnostic Tools. *Pathogens 2020, Vol. 9, Page 809*, *9*(10), 809. https://doi.org/10.3390/pathogens9100809

Ishemgulova, A., Butenko, A., Kortišová, L., Boucinha, C., Grybchuk-Ieremenko, A., Morelli, K. A., Tesařová, M., Kraeva, N., Grybchuk, D., Pánek, T., Flegontov, P., Lukeš, J., Votýpka, J., Pavan, M. G., Opperdoes, F. R., Spodareva, V., & D'Avila-Levy, C. M. (2017). Molecular mechanisms of thermal resistance of the insect

trypanosomatid *Crithidia thermophila*. PLoS ONE, 12(3), e0174165. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174165

Kaufer, A., Ellis, J., Stark, D., & Barratt, J. (2017). The evolution of trypanosomatid taxonomy. *Parasites & Vectors*, 10(1), 1–17. https://doi.org/10.1186/s13071-017-2204-7

Kidder, G. W., & Dutta, B. N. (1958). The growth and nutrition of *Crithidia fasciculata*. *Journal of General Microbiology*, 18(3), 621–638. https://doi.org/10.1099/00221287-18-3-621

Kostygov, A. Y., & Yurchenko, V. (2017). Molecular mechanisms of thermal resistance of the insect trypanosomatid *Crithidia thermophila*. *PLOS ONE*, *12*(3), e0174165. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174165

Kostygov, A. Y., & Yurchenko, V. (2017). Revised classification of the subfamily Leishmaniinae (Trypanosomatidae). *Folia Parasitologica*, 64, 020. https://doi.org/10.14411/fp.2017.020

Lakos, G., Gonzalez, M., Flaherty, D., Bentow, C., Ibarra, C., Stimson, D., Nacario, L., Hiemann, R., & Dervieux, T. (2016). Detection of anti-dsDNA antibodies by computer-aided automated immunofluorescence analysis. *Journal of Immunological Methods*, 433, 17–22. https://doi.org/10.1016/j.jim.2016.02.019

Lukeš, J., Butenko, A., Hashimi, H., Maslov, D. A., Votýpka, J., & Yurchenko, V. (2018). Trypanosomatids Are Much More than Just Trypanosomes: Clues from the Expanded Family Tree. *Trends in Parasitology*, 34(6), 466–480. https://doi.org/10.1016/j.pt.2018.03.002

Martinez, S. J., Nardella, G. N., Rodríguez, M. E., Rivero, C. V., Agüero, F., & Romano, P. S. (2022). Biological features of TcM: A new *Trypanosoma cruzi* isolate from Argentina classified into TcV lineage. *Current Research in Microbial Sciences*, 3, 100152. https://doi.org/10.1016/j.crmicr.2022.100152

Maruyama, S. R., de Santana, A. K. M., Takamiya, N. T., Takahashi, T. Y., Rogerio, L. A., Oliveira, C. A. B., Milanezi, C. M., Trombela, V. A., Cruz, A. K., Jesus, A. R., Barreto, A. S., da Silva, A. M., Almeida, R. P., Ribeiro, J. M., & Silva, J. S. (2019). Non-Leishmania Parasite in Fatal Visceral Leishmaniasis–Like Disease, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*, 25(11), 2088–2092. https://doi.org/10.3201/eid2511.181548

Mishra, J., Saxena, A., & Singh, S. (2007). Chemotherapy of Leishmaniasis: Past, Present and Future. *Current Medicinal Chemistry*, 14(10), 1153–1169. https://doi.org/10.2174/092986707780362862

Mollinedo, Z. A., Mollinedo, P. E., Noto, J., Mollinedo, P. S., Gironda, W. J., Mollinedo, J. S., & Salomón, O. D. (2021). Leishmaniasis en Pando-Bolivia - Frontera con Brasil y Perú. En J. de Oliveira, K. C. C. Alevi, L. M. A. Camargo, & D. U. de Oliveira Meneguetti (Orgs.), *Atualidades em Medicina Tropical na América do Sul: Vetores* (Cap. 15, pp. 266–285). Stricto Sensu Editora. https://doi.org/10.35170/ss.ed.9786586283587

Mundim, M. H., Roitman, I., Hermans, M. A., & Kitajima, E. W. (1974). Simple nutrition of Crithidia deanei, a reduviid trypanosomatid with an endosymbiont. *The Journal of Protozoology,* 21(4), 518–521. https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1974.tb03691.x

Nasiri, V., Dalimi, A., & Ghaffarifar, F. (2017). LB broth-lyophilized Rabbit serum (LLR) as a new and suitable culture medium for cultivation of promastigotes of Leishmania major. *Journal of Parasitic Diseases*, 41(1), 247–251. https://doi.org/10.1007/s12639-016-0786-1

Opperdoes, F. R., & Michels, P. A. M. (2007). Horizontal gene transfer in trypanosomatids. *Trends in Parasitology*, *23*(10), 470–476. https://doi.org/10.1016/j.pt.2007.08.002

Podlipaev, S. (2001). The more insect trypanosomatids under study-the more diverse Trypanosomatidae appears. *International Journal for Parasitology*, *31*(5–6), 648–652. https://doi.org/10.1016/S0020-7519(01)00139-4

Popp, M., & Lattorff, H. M. G. (2011). A quantitative in vitro cultivation technique to determine cell number and growth rates in strains of *Crithidia bombi* (Trypanosomatidae), a parasite of bumblebees. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 58(1), 7–10.

Rangel, D. A., Lisboa, C. V., Novaes, R. L. M., Silva, B. A., Souza, R. de F., Jansen, A. M., Moratelli, R., & Roque, A. L. R. (2019). Isolation and characterization of trypanosomatids, including Crithidia mellificae, in bats from the Atlantic Forest of Rio de Janeiro, Brazil. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *13*(7), e0007527. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007527

Rezaei, Z., Azarang, E., Shahabi, S., Omidian, M., Pourabbas, B., & Sarkari, B. (2020). *Leishmania* ITS1 is genetically divergent in asymptomatic and symptomatic visceral leishmaniasis: results of a study in southern Iran. *Journal of Tropical Medicine*, *2020*(1), 5351098. https://doi.org/10.1155/2020/5351098

Rogerio, L. A., Takahashi, T. Y., Cardoso, L., Takamiya, N. T., de Melo, E. V., de Jesus, A. R., de Oliveira, F. A., Forrester, S., Jeffares, D. C., & da Silva, J. S. (2023). Co-infection of *Leishmania infantum* and a *Crithidia*-related species in a case of refractory relapsed visceral leishmaniasis with non-ulcerated cutaneous manifestation in Brazil. *International Journal of Infectious Diseases*, 133, 85–88. https://doi.org/10.1016/j.ijid.2023.05.012

Santarem, N., Cunha, J., Silvestre, R., Silva, C., Moreira, D., Ouellette, M., & Cordeiro-Da-Silva, A. (2014). The impact of distinct culture media in *Leishmania infantum* biology and infectivity. *Parasitology*, 141(2), 192–205. https://doi.org/10.1017/S0031182013001388

Schmid-Hempel, P., Wilfert, L., & Schmid-Hempel, R. (2019). Pollinator diseases: the Bombus–Crithidia system. *Wildlife Disease Ecology: Linking Theory to Data and Application*, (pp. 3–31). Cambridge University Press. https://doi.org/10.1017/9781316479964.001

Schmid-Hempel, R., & Tognazzo, M. (2010). Molecular divergence defines two distinct lineages of *Crithidia bombi* (Trypanosomatidae), parasites of bumblebees. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 57(4), 337–345. https://doi.org/10.1111/J.1550-7408.2010.00480.X,

Schwarz, R. S., Bauchan, G. R., Murphy, C. A., Ravoet, J., de Graaf, D. C., & Evans, J. D. (2015). Characterization of two species of trypanosomatidae from the Honey Bee *Apis mellifera*: *Crithidia mellificae* Langridge and McGhee, and *Lotmaria passim* n. gen., n. sp. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, *62*(5), 567–583. https://doi.org/10.1111/jeu.12209

Seiwert, N., Wecklein, S., Demuth, P., Hasselwander, S., Kemper, T. A., Schwerdtle, T., Brunner, T., & Fahrer, J. (2020). Heme oxygenase 1 protects human colonocytes against ROS formation, oxidative DNA damage and cytotoxicity induced by heme iron, but not inorganic iron. *Cell Death and Disease*, *11*(9), 785. https://doi.org/10.1038/S41419-020-02950-8

Shanmugasundram, A., Starns, D., Böhme, U., Amos, B., Wilkinson, P. A., Harb, O. S., Warrenfeltz, S., Kissinger, J. C., McDowell, M. A., & Roos, D. S. (2023). TriTrypDB: An integrated functional genomics resource for kinetoplastida. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *17*(1), e0011058. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0011058

Songumpai, N., Promrangsee, C., Noopetch, P., Siriyasatien, P., & Preativatanyou, K. (2022). First Evidence of Co-Circulation of Emerging *Leishmania martiniquensis*, *Leishmania orientalis*, and *Crithidia* sp. in *Culicoides* Biting Midges (Diptera: Ceratopogonidae), the Putative Vectors for Autochthonous Transmission in Southern Thailand. *Tropical Medicine and Infectious Disease*, 7(11), 379. https://doi.org/10.3390/tropicalmed7110379

Strober, W. (2015). Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. *Current Protocols in Immunology*, *111*(1), A3.B.1-A3.B.3. https://doi.org/10.1002/0471142735.ima03bs111

Takamiya, N. T., Rogerio, L. A., Torres, C., Leonel, J. A. F., Vioti, G., de Sousa Oliveira, T. M. F., Valeriano, K. C., Porcino, G. N., de Miranda Santos, I. K. F., Costa, C. H. N., Costa, D. L., Ferreira, T. S., Gurgel-Gonçalves, R., da Silva, J. S., Teixeira, F. R., de Almeida, R. P., Ribeiro, J. M. C., & Maruyama, S. R. (2023).

Parasite Detection in Visceral Leishmaniasis Samples by Dye-Based qPCR Using New Gene Targets of *Leishmania infantum* and *Crithidia*. *Tropical Medicine and Infectious Disease*, 8(8), 405. https://doi.org/10.3390/tropicalmed8080405

Tetaud, E., Lecuix, I., Sheldrake, T., Baltz, T., & Fairlamb, A. H. (2002). A new expression vector for *Crithidia fasciculata* and *Leishmania*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 120(2), 195–204. https://doi.org/10.1016/S0166-6851(02)00002-6

Teufel, L. U., & dos Santos, J. C. (2024). Protocol to culture *Leishmania* protozoans for lipophosphoglycan extraction and purification. *STAR Protocols*, 5(4), 103468. https://doi.org/10.1016/j.xpro.2024.103468

van Wyk, J. I., Lynch, A. M., & Adler, L. S. (2023). Manipulation of multiple floral traits demonstrates role in pollinator disease transmission. *Ecology*, 104(4), e3866. https://doi.org/10.1002/ecy.3866

Venturelli, A., Tagliazucchi, L., Lima, C., Venuti, F., Malpezzi, G., Magoulas, G. E., Santarem, N., Calogeropoulou, T., Cordeiro-Da-silva, A., & Costi, M. P. (2022). Current Treatments to Control African Trypanosomiasis and One Health Perspective. *Microorganisms.* 10(7), 1298. https://doi.org/10.3390/microorganisms10071298

Votýpka, J., Votýpka, V., Suková, E., Kraeva, N., Ishemgulova, A., Duží, I., Lukě, J., & Yurchenko, V. (2013). Diversity of Trypanosomatids (Kinetoplastea: Trypanosomatidae) Parasitizing Fleas (Insecta: Siphonaptera) and Description of a New Genus *Blechomonas* gen. n. *Protist*, 164(6), 763–781. https://doi.org/10.1016/j.protis.2013.08.002

Wolfenson, F. (1985). Estudios estructurales de glicoconjugados de *Crithidia oncopelti* (Tesis de doctorado). Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Biblioteca Digital FCEN UBA.

Wood, D. E., Lu, J., & Langmead, B. (2019). Improved metagenomic analysis with Kraken 2. *Genome Biology*, 20(1), 257. https://doi.org/10.1186/s13059-019-1891-0

12.ANEXOS

Anexo 1. Preparación de medios de cultivo

Medio USAMRU (USM)

- Reactivos

  Parte A:

  - Agar Sangre Difco B45
  - Agua destilada
  - Sangre de conejo desfibrinada
  - Solución salina
  - Solución Penicilina- Estreptomicina (10.000 U de penicilina y 10 mg de estreptomicina/mL)

  Parte B:

  - Cloruro de sodio (NaCl)
  - Cloruro de potasio (KCl)
  - Cloruro de calcio ($CaCl_2$)
  - Fosfato monopotásico dihidrogenado (KH_2PO_4)
  - Dextrosa (glucosa)
  - Agua destilada

- Formulación para 100 mL de medio

  Parte A- Agar Sangre Base:

  - Agar Sangre Difco B45 .....4 g
  - Sangre de conejo desfibrinada (20% o 30%) .....15 mL

- Solución Penicilina- Estreptomicina…….…...1 mL
- Agua destilada.....100 mL

Parte B- Solución Salina:

- Cloruro de sodio (NaCl).....0,8 g
- Cloruro de potasio (KCl).....0,02 g
- Cloruro de calcio ($CaCl_2$).....0,02 g
- Fosfato monopotásico dihidrogenado (KH_2PO_4).....0,03 g
- Dextrosa (glucosa).....0,25 g
- Agua destilada.....100 mL

- Preparación

  El medio de cultivo bifásico USAMRU se preparó utilizando Agar Sangre Difco B45, agua destilada, sangre de conejo desfibrinada al 15 %, solución salina y solución Penicilina-Estreptomicina (10.000 U de penicilina y 10 mg de estreptomicina/mL). La preparación del medio se llevó a cabo en una cabina de bioseguridad con el fin de garantizar la esterilidad.

  Los materiales necesarios para su elaboración se esterilizaron en autoclave a 121 °C durante 20 minutos, mientras que los demás insumos fueron expuestos a luz ultravioleta (UV) durante 15 minutos para asegurar su desinfección.

  Para la parte A, se extrajeron entre 30 y 50 mL de sangre del corazón de un conejo mediante punción cardiaca empleando una jeringa. La sangre extraída fue añadida cuidadosamente por las paredes de un matraz de Erlenmeyer que contenía perlas de vidrio, el cual fue tapado y agitado suavemente con movimientos rotatorios durante

15 minutos. Posteriormente, la sangre desfibrinada se inactivó colocando el matraz en un baño maría a 56 °C durante 30 minutos.

El medio base se preparará pesando la cantidad indicada por el fabricante de Agar Sangre Difco B45, disolviéndose en agua destilada y ajustando el pH a valores entre 7,2 y 7,4 ± 0,05 con NaOH o HCl 1N. La mezcla será calentada con agitador magnético a 80 °C hasta su completa disolución y luego esterilizada en autoclave a 121 °C por 20 minutos. Una vez enfriada a 56 °C, y en condiciones estériles, se añadirán 15 mL de sangre desfibrinada junto con los antibióticos, asegurando una adecuada homogeneización.

El medio preparado se distribuyó en tubos de vidrio a razón de 5 mL por tubo, los cuales se colocaron en posición inclinada para formar una fase sólida con efecto de "pico de flauta". Posteriormente, los tubos se refrigeraron a 4 °C para favorecer la formación de la fase líquida por condensación.

Para la parte B, se pesaron cuidadosamente 0,8 g de NaCl, 0,02 g de KCl, 0,02 g de $CaCl_2$, 0,03 g de KH_2PO_4 y 0,25 g de $C_6H_{12}O_6$. En un matraz Erlenmeyer estéril, se adicionaron inicialmente entre 70 y 80 mL de agua destilada estéril, y se procedió a disolver primero el NaCl y el KCl con agitación magnética; posteriormente, se incorporó el KH_2PO_4 y, finalmente, el $C_6H_{12}O_6$ hasta lograr la disolución completa. El $CaCl_2$ se disolvió por separado en un pequeño volumen de agua destilada estéril y se añadió al final para evitar la formación de precipitados. La solución resultante se homogeneizó, y el volumen final se completó a 100 mL. Posteriormente, la mezcla fue esterilizada en autoclave a 121 °C durante 15 a 20 minutos, dejándose enfriar antes de ser agregada de manera estéril a los tubos que contenían la parte A.

Finalmente, los tubos, conteniendo ambas fases, fueron incubados a 37 °C por 24 horas para el control de calidad. Una vez pasado este tiempo, se almacenaron en refrigeración a 4 °C hasta su uso, con un tiempo de vida útil de aproximadamente 2 meses.

Medio Schneider's Drosophila Medium (SDM)

- Reactivos
    - Schneider's Drosophila Medium con L-glutamina
    - Suero bovino fetal (SBF) inactivado
    - Solución Penicilina- Estreptomicina (10.000 U de penicilina y 10 mg de estreptomicina/mL)

- Formulación para 100 mL de medio
    - Medio SDM (Gibco).....90 mL
    - Suero ternera o bovino fetal.....10 mL
    - Solución Penicilina-Estreptomicina……..……. 1 mL

- Preparación

El medio de cultivo Schneider's Drosophila Medium se preparó siguiendo las indicaciones del fabricante, mezclando Schneider's Drosophila Medium con L-glutamina de Gibco, suero bovino fetal inactivado por calor a una concentración de 10 %, y solución de Penicilina-Estreptomicina (10.000 U de penicilina y 10 mg de estreptomicina/mL). El pH del medio se ajustó a valores entre 7,2 y 7,4 ± 0,05 con NaOH 1N.

Posteriormente, el medio preparado se filtró empleando una unidad de filtración al vacío Thermo Scientific Rapid Flow de 150 mL y 0,22 µm, y se distribuyó en frascos

de cultivo celular de 25 cm^2 con tapa rosca de filtro, con 10 mL por frasco. Los frascos se rotularon indicando el nombre del medio y la fecha de preparación, y se incubaron a 37 °C durante 48 horas para descartar contaminación por bacterias u hongos. Los medios estériles se conservaron en refrigeración a 4 °C hasta su uso.

Medio Liver Infusion Tryptose (LIT)

- Reactivos
    - NaCl
    - KCl
    - Fosfato de sodio dibásico
    - Glucosa
    - Triptosa
    - Liver Infusion Tryptose Broth
    - Hemina
    - Agua destilada
    - Suero bovino fetal inactivado

- Formulación para 100 mL de medio
    - NaCl……..…..……0.4g
    - KCl……...……...……..0.04g
    - Na_2HPO_4..……...…..…….….0.8g
    - Glucosa……...…….…..…….…0.2g
    - Triptosa…….…..……0.5g
    - Liver Infusion Tryptose Broth…….…..……0.5g
    - Hemina…….…..……0.025g
    - Agua destilada …….……..…….100 mL

- Suero bovino fetal inactivado……..…….……..……..……..…..10 mL

- Preparación

  El medio de cultivo LIT se preparó siguiendo las recomendaciones de Costa et al. (2020). Para la preparación del medio Liver Infusion Tryptose (LIT), se pesaron 0,5 g de Liver Infusion Broth, 0,5 g de triptosa, 0,4 g de NaCl, 0,8 g de Na_2HPO_4, 0,04 g de KCl y 0,2 g de D-glucosa, y se disolvieron estos componentes en agua destilada estéril hasta alcanzar un volumen final de 100 mL. Posteriormente, se añadió 0,025 g de hemina y el suero bovino fetal según el porcentaje deseado. Luego, se ajustó el pH de la solución a 7,2 y se procedió a filtrar con la unidad de filtración al vacío para esterilizar el medio. Finalmente, se dispensaron asépticamente alícuotas de 10 mL en frascos de cultivo celular de 25 cm^2 con tapa rosca de filtro, y se almacenaron bajo condiciones estériles hasta su uso.

Medio Brain Heart Infusion modificado (BHI)

- Reactivos
  - Brain Heart Infusion Broth
  - Suero bovino fetal inactivado
  - Solución de Penicilina-Estreptomicina (10.000 U de penicilina y 10 mg de estreptomicina/mL)
  - Solución de hemina

- Formulación para 100 mL de medio
  - Medio BHI en polvo ..... 3.7 g
  - Agua destilada ..... 100 mL
  - Suero bovino fetal (FBS) .....10 mL

- Solución Penicilina-Estreptomicina ..... 1 mL
- Solución de Hemina ..... 532 µL

- Preparación

El medio de cultivo BHI se preparó siguiendo las indicaciones del fabricante. Se disolvieron 3,7 g de BHI en 100 mL de agua destilada estéril en el recipiente correspondiente. La solución se mezcló homogéneamente y se sometió a un ciclo de autoclave a 121 °C y 15 psi durante 15 minutos para su esterilización.

Para la preparación de la solución stock de hemina, se pesaron 20 mg de hemina en polvo (Sigma-Aldrich, ≥98 % de pureza) y se disolvieron en 10 mL de NaOH 0,1 N estéril, logrando una concentración final de 2 mg/mL. La solución se homogeneizó mediante agitación suave hasta lograr la completa disolución y se esterilizó por filtración utilizando una membrana de 0,22 µm. Posteriormente, se distribuyó en alícuotas estériles de 1 mL en tubos de polipropileno, que se almacenaron a –20 °C, protegidos de la luz.

Para la preparación del medio de cultivo, se adicionaron 532 µL de la solución stock de hemina (2 mg/mL) por cada 100 mL de medio BHI preparado y autoclavado, mezclando suavemente sin generar burbujas. Posteriormente, se añadieron 10 mL de suero bovino fetal inactivado y 1 mL de solución de Penicilina-Estreptomicina.

El medio preparado se ajustó a un pH de 7,2 - 7,4 ± 0,05 con NaOH 1N si fue necesario. Finalmente, se filtró utilizando una unidad de filtración al vacío de 0,22 µm y se distribuyó en frascos de cultivo celular de 25 cm^2, con 10 mL por frasco. Los frascos fueron rotulados con el nombre del medio y la fecha de preparación, incubándose a 37 °C durante 24 horas para verificar la ausencia de contaminación

microbiana. Los medios estériles se almacenaron en refrigeración a 4 °C hasta su uso.

Anexo 2. Conteo de *Crithidia fasciculata* en cultivos originales

Anexo 2.1. Medio BHI suplementado con SBF 10 % y hemina

25 °C			
Día	**BHI1**	**BHI2**	**BHI3**
0	1000000	1000000	1000000
2	78500000	86500000	82000000
4	57500000	61500000	61250000
6	17125000	18375000	16275000
8	2000000	4000000	3125000
10	10000	10000	10000
12	10000	10000	10000
14	10000	10000	10000
15	10000	10000	10000

26 °C			
Día	**BHI1**	**BHI2**	**BHI3**
0	1000000	1000000	1000000
2	13800000	14300000	13950000
4	124875000	129875000	100875000
6	54750000	51000000	54500000
8	31000000	27000000	29000000
10	23750000	23500000	24000000
12	17000000	15250000	14000000
14	1050000	1000000	9500000
15	250000	200000	250000

27 °C			
Día	**BHI1**	**BHI2**	**BHI3**
0	1000000	1000000	1000000
2	101500000	95500000	108500000
4	55120000	61000000	60120000
6	10000	10000	10000
8	10000	10000	10000
10	10000	10000	10000
12	10000	10000	10000
14	10000	10000	10000
15	10000	10000	10000

Anexo 2.2. Medio SDM suplementado con SBF 10 %

25 °C			
Día	**SDM1**	**SDM2**	**SDM3**
0	1000000	1000000	1000000
2	39600000	40200000	40000000
4	59500000	63620000	61620000
6	58500000	52125000	54000000
8	13125000	15375000	10000000
10	6000000	7625000	5750000
12	2500000	3625000	2625000
14	1600000	2225000	2050000
15	1500000	1775000	1625000

26 °C			
Día	**SDM1**	**SDM2**	**SDM3**
0	1000000	1000000	1000000
2	10125000	10450000	11125000
4	15425000	16850000	15825000
6	10600000	10800000	10725000
8	8200000	10400000	10350000
10	6550000	7250000	6850000
12	4600000	5200000	5050000
14	4100000	4300000	4250000
15	3150000	3050000	3200000

27 °C			
Día	**SDM1**	**SDM2**	**SDM3**
0	1000000	1000000	1000000
2	60500000	65000000	61875000
4	55600000	57500000	58600000
6	33625000	30000000	32000000
8	10375000	10500000	9625000
10	3200000	4150000	3150000
12	1850000	2600000	2200000
14	325000	400000	350000
15	200000	250000	275000

Anexo 2.3. Medio LIT suplementado con SBF 10 % y hemina

25 °C			
Día	**LIT1**	**LIT2**	**LIT3**
0	1000000	1000000	1000000
2	59000000	62750000	61000000
4	72250000	69750000	72750000
6	84500000	82000000	80000000
8	78250000	75000000	76000000
10	15250000	16000000	15375000
12	5000000	6625000	5500000
14	2800000	2800000	3000000
15	2100000	1950000	2000000

26 °C			
Día	**LIT1**	**LIT2**	**LIT3**
0	1000000	1000000	1000000
2	57500000	59000000	56500000
4	79000000	78000000	73000000
6	45500000	45000000	47250000
8	22750000	23250000	22250000
10	6125000	4875000	4500000
12	4625000	5125000	4000000
14	3700000	3800000	3550000
15	2900000	3000000	2975000

27 °C			
Día	**LIT1**	**LIT2**	**LIT3**
0	1000000	1000000	1000000
2	75250000	73000000	72750000
4	36750000	35250000	37000000
6	6000000	6500000	6875000
8	4750000	4250000	4500000
10	825000	800000	800000
12	715000	775000	725000
14	600000	575000	425000
15	525000	500000	375000

Anexo 2.4. Medio USAMRU bifásico

25 °C			
Día	**USAMRU 1**	**USAMRU 2**	**USAMRU 3**
0	1000000	1000000	1000000
2	53500000	49750000	50250000
4	40250000	39000000	41750000
6	30750000	28000000	29250000
8	25000000	18000000	20000000
10	31750000	24500000	38000000
12	12750000	12800000	12050000
14	7250000	5000000	4500000
15	3625000	3375000	3875000

26 °C			
Día	**USAMRU 1**	**USAMRU 2**	**USAMRU 3**
0	1000000	1000000	1000000
2	25000000	27000000	24750000
4	17750000	16800000	17250000
6	5600000	5300000	5150000
8	3500000	57500000	4500000
10	1950000	25250000	1700000
12	1250000	18000000	1012500
14	6750000	8000000	6400000
15	6250000	7250000	5750000

27 °C			
Día	**USAMRU 1**	**USAMRU 2**	**USAMRU 3**
0	1000000	1000000	1000000
2	32400000	31500000	32120000
4	15000000	14250000	16370000
6	9125000	9000000	6375000
8	4675000	4750000	4125000
10	8000000	7850000	8050000
12	6250000	3600000	4150000
14	5000000	2700000	3500000
15	2850000	1975000	2750000

Anexo 3. Porcentaje de viabilidad de *Crithidia fasciculata* en cultivos originales

Anexo 3.1. Medio BHI suplementado con SBF 10 % y hemina

25 °C			
Día	**BHI1**	**BHI2**	**BHI3**
0	100	100	100
2	96	96,9	97,5
4	91,1	92,8	93,2
6	29,03	29,28	28,66
8	1,89	4,01	2,79
10	0,1	0,1	0,1
12	0,1	0,1	0,1
14	0,1	0,1	0,1
15	0,1	0,1	0,1

26 °C			
Día	**BHI1**	**BHI2**	**BHI3**
0	100	100	100
2	100	100	100
4	99,69	99,61	99,5
6	78,83	81,6	80
8	36,52	31,03	33,33
10	17,3	16,82	16,78
12	11,28	10,52	10,18
14	0,4	0,38	0,37
15	0,1	0,1	0,1

27 °C			
Día	**BHI1**	**BHI2**	**BHI3**
0	100	100	100
2	98,8	98,6	98,8
4	91,1	92,8	93,2
6	0,1	0,1	8,8
8	0,1	0,1	0,1
10	0,1	0,1	0,1
12	0,1	0,1	0,1
14	0,1	0,1	0,1
15	0,1	0,1	0,1

Anexo 3.2. Medio SDM suplementado con SBF 10 %

25 °C			
Día	**SDM1**	**SDM2**	**SDM3**
0	100	100	100
2	97,1	97,9	97,7
4	97,8	95,5	94,8
6	90,7	88,54	90,19
8	27,13	34,94	20,15
10	9,7	13,96	9,27
12	8,17	11,27	9,16
14	7,41	10,11	9
15	5,66	6,72	6,1

26 °C			
Día	**SDM1**	**SDM2**	**SDM3**
0	100	100	100
2	100	100	100
4	99,04	99,26	98,75
6	97,69	97,52	97,94
8	87	90,04	90,2
10	70,43	71,78	73,66
12	36,95	44,26	44,49
14	19,62	22,05	21,14
15	14,19	14,81	15,5

27 °C			
Día	**SDM1**	**SDM2**	**SDM3**
0	100	100	100
2	96	96,7	96,5
4	92,9	94,3	94
6	60,04	55,05	58,05
8	15,23	13,95	14,82
10	12,93	15,96	12,4
12	10,76	13,39	10,36
14	1,22	1,52	1,32
15	0,79	0,99	1,09

Anexo 3.3. Medio LIT suplementado con SBF 10 % y hemina

25 °C			
Día	**LIT1**	**LIT2**	**LIT3**
0	100	100	100
2	89,39	89,21	87,14
4	82,1	81,1	82,44
6	80,86	82	77,67
8	68,49	64,79	66,23
10	17,89	17,88	17,7
12	8,99	9,95	9,93
14	8,86	8,43	10,2
15	6,16	5,91	6,13

26 °C			
Día	**LIT1**	**LIT2**	**LIT3**
0	100	100	100
2	98,29	96,33	98,69
4	92,67	92,04	93,02
6	68,52	69,77	72,14
8	27,16	29,81	28,09
10	7,27	5,73	5,22
12	4,59	5,26	3,99
14	4,37	4,11	3,43
15	3,64	3,5	3,18

27 °C			
Día	**LIT1**	**LIT2**	**LIT3**
0	100	100	100
2	98,69	98,32	98,64
4	71,01	71,57	67,58
6	37,5	37,41	37,93
8	1,13	1,11	1,05
10	2,45	2,57	2,5
12	2,15	2,09	2,1
14	1,19	1,14	0,89
15	0,74	0,84	0,65

Anexo 3.4. Medio USAMRU bifásico

25 °C			
Día	**USAMRU 1**	**USAMRU 2**	**USAMRU 3**
0	100	100	100
2	93,45	92,56	93,06
4	83,51	80	83,5
6	63,08	64	63,59
8	68,97	64,26	60,76
10	28,43	29,45	26,94
12	24,1	22,63	24,02
14	2	1,8	2,2
15	1,4	1,3	1,5

26 °C			
Día	**USAMRU 1**	**USAMRU 2**	**USAMRU 3**
0	100	100	100
2	95,24	94,74	95,37
4	73,96	77,01	75,82
6	72,73	68,39	71,53
8	73,68	75,16	72,7
10	12,34	56,04	11,45
12	3,03	2,91	3,85
14	6,32	7,41	6,02
15	5,88	6,76	5,44

27 °C			
Día	**USAMRU 1**	**USAMRU 2**	**USAMRU 3**
0	100	100	100
2	85,2	89,36	87,12
4	45,98	46,34	49,43
6	53,73	54,96	32,28
8	3,75	3,91	3,26
10	14,29	14,18	14,11
12	9,43	6,14	6,73
14	0,99	0,55	0,7
15	0,4	0,24	0,32

Anexo 4. *Crithidia fasciculata* en cultivo in vitro

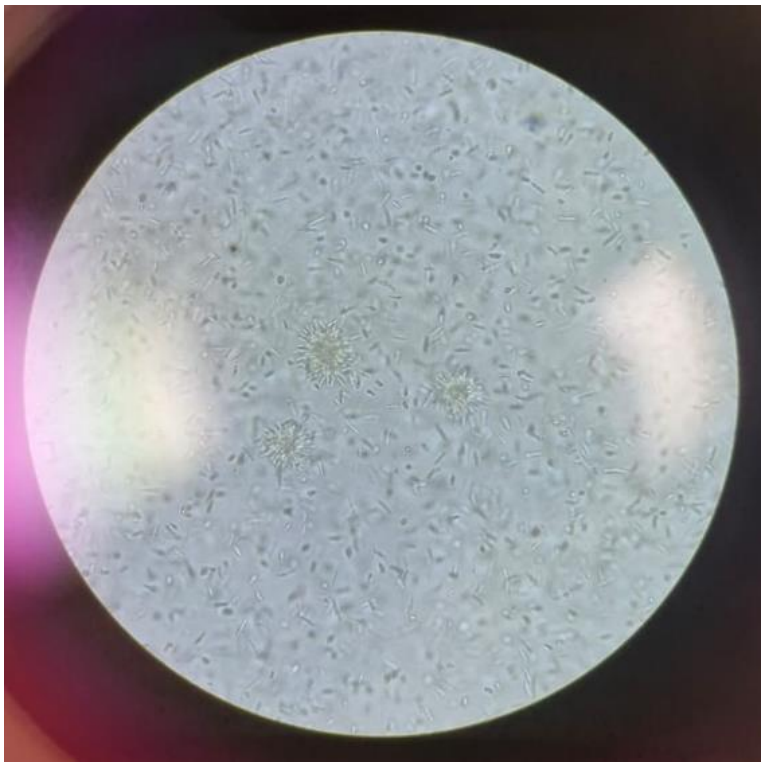


Figura 13. *Crithidia fasciculata* en medio LIT, 25° C, día 2, 400X

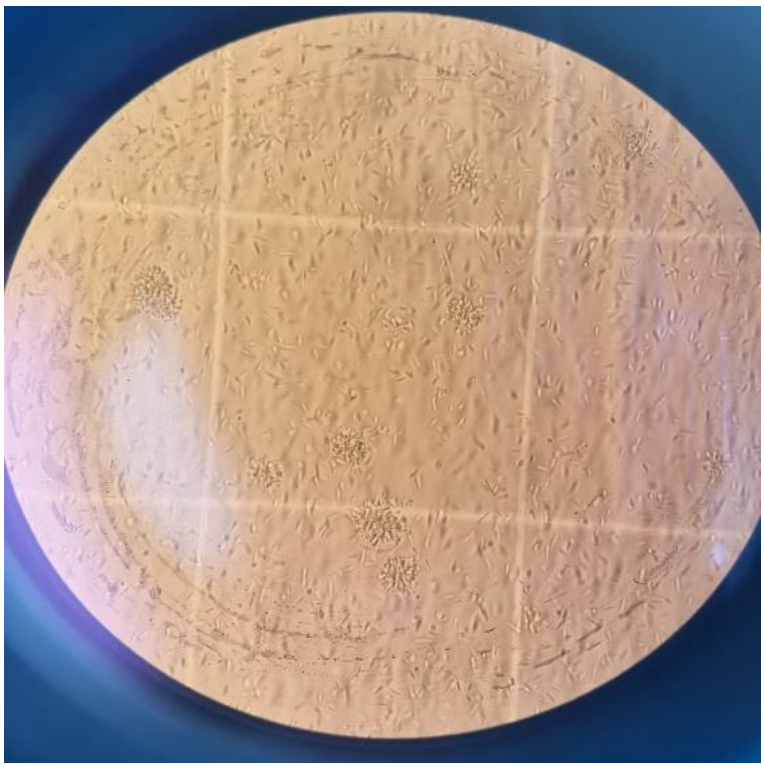


Figura 14. *Crithidia fasciculata* en medio LIT, 25° C, día 7, 400X

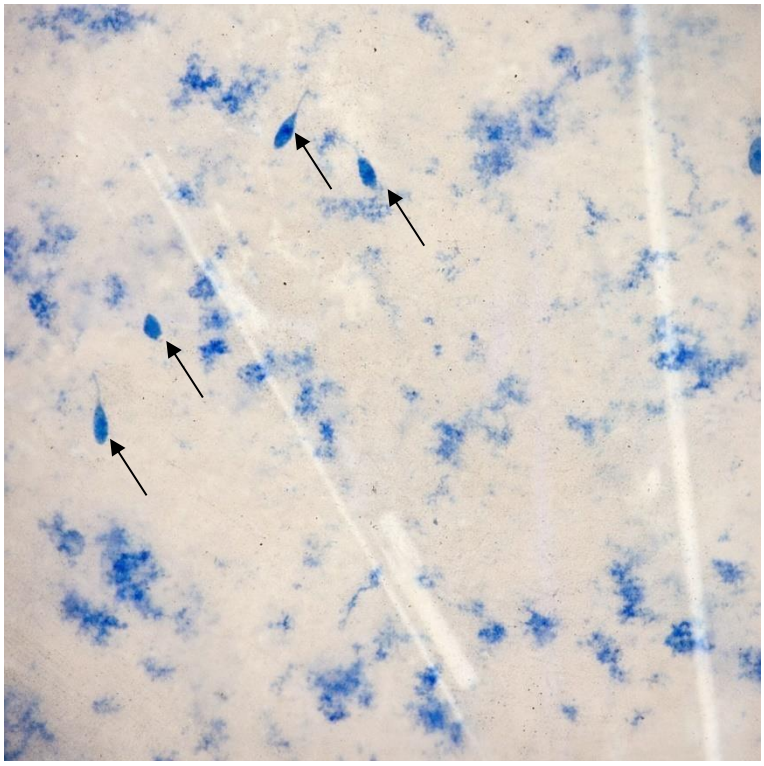


Figura 15. *Crithidia fasciculata* en medio LIT, 25° C, día 12, 400X

Anexo 5. Tinción de *Crithidia fasciculata*



Figura 16. Tinción de suspensión de *Crithidia fasciculata* con azul de tripán

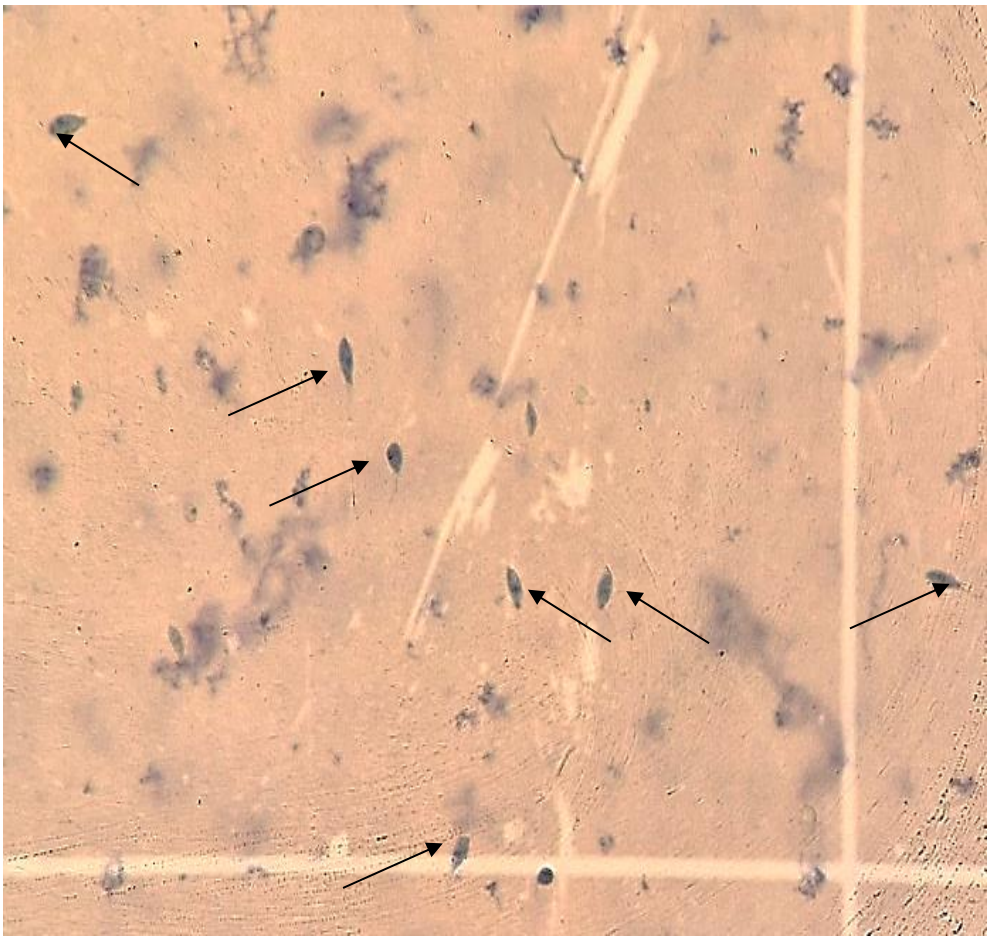


Figura 17. Células no viables de *Crithidia fasciculata* diferenciadas mediante tinción con azul de tripán

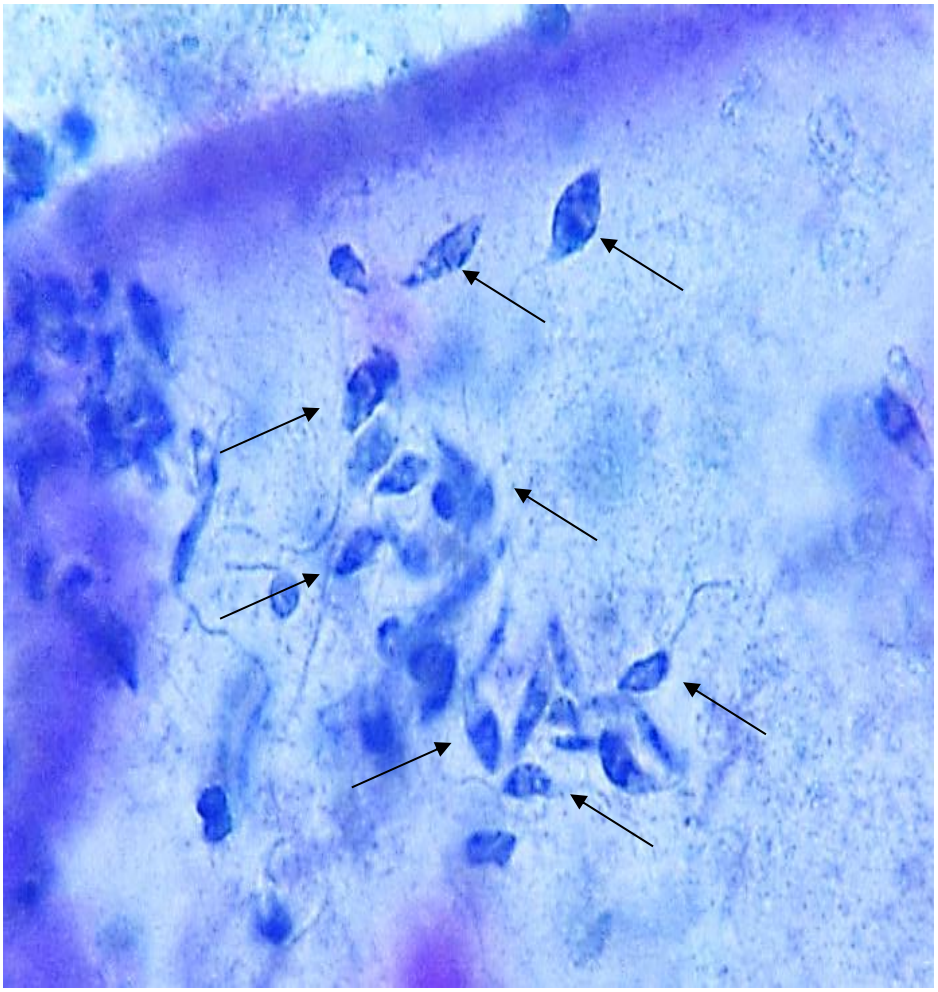


Figura 18. Coanomastigotes de *Crithidia fasciculata* en lámina teñida con Giemsa