

Contribución al estudio de *Endotrypanum schaudinni* (Trypanosomidae)

por

F. Montero-Gei*

(Recibido para su publicación el 30 de junio de 1956)

El genero *Endotrypanum* fue creado por MESNIL y BRIMONT en el año 1908 (10) para incluir en él un nuevo hematozoario descubierto por ellos en la sangre de un desdentado, *Cholæpus didactylus* L. vulgarmente conocido en los lugares en donde habita con el nombre de "perezoso" el cual vive principalmente alimentándose con hojas de árboles del género *Cecropia*. En 1914 DARLING (5), en Panamá, reportó la presencia de este tripanosómido, en preparaciones de sangre a fresco y en frotis teñidos, completando así datos sobre morfología y detalles sobre las costumbres de su huésped vertebrado *Cholæpus didactylus* L. Este autor fue el primero que trató de cultivar este protozoario sembrando sangre obtenida por punción cardíaca en tubos de agar sangre incubados a temperatura ambiente y a 37° C. Sin embargo solamente observó formas en degeneración del parásito y nunca determinó la presencia en estos medios de formas procedentes de una activa proliferación del tripanosoma.

En 1923 LABERNADIE y HUBAC (8) publicaron sus resultados en relación a *Endotrypanum* dando datos respecto a su morfología y a las condiciones necesarias para el mantenimiento en cautiverio de los desdentados, principalmente en lo referente a su alimentación.

En 1925 WENYON y SCOTT (13) publicaron una pequeña nota acerca de la observación de *Endotrypanum schaudinni*, en láminas de sangre periférica de un "perezoso" llamado por ellos *Bradypus didactylus*, que había muerto en el Jardín Zoológico de Londres. El nombre científico del desdentado no coincide en la actualidad con ninguna de las especies, pero suponemos se trataba de un *Cholæpus*, ya que los animales del género *Bradypus* soportan muy mal el cau-

En 1944 CUNHA y MUNIZ (4) publicaron un trabajo bastante completo sobre *Endotrypanum schaudinni*. Estos autores lograron cultivar por primera vez

* Laboratorio de Microbiología Universidad de Costa Rica.

en 1938 este protozooario en tubos con medio de Nöller, obteniendo abundante crecimiento, sobre la superficie del medio, de flagelados con características de leptomonas.

En 1914 EMMANUEL DÍAS (cit. en 4), tuvo ocasión de efectuar siembras en el mismo medio con sagre de *Cholæpus didactylus*. L. naturalmente infectado con *Endotrypanum* obteniendo también cultivo abundante de estos flagelados. Con este material los autores brasileños hicieron la descripción morfológica del parásito en sangre periférica y de las formas de cultivo. Teniendo en su poder dos cepas de *Endotrypanum* realizaron trabajos inmunológicos, (pruebas de precipitación y de fijación del complemento) en relación con otros miembros de la familia *Trypanosomidæ*, intentos de infección de especies del género *Rhodnius* por medio de un xenodiagnóstico artificial e inoculaciones en animales experimentales de laboratorio.

En 1953 TREJOS y MONTERO-GEI (12) reportaron la presencia de este tripanosómido en Costa Rica, parasitando *Bradypus griseus griseus*.

CARACTERISTICAS FUNDAMENTALES DE LOS HUESPEDES VERTEBRADOS

Los huéspedes vertebrados de este hemoflagelado pertenecen a los géneros *Bradypus* y *Cholæpus* cuya posición taxonómica según GOODWIN (6) es la siguiente: Clase Mammalia, Sub Clase Eutheria, Orden Edentata, Familia *Bradypodidæ* con el Género *Bradypus* y familia *Cholæpodidæ* con el género *Cholæpus*.

Las especies costarricenses son: *Bradypus griseus griseus* (Gray 1871) Allen 1891 (9) y *Cholæpus hoffmanni* Peters 1858 (9). La primera de las especies se caracteriza por la posesión de tres dedos en las patas delanteras (Fig. 1), presentando los machos una mancha en bajo relieve de pelo corto en el lomo, de llamativo color naranja y negro (Fig. 2). Son de tamaño mediano, con cola corta y el pelo de la parte superior de la cabeza inclinado hacia adelante. Pelaje áspero, relativamente corto y denso, con una segunda cubierta de lana. El color de los brazos hasta los hombros, del cuello y de la cabeza es grisáceo. La cara blanca, con estrías negras sobre los ojos, las cuales se extienden hacia atrás y hacia abajo, hasta la garganta. Dorsal blancuzco en donde la hembra posee una línea media, oscura.

En Costa Rica viven en clima caliente, y se alimentan principalmente de hojas y tallos tiernos de árboles del género *Cecropia* (Fig. 3), conocidos con el nombre de "guarumo", caracterizados por sus grandes hojas peltadas digitadas, y por sus tallos con nudos muy marcados. Nunca trata de hacer nido, ni de guarecerse. Normalmente duerme en una rama o tallo vertical agarrándose fuertemente con las extremidades y descansando la cabeza entre las patas delanteras.

Una de sus peculiaridades es el crecimiento de algas en su pelo; de ahí que la mayor parte de los individuos presenten abundancia de estos vegetales, que pueden secarse durante el verano, pero que durante el invierno vuelven a tomar el color verde. Su captura es fácil de realizar, debido a sus movimientos lentos, de donde ha tomado el nombre de "perezozo" con que lo conocen nuestros campesinos. Soportan muy mal el cautiverio y por esa razón no hemos podido mantenerlos por un tiempo suficiente en el laboratorio, para estudiar su parasitismo.

Capturamos un total de seis ejemplares distribuidos en el país de la siguiente manera: dos hembras adultas en la región de Guápiles, provincia Limón. Tres hembras adultas a unos cinco kilómetros al Sureste de la ciudad de Turrialba, provincia de Cartago. Un macho adulto sobre la carretera a Turrialba.

De estos uno presentó infección doble por *Endotrypanum schaudinni* y *Trypanosoma legeri*. Los demás no presentaron ningún hemoparásito a excepción del macho al que se le encontró una microfilaria en sangre periférica.

Cholæpus hoffmanni se parece en general a *Bradypus griseus griseus*, pero contrasta notablemente en que el número de dedos y uñas delanteras se reduce a dos (Fig. 4). El pelo de la cabeza se inclina hacia atrás. No tienen cola, y la cara interna de las patas delanteras y traseras es glabra. Son desdentados de gran tamaño con caninos muy desarrollados en ambas quijadas, agudos, rozando el uno con el otro (Fig. 5). Presenta extremidades largas, con pelo abundante, suelto y áspero. Ojos relativamente grandes, rodeados por una zona de pelo corto y negro y orejas pequeñas ocultas bajo el pelaje (Fig. 6).

La especie costarricense varía mucho de color. El pelo de la cabeza y del lomo es blancuzco en la base: las extremidades delanteras, las traseras, los hombros y la grupa, de color pardo canela. La parte ventral del mismo color con base pardusca. Aunque de movimientos lentos en comparación con la mayoría de los otros mamíferos, son mucho más rápidos que los del género *Bradypus*, de ahí el nombre "perico ligero" con el cual se les conoce en nuestro país, en donde habitan en regiones frías, presentando crecimiento de algas sobre el pelo, las que proliferan durante la estación lluviosa, teniendo la mayoría un tinte verdoso. Durante el verano las algas se secan y su color varía del pardo claro al oscuro. Este fenómeno de diversidad de colorido puede apreciarse muy bien en los ejemplares capturados en invierno y que se mantienen en el laboratorio por un tiempo más o menos prolongado, alimentándolos con frutas muy maduras, especialmente bananos y con las hojas de una planta trepadora conocida en nuestro medio con el nombre vulgar de "churrystate", perteneciente al género *Convolvulus*. En los bosques se alimentan generalmente durante la noche con hojas y tallos tiernos de varios árboles, pero principalmente de aquellos conocidos con el nombre de "burío"; pertenecientes al género *Apeiba*. Son sumamente agresivos, lo que dificulta en gran parte su captura y su manipuleo en el laboratorio.

A través de nuestras investigaciones hemos tenido la oportunidad de examinar un total de quince ejemplares provenientes de los siguientes lugares:

nueve ejemplares de los Montes del Tablazo, situados al sur de la provincia de San José. Tres hembras (2 adultas y 1 joven) cinco machos (4 adultos y 1 joven). Dos machos adultos, uno de las estribaciones del Volcán Poás, provincia de Alajuela, y otro de un lugar cercano a la población del Rosario, sur de la provincia de San José. Tres machos jóvenes capturados en la Carpintera, Coris y Santa Cruz de Turrialba respectivamente, en la provincia de Cartago. Una hembra adulta de Santa Cruz de Turrialba.

Encontramos parasitados por *Endotrypanum schaudinni* dos hembras adultas, y un macho joven procedentes del Tablazo y otro macho adulto de las estribaciones del Poás, material que nos ha servido para la realización del presente trabajo.

MORFOLOGIA DEL PARASITO

EN SANGRE DE *BRADYPUS* Y *CHOLÆPUS*

PREPARACIONES A FRESCO

Con sangre de una hembra adulta de *Cholæpus hoffmanni*, capturada en las montañas del Tablazo, realizamos observaciones a fresco.

Usando la óptica de contraste de fases a 1.500 diámetros, se observa un tripanosómido dentro de un eritrocito con movimiento activo y ondulatorio de su extremidad anterior, movimiento éste que deforma al glóbulo, dando la impresión a veces de que la extremidad se proyectara fuera del mismo. En la extremidad posterior del parásito se ven numerosos gránulos oscuros rodeando una esfera muy refrigente y clara, de 1,5 μ de diámetro. Cuando el movimiento cesa, éste queda inmóvil durante algunos segundos, permaneciendo la extremidad anterior plegada sobre el cuerpo. No fue posible observar núcleo ni cinetoplasto.

Con la óptica corriente, a 1.500 diámetros, se aprecian características semejantes a las anteriores, y se encuentran los mismos gránulos y la esfera refringentes, que suponemos sea una vacuola, un poco más oscura. En la región en donde no hay gránulos, el citoplasma se muestra homogéneo.

En otro ejemplar observado con contraste de fases, el flagelo se aprecia nítidamente, y la vacuola localizada en el tercio anterior está rodeada por gránulos negros, que forman además un grupo en la extremidad posterior. Como en el caso anterior, no se observa el núcleo ni el cinetoplasto, y es de advertir que la estructura del eritrocito se fue perdiendo durante el tiempo de observación. Sin contraste de fases, el eritrocito no se ve, pero aquellos que están situados a su alrededor conservan claramente su morfología.

En otro parásito que se observó con contraste de fases, el eritrocito se veía perfectamente al principio, más oscuro que los demás, pero quince minutos después no fue posible observarlo, habiendo el *Endotrypanum* disminuido su movimiento y presentándose claramente redondeado. Además de la vacuola,

apareció en la extremidad anterior una esfera rodeada por una tenue membrana clara, que pareciera ser el núcleo.

Esperando concentrar eritrocitos parasitados, centrifugamos sangre oxalata y, tomando de las capas superiores una muestra del estrato corpuscular, en donde esperábamos encontrar un mayor número de parásitos, hicimos preparaciones para realizar observaciones a fresco.

El número de parásitos no fue mayor que en las preparaciones sin concentración, pero observamos una forma extracelular, con sus dos extremidades aguzadas, teniendo unas 16μ de longitud, por cinco de ancho en la parte media y presentando pocas granulaciones distribuidas por todo el citoplasma. Además, su flagelo con longitud igual a las dos terceras partes del cuerpo, era muy móvil, pero permanecía adherido a los eritrocitos sin poder trasladarse de un lugar a otro activamente como lo hacen las especies del género *Trypanosoma*. No pudimos distinguir la vacuola observada con tanta claridad en los ejemplares anteriores, ni otros detalles de su estructura interna. Sin contraste de fases se ve un citoplasma finamente granulado. En otra preparación del mismo material observamos otro parásito extracelular con movimientos flagelares muy activos, distinguiéndose la vacuola refringente rodeada de granulaciones oscuras.

PREPARACIONES TEÑIDAS

La observación de las formas parasitarias está basada en el estudio de láminas coloreadas por el método Leishman-Giemsa, de sangre obtenida por punción venosa o cardíaca, ya que la piel de las extremidades es sumamente dura, lo que dificulta en parte la extracción de la muestra en ese sitio. Además, teníamos interés en conseguir suficiente material para realizar siembras en los diferentes medios de cultivo recomendados para la familia *Trypanosomidae*.

El tripanosómido de forma alargada en el interior de los eritrocitos presenta la extremidad posterior redondeada y la anterior aguzada prolongándose por un flagelo que se adosa a la curvatura de la membrana del glóbulo, tal como se aprecia fácilmente en la Fig. 7. A pesar de que DARLING (5) reporta y da esquemas en los cuales el flagelo sale visiblemente del eritrocito, no pudimos apreciar este fenómeno en preparaciones hechas inmediatamente después de la obtención de la sangre. En la extremidad anterior, confirmamos la presencia de una pequeña membrana ondulante bordeada en su parte superior por el flagelo, apreciándose nítidamente en algunos ejemplares, (Fig. 8). En el trabajo de DARLING, (5) se cita la posibilidad de la existencia de esta membrana ondulante y LABERNADIE y HUBAC (8) citan su presencia en algunos ejemplares observados por ellos. El flagelo se origina en el cinetoplasto, cuerpo baciliforme fuertemente coloreado situado a un lado y transversalmente al eje mayor del parásito.

La mayoría de los elementos presentan un núcleo esférico, bien defi-

nido, situado en la parte media o en la extremidad anterior del parásito, constituido por una cromatina fina con disposición radial. En algunos ejemplares se puede apreciar condensaciones de cromatina adheridas a la superficie interna de la membrana nuclear, (Fig. 9).

La situación del núcleo es sumamente importante para nosotros, ya que todos los autores que han trabajado sobre el tema lo sitúan en el tercio posterior, quedando el cinetoplasto anterior, dando como resultado formas de criticidia. En resumen podemos decir, que todas las formas encontradas en sangre han sido descritas hasta el momento como criticidias endoglobulares. Solamente CUNHA y MUNIZ (4) reportan la presencia de escasas formas de tripanosomas en los medios de cultivo, aspecto que discutiremos más adelante.

Hemos tenido la oportunidad de observar que la mayoría de los parásitos son verdaderos tripanosomas, encontrando estas formas únicamente en las muestras de sangre de *Cholæpus*, donde realmente las criticidias observadas no pasan de un tres por ciento, tanto en frotis directos como en los preparados con sangre oxalata a temperatura ambiente.

En 1953 TREJOS y MONTERO-GEI (12) habían reportado ya la existencia del tripanosómido de MESNIL y BRIMONT en la sangre de *Bradypus griseus griseus*, material que tuvimos la oportunidad de estudiar nuevamente. Las formas de *Endotrypanum schaudinni* en la sangre del *Bradypus* capturado en la provincia de Limón, fueron escasas. Llama la atención en este caso que contrariamente a las formas encontradas en *Cholæpus*, todas eran verdaderas criticidias, con núcleo situado en la extremidad posterior y cinetoplasto anterior. (Figs. 10 y 11). En la mayoría de las formas el citoplasma se colorea de azul pálido, presentando algunas veces manchas claras a semejanza de vacuolas, las que se sitúan cerca del núcleo o del cinetoplasto.

En otros parásitos se vieron claramente las granulaciones que se presentaban a contrates de fases, muy refringentes, intensamente teñidas de preferencia en la extremidad posterior.

En sangre oxalata se notó un mejor desarrollo del flagelo a veces proyectado fuera del glóbulo, sin afectar su forma ni su contenido. (Figs. 10 y 12). Al contrario de lo que acontece con algunos esporozoarios, el eritrocito no presentó pigmento alguno ni cambios notables en sus características morfológicas. A pesar de que MESNIL y BRIMONT (10) reportan haber observado infección múltiple en un mismo eritrocito, no nos fue posible a través de nuestras observaciones apreciar este fenómeno. Además, los mismos autores anotan la presencia de dos cuerpos alargados fagocitados por un monocito que suponen son parásitos, fenómeno este que tampoco tuvimos oportunidad de confirmar.

EN LOS MEDIOS DE CULTIVO

En el transcurso de nuestras investigaciones tuvimos la oportunidad de aislar cinco cepas de *Endotrypanum schaudinni*: cuatro de *Cholæpus hoffmanni* y una de *Bradypus griseus griseus*.

Los medios usados para el aislamiento primario fueron: Agar Sangre Glucosado, N.N.N. y RUGAI (11).

El desarrollo en el medio de Agar Sangre Glucosado es bastante bueno, pero con ninguna de nuestras cepas fue posible obtener el abundante crecimiento de superficie, reportado por los autores brasileños, ya que ellos en su trabajo dicen que la exhuberancia de los cultivos era sólo comparable a la de ciertos flagelados de insectos, pertenecientes al género *Herpetomonas*.

El medio que nos ha dado mejores resultados por su abundante proliferación es el de Rugai. Este fue escogido para el mantenimiento de nuestras cepas durante más o menos un mes, al final del cual efectuamos el trasplante correspondiente, y en esas condiciones hemos logrado mantener cepas durante 44 meses. El crecimiento en este medio es abundante principalmente en el agua de condensación, ya que en la superficie crecen colonias pequeñas y transparentes, similares a las que presentan las especies del género *Leishmania*.

También empleamos medio de N.N.N. en aislamiento primario pero no con iguales resultados.

La técnica consistió en la extracción de sangre de la vena cefálea del brazo o por punción cardíaca. Los medios fueron inoculados con tres o cuatro gotas de sangre e incubados a temperatura ambiente (22-25° C) presentando más o menos entre el cuarto y quinto día un crecimiento fácilmente observable al examen microscópico en gota pendiente.

En vista de que el *Bradypus* se encontró parasitado por hemoflagelados de diferente habitat: extra e intracelulares, se trató de hacer su separación con el objeto de obtener cultivo puro, pero los resultados fueron negativos.

El procedimiento usado fue el siguiente: extraer sangre por punción cardíaca, mezclar una parte con heparina y otra con oxalato de potasio. Centrifugar por 10 minutos a baja velocidad (1.000 r. p. m.) sembrar con pipeta Pasteur medio de Rugai con plasma y sedimento, agregando previamente 1.000 unidades de penicilina G. potásica cristalina por cada cc. de medio, para controlar la posibilidad de contaminación bacteriana. El mismo procedimiento fue seguido con la sangre oxalata. Los cultivos no presentaron ningún crecimiento de *Trypanosoma legeri* ni de *Endotrypanum schaudinni*, por lo que dedujimos que ambos anticuagulantes y posiblemente el efecto físico de la centrifugación, habían perjudicado el crecimiento de los citados tripanosomas.

Al observar preparaciones a fresco de cultivos de 4 a 6 días en medio de Rugai, a temperatura ambiente, encontramos los siguientes elementos: formas leishmanioides de 4 a 6 μ de diámetro, sin flagelo libre e inmóviles; formas redondeadas con flagelo corto, con predominio de formas alargadas que varían entre 8 y 12 μ de longitud por 2 de ancho, dotadas de un flagelo cuyo promedio de longitud oscila entre 10 y 20 μ .

Estas formas recuerdan muy bien a las leptomonas, presentando movimientos flagelares muy activos que las hacen atravesar el campo microscópico con gran rapidez, presentando algunas de ellas citoplasma con gran cantidad de vacuolas a veces con cuerpos danzantes en su interior.

No fue posible observar núcleo ni cinetoplasto aún en contraste de fases. En los cultivos jóvenes predominan las leptomonas que frecuentemente se reúnen formando rosetas de gran tamaño.

En los cultivos viejos la cantidad de formas leishmanioides aumenta, lo mismo que los elementos en degeneración.

Basándonos en el movimiento nos fue imposible observar formas que pudieran ser consideradas como crritidias o tripanosomas, lo que confirmamos en láminas preparadas a partir de colonias transparentes y superficiales, coloreadas con los métodos de Leishman-Giemsa, y hematoxilina férrica, tratando de demostrar con esta última el núcleo vesiculoso de estos flagelados.

Los láminas preparadas a partir del agua de condensación no dieron buenos resultados, debido a la gran cantidad de precipitado producido por la difusión de hemoglobina en contacto con el colorante. La técnica consistió en tomar con sumo cuidado las colonias transparentes de la superficie para realizar la coloración.

Todos los elementos presentan un núcleo con cromatina distribuida en pequeños gránulos, poco compactos, mientras que las formas en degeneración lo presentan picnótico y vacuolado.

El cinetoplasto baciliforme que en las formas leishmanioides, (Fig. 13), se sitúa a la par del núcleo, en las leptomonas se localiza en la extremidad anterior, punto en donde se origina el flagelo (Fig. 14). Formas en división fueron frecuentemente observadas y además, en menor número, elementos redondeados con un núcleo, y tres flagelos con sus respectivos cinetoplastos, a pesar de que en varias oportunidades observamos cómo el núcleo se divide antes que el cinetoplasto (Figs. 15 y 16). Desde luego las láminas presentaron todas las formas intermedias entre leishmanias y leptomonas.

CUNHA y MUNIZ (4) reportan que en las preparaciones de cultivos por ellos estudiados, observaron raramente la existencia de verdaderas formas de tripanosoma con cinetoplasto en la extremidad posterior del parásito, membrana ondulante y flagelo libre. Sin embargo, en otro párrafo dicen textualmente: "En los cultivos de las dos cepas estudiadas por nosotros nunca tuvimos ocasión de observar formas de critidia". De esto se deduce que si realmente fueron formas de tripanosoma las observadas por los autores brasileños, éstas eran demasiado escasas, debido a que la fase anterior no fue reportada, lo que va en apoyo de nuestras observaciones, ya que en ninguna de las cepas aisladas encontramos formas en donde el cinetoplasto estuviese situado a la altura del núcleo o posterior a éste, eliminando así la posibilidad de reportar en nuestra experiencia formas de critidia o de tripanosoma. Podría aducirse, tal como ocurre con especies del género *Trypanosoma*, que la constitución del medio influya en la mayor o menor producción de tripanosomas metacíclicos, pero probablemente no en este caso en el cual no se presentaron del todo.

CICLO EVOLUTIVO DEL PARASITO

REPRODUCCION EN EL HUESPED VERTEBRADO

Estamos de acuerdo, al igual que los autores que han trabajado sobre este tema, que *Endotrypanum schaudinni* no presenta formas de división en sangre periférica. En ningún momento durante el transcurso de las investigaciones hemos notado el menor signo de división en las estructuras que primeramente la inician como son el núcleo y el cinetoplasto.

Con la idea de que la división del flagelado se realiza en algún órgano íntimamente relacionado con el tejido sanguíneo, decidimos realizar esplenectomía y biopsia hepática de una hembra de *Cholæpus* con abundantes parásitos en sangre periférica.

Con el material así obtenido se hicieron frotis por aposición y el resto fue fijado en formol al 10% para estudio histológico posterior. Las preparaciones por aposición fueron coloreadas con Leishman-Giemsa sin observar las formas de división del tripanosómido. Únicamente apreciamos algunas formas extracelulares que probablemente provenían de los eritrocitos, muy abundantes en este material. En el bazo se notó abundante pigmento melánico que se forma posiblemente debido a la hemoglobina metabolizada por el parásito.

Dos días después de la intervención quirúrgica el animal murió con íleo paralítico; se le practicó la autopsia con resultados negativos en cuanto a helmintos y protozoarios del tracto digestivo. El muñón del bazo, así como el hígado y la herida operatoria no sangraron. Preparamos frotis de médula ósea, riñón, cerebro y pulmón, sin haber encontrado en ninguno de ellos, evidencias de división del *Endotrypanum schaudinni*. Para realizar estudio histológico fijamos en formol los siguientes órganos y tejidos: músculo estriado, pulmón, piel, diafragma, vejiga, miocardio, aorta, estómago, diferentes porciones de intestino delgado y grueso, cerebro y placenta, ya que la hembra presentó un útero grávido con un feto que creemos tuviera unos cuatro meses.

En los cortes de este material, coloreado con hematoxilina-eosina y tricrómico de Gallego, no encontramos nada que nos indicara formas en división del flagelado.

También con el objeto de aclarar el ciclo evolutivo en el huésped vertebrado, realizamos la autopsia del *Bradypus griseus griseus*, con infección doble por *Endotrypanum* y *T. legeri*, que murió en el laboratorio poco tiempo después de su captura. Para su estudio histológico fijamos en formol: diafragma, estómago, vejiga, páncreas, bazo, hígado, glándula mamaria, músculo estriado, pulmón, riñón, mesenterio, miocardio, suprarrenal, intestino grueso y placenta, ya que como en el caso anterior se trataba de una hembra grávida.

Una vez cortado y coloreado, el material se mostró negativo, a excepción del músculo esquelético proveniente de un pectoral, el que presentó varios nidos de parásitos (Fig. 17).

Los nidos son de varios tamaños y en algunos cortes encontramos secciones que tenían hasta $93 \times 465 \mu$. Pareciera que pueden alcanzar grandes dimensiones pues se ve la misma sección en varios cortes transversales, y de ser así estarían colocados longitudinalmente siguiendo el sentido de las fibras.

La observación cuidadosa de los nidos denotó la presencia de elementos falciformes en los cuales se apreció bien el núcleo, pero no fue posible observar con nitidez el cinetoplasto, razón por la cual no podemos afirmar que se trate de las formas tisulares de *Endotrypanum*, ya que no podemos descartar la posibilidad de una toxoplasmosis. Además debemos recordar que este ejemplar presentó en su sangre periférica dos hemoflagelados.

Alrededor de los nidos no apreciamos ninguna reacción inflamatoria, y la ausencia de cápsula y trabéculas permite excluir la posibilidad de que se trate de *Sarcocystis*.

Los nidos observados con objetivo de inmersión se presentan como conglomerados de partículas azuladas de aspecto borroso, constituidos por cantidades enormes de parásitos, muy juntos unos de otros, razón por la cual no es posible individualizarlos y observar su estructura.

SALIDA DE LOS ERITROCITOS

La presencia de formas extracelulares fue observada solamente en sangre que permaneció a temperatura ambiente, fenómeno que comprobamos durante el estudio de preparaciones entre lámina y laminilla, ya que al principio todos los elementos fueron intracelulares. Para comprobar la observación anterior realizamos la siguiente experiencia: tomamos sangre oxalata de una hembra adulta de *Cholæpus hoffmanni* con abundantes parásitos en sangre periférica, para hacer frotis a los dos, diez, veinte, treinta, cuarenta, cincuenta, sesenta, noventa y ciento veinte minutos, manteniéndola a temperatura ambiente.

El examen microscópico de las láminas mostró que entre los veinte y treinta minutos los tripanosomas comenzaban a abandonar las células rojas; a las dos horas la mayoría de los elementos eran extracelulares y relativamente pocos permanecían aún dentro de los eritrocitos.

Es de interés anotar en este caso, que los parásitos extracelulares se colorean mejor que los intracelulares, apreciándose mejor el flagelo y la membrana ondulante (Figs. 18 y 19). El hecho de que a temperatura ambiente muestren un mejor aparato locomotor, nos hace pensar en la posibilidad de que este fenómeno se lleve a cabo en el tracto digestivo de algún artrópodo, que pueda servir como huésped intermediario.

INVESTIGACION SOBRE INVERTEBRADOS TRANSMISORES

Con el fin de comprobar el posible papel de algún invertebrado hematófago en la transmisión de este flagelado, hemos investigado en estos desdentados la presencia de ectoparásitos.

En *Cholæpus hoffmanni* solamente encontramos una garrapata del género *Amblyomma*, en un ejemplar capturado en Coris, provincia de Cartago. En la región del Tablazo de donde proviene el mayor número de ejemplares parasitados por *Endotrypanum*, no hemos determinado la presencia de ectoparásitos aún buscándolos inmediatamente después de su captura. Además empleamos la trampa de Shannon con el objeto de capturar algún díptero o hemíptero hematófago de la región, que sirviera como transmisor de la parasitosis, pero no nos fue posible capturar ninguno.

En *Bradypus griseus griseus* colectamos los siguientes ectoparásitos: *Cryptoses cholæpi* Dyar 1908 lepidópteros encontrados en gran cantidad en todos los ejemplares capturados viviendo en íntima relación con el desdentado y posiblemente alimentándose de pelos y escamas de su piel, abandonándolos en cautiverio. (Fig. 20). *Trichillum bradyorum* Boucomont, y otro coleóptero de la familia *Scarabeidæ* que no fue posible clasificar.

El único ectoparásito hematófago examinado cuidadosamente con el fin de determinar su posible papel de huésped intermediario de este tripanosoma fue *Amblyomma gertschi* Cooley et Kohls arácnido muy corriente en estos desdentados. Los ejemplares se colocan entre lámina y laminilla en solución salina fisiológica, y se trituran por compresión con el objeto de saber si contienen o no flagelados. Nuestra búsqueda fue infructuosa a pesar de que ellos se habían alimentado de un *Bradypus* que presentaba parásitos en sangre periférica.

Un hemíptero buscado infructuosamente fue *Belminus costaricensis* (7) ya que el primer ejemplar reportado en Costa Rica fue colectado en un "perezoso" por W. Schaus, en la región de Esparta. No se ha observado infección natural por tripanosomas en *Belminus* ni tampoco hemos tenido conocimiento de que se haya realizado la infección artificial en el laboratorio. El hecho de que uno de los ejemplares de Costa Rica haya sido capturado sobre un "perezoso", no indica necesariamente su condición de parásito de este vertebrado, ya que otros ejemplares se encontraron en nidos de *Nasutitermes* y *Trigona*.

Resumiendo podemos decir que hasta el momento se desconoce la existencia de un invertebrado en el cual se pueda realizar la evolución de *Endotrypanum schaudinni* y que actúe como su transmisor, pero basándonos en las características de la familia, creemos en su existencia, y desde luego seguiremos nuestras investigaciones en ese sentido.

XENODIAGNÓSTICO

CUNHA y MUNIZ (4) partiendo de material de cultivo, hicieron experiencias para comprobar si estas formas eran capaces de sufrir adaptación o evolución en el tubo digestivo de *Rhodnius prolixus*. Para ello alimentaron numerosos ejemplares en varios estadios de evolución provenientes de criaderos de laboratorio, con una mezcla de dicho material y sangre de cobayo. Durante dos meses examinaron periódicamente el contenido de la última porción del intestino

de los ejemplares, sin llegar a constatar la presencia de formas evolutivas del tripanosoma.

Nosotros realizamos xenodiagnóstico con larvas y ninfas de *Triatoma dimidiata* y *Triatoma infestans* provenientes de nuestros criaderos, en un *Cholæpus* con abundantes parásitos en sangre periférica.

El examen periódico del contenido intestinal de los triatomas se mostró negativo observándose únicamente con contraste de fases, en *Triatoma dimidiata*, elementos que por su forma, tamaño y constitución, podrían ser considerados como formas en degeneración de *Endotrypanum schaudinni*.

Veinticinco días después de la primera comida, los triatomas fueron nuevamente alimentados en el mismo *Cholæpus* con resultados siempre negativos.

INOCULACIONES

EN ANIMALES DE LABORATORIO

Con relación a este punto, DARLING (5) realizó la primera experiencia al inocular intraperitonealmente un *Bradypus* joven, cuya sangre se mostró negativa por *Endotrypanum* y otros parásitos, con 2 cc. de sangre cardíaca de un "perezoso" infectado con este flagelado. Los tripanosomas no aparecieron en su sangre periférica, aún cinco días después de la inoculación, cuando el animal murió. Un perro, un gato, dos ratones blancos, dos cobayos y un conejo, fueron también inoculados dando resultados negativos.

CUNHA y MUNIZ (4) partiendo de material proveniente de cultivos han realizado varias tentativas para infectar diversos animales tales como *Bradypus tridactylus*, *Didelphis azaræ*, *Mus musculus* y *Leptodactylus ocellatus*, por vía subcutánea, intraperitoneal e intravenosa, haciendo notar que algunos de estos animales habían sido esplenectomizados. Habiendo sido inoculados con grandes dosis de cultivo, todas las tentativas para transmitir la infección fueron negativas.

Nosotros a partir de sangre oxalatada de un *Cholæpus* adulto con *Endotrypanum* realizamos inoculaciones por vía intraperitoneal, subcutánea, e intramuscular en ratones y cobayos. Las preparaciones a fresco y coloreadas de sangre periférica de estos animales se mostraron negativas después de mantenerlos en observación por un largo período. Inoculamos también un *Cholæpus* muy joven con un 1 cc. de sangre oxalatada, por vía subcutánea, manteniéndose negativo 25 días después de la inoculación, fecha en que el "perezoso" murió. En la necropsia no se encontró nada de particular obteniéndose resultados negativos en la búsqueda de los parásitos.

Con formas de cultivo también realizamos inoculaciones en ratones jóvenes y cobayos, ya que podría pensarse que las formas sanguíneas de este protozooario no fueran infectantes, pero sí las de cultivo, semejantes a las que se desarrollan en el posible vector invertebrado. Sin embargo, los resultados fue-

ron iguales a los anteriores, manteniendo el parásito hasta el momento, gran especificidad hacia *Bradypus* y *Cholæpus*.

Teniendo en nuestro laboratorio un *Cholæpus* macho adulto negativo por hemoflagelados tanto en preparaciones a fresco y coloreadas, como por hemocultivos, realizamos inoculaciones masivas con material de cultivo de la cepa N° 5 mantenida en Rugai a temperatura de habitación durante seis días. La vía fue intravenosa y el inóculo de 10 cc., realizando en un lapso de dos meses, seis inoculaciones. Después de la última inoculación el suero del animal presentó poder inmovilizante contra las formas de cultivo, lisándolas posteriormente.

La experiencia se realizó con una cepa mantenida por mucho tiempo en medios artificiales, por lo que los flagelados podrían haber perdido adaptabilidad para su huésped vertebrado. Como sabemos las cepas de los diferentes tripanosómidos pierden su virulencia cuando se mantienen por largo tiempo "in vitro", y sólo la conservan y aún la aumentan en el invertebrado transmisor.

Con el mismo material de la cepa N° 5 el autor se autoinocula con 1 cc. por vía intramuscular, observándose una reacción aparentemente positiva inmediata en el sitio alrededor del punto de inoculación, con eritema y aumento de temperatura, que desapareció a las 48 horas, mostrándose la piel aparentemente normal. A los veinticinco días después de la inoculación se presenta malestar general, temperatura y sintomatología marcada del tracto digestivo, sin presentar parásitos en sangre periférica. En estas circunstancias se provoca un choque adrenalínico para contraer el bazo, tomando sangre veinte minutos después para preparación de láminas y hemocultivos, dando resultados negativos.

Además de la posibilidad de pérdida de virulencia de los tripanosómidos en los medios de cultivo, BERKER *et al.* de acuerdo con VON BRAND (1) han demostrado la importancia de la dieta en los animales que van a ser inoculados con tripanosomas. La deficiencia de ácido pantoténico en ratas produce infecciones más intensas con *Trypanosoma lewisi*, y ya es conocido que, palomas con dieta exenta de complejo B, pueden adquirir infección por *T. brucei* para el cual como se sabe, son normalmente resistentes. En otras palabras se ha demostrado experimentalmente la importancia que tiene el estado nutricional de un animal para adquirir la infección con tripanosomas, que naturalmente tienen como huésped otros animales, guardando para ellos una especificidad bastante grandes. Otro factor digno de tomarse en cuenta es la edad de los animales inoculados, lo que nos ayudaría a explicar en parte, algunos puntos referentes a los resultados negativos de la inoculación de *Endotrypanum schaudinni*, en diferentes animales de laboratorio.

EN EMBRIÓN DE POLLO

Existiendo en la literatura reportes sobre el cultivo de tripanosomas en embrión de pollo, CONEJOS (2), inoculamos *Endotrypanum* en saco vitelino con la técnica de COX (3).

Dos días después de la inoculación abrimos uno de los huevos con embrión móvil, realizando con este material observaciones a fresco y en preparaciones coloreadas, sin lograr poner en evidencia ninguna estructura reconocible como *E. schaudinni*. Abrimos otro huevo después de seis días de inoculados y preparamos láminas de saco vitelino, corazón, cerebro, hígado, pulmón y membrana corioalantoidea, con resultados negativos.

CARACTERÍSTICAS DEL GENERO *ENDOTRYPANUM*

MESNIL y BRIMONT (10) manifiestan, que por el conjunto de sus características, *Endotrypanum schaudinni* recuerda a los tripanosomas y géneros cercanos. Por su parasitismo intracelular se asemeja a los hematozoarios, y por la forma alargada de su cuerpo y ausencia de pigmento a las hemogregarinas. En razón de lo que se sabe acerca de su habitat, pensaron en crear para él un género que denominaron *Endotrypanum*, para recordar sus dos características principales: ser intracelular, y poseer un flagelo bien definido.

Su existencia es un hecho en favor de la idea emitida por Schaudinn y expresada muy claramente por Hartman sobre la relación filogenética entre los tripanosomas y los hematozoarios endoglobulares.

DARLING (5) comenta el trabajo de MESNIL y BRIMONT diciendo que el famoso caso de afinidad entre los hemoflagelados y hemosporidios basado en el trabajo de Schaudinn ha sido desechado, y que la morfología y otros caracteres de *Endotrypanum* lo relacionan más a los géneros *Trypanosoma* y *Leishmania* que a los hemosporidios.

El mismo autor manifiesta que el profesor Michin es de la opinión que el *Endotrypanum*, es probablemente la fase intracorpúscular de un tripanosoma libre en el plasma del mismo huésped. Sin embargo, hace hincapié en que es extraño que este tripanosoma libre no haya sido encontrado en los desdentados, ni animales inoculados. Desde luego el tripanosoma puede presentar una alta especificidad para su huésped vertebrado, motivo por el cual los animales inoculados no mostraron la infección.

Nosotros estamos de acuerdo con DARLING, ya que en el transcurso de las investigaciones no hemos encontrado otro tripanosoma en los desdentados, excepto *Trypanosoma legeri* en *Bradypus griseus griseus* el que fue reportado originalmente en otro desdentado *Tamandua tridactyla*. En relación al tripanosoma extracelular visto por MESNIL y BRIMONT 1908 (10) en *Choloepus didactylus*, TREJOS y MONTERO-GEI (12) lo relacionan con *T. legeri* encontrando un parecido grande con las formas cortas de este tripanosómido, excepto en lo referente a membrana ondulante, que no presenta el gránulo terminal del flagelo, ni adopta la forma en C, según se deduce del diseño de los autores ya mencionados.

WENYON (14) considera este ejemplar idéntico a *T. legeri*.

DARLING comenta, que las formas de criticidia sólo aparecen en los cul-

tivos o huéspedes intermediarios de las especies del género *Trypanosoma*, o bien en la especie del género *Critibidia* parásito de artrópodos, para relacionar el caso de *Endotrypanum*, que hasta el momento sólo había presentado formas de critidia intracelulares. En la actualidad este concepto ha variado al aparecer formas de critidia en sangre periférica de ratas infectadas con *Trypanosoma lewisi*. Sin embargo, nosotros reportamos la presencia de verdaderas formas de tripanosoma en este flagelado.

Al obtener CUNHA y MUNIZ (4) las formas de cultivo del tripanosómido se establecen sus características dentro de la familia *Trypanosomidae*. Nosotros diferimos con dichos autores al no encontrar las formas de tripanosoma en los medios de cultivo.

Podemos decir, que el género *Endotrypanum* presenta formas de leishmania y de leptomonas en los medios artificiales de cultivo, y formas de critidia y tripanosoma en el interior de los eritrocitos de sus huéspedes vertebrados. Desde luego, mientras no se conozca perfectamente su ciclo evolutivo no podemos dar sus características para establecer su verdadera posición dentro de la familia.

RESUMEN Y CONCLUSIONES

Se hace una revisión cronológica de la literatura existente sobre *Endotrypanum-schaudinni* MESNIL y BRIMONT 1908, ordenando los conocimientos existentes sobre este interesante tripanosómido y aportando algunos más.

Se da posición taxonómica y características de sus huéspedes vertebrados, *Bradypus* y *Cholæpus*, con algunas observaciones sobre su biología y distribución geográfica de los ejemplares capturados en nuestro país.

Se observa la morfología del parásito tanto a fresco como en sangre coloreada, reportando por primera vez formas de tripanosoma en *Cholæpus hoffmanni*.

Reportamos formas intracelulares solamente en las láminas preparadas inmediatamente después de que la sangre fue obtenida.

Damos la técnica y los diferentes medios de cultivo usados en el aislamiento primario del hemoparásito. Se observa la acción perjudicial de anticoagulantes en los medios de cultivo.

Se realiza estudio de las formas de cultivo tanto en preparaciones a fresco como coloreadas, reportando en nuestras cepas solamente formas de leishmania y de leptomonas. Se hace un comentario en relación a las formas de tripanosoma que habían sido reportadas por CUNHA y MUNIZ (4).

Realizamos inoculaciones en diferentes animales de laboratorio con sangre de *Cholæpus* infectado y con formas de cultivo, sin lograr demostrar la infección en ninguno de ellos, posiblemente debido a su gran especificidad hacia los desdentados, lo que fácilmente se deduce por su estricto parasitismo intracelular. Además se comenta la importancia de las condiciones fisiológicas de los animales a inocular.

Con material de cultivo se inocula un *Cholæpus* adulto y se realiza una inoculación humana, dando resultados negativos. Podría pensarse en la pérdida de virulencia de la cepa "in vitro" o en una premunición del ejemplar adulto a la protozoosis.

Formas de cultivo recientemente aisladas se inoculan en saco vitelino de embrión de pollo, con resultados negativos.

Respecto a su ciclo evolutivo el parásito no presenta formas de división en la sangre periférica, no encontrándose en el estudio histológico sus formas tisulares. El hallazgo de nidos parasitarios en un pectoral de *Bradypus griseus griseus* no nos aclara su evolución en el huésped vertebrado, debido en primer lugar a que el "perezoso" se encontraba parasitado con otro tripanosómido, y que en estas formas no fue posible demostrar la presencia de cinetoplasto, lo que hace pensar la posibilidad de una toxoplasmosis.

En sangre oxalata mantenida a temperatura ambiente los parásitos abandonan los eritrocitos y muestran un mejor aparato locomotor. Esto lo relacionamos con su ciclo evolutivo, ya que dicho fenómeno posiblemente se realice en el tracto intestinal de algún artrópodo que actúe como huésped intermediario.

Se colectan varios ectoparásitos entre ellos una garrapata del género *Amblyomma* en *Cholæpus*. En *Bradyus* se reportan varios artrópodos viviendo en íntima relación con el vertebrado: *Cryptoses cholæpi*, *Trichillum bradyorum* y un coleóptero de la familia *Scarabeidæ*. Además *Amblyomma gertschi* que fue estudiado cuidadosamente por ser el único hematófago.

Se busca infructuosamente un hemíptero, *Belminus costaricensis*, que había sido reportado en Costa Rica en un "perezoso". Aunque la búsqueda de un transmisor de esta parasitosis no haya tenido éxito, creemos en su existencia, y seguiremos nuestras investigaciones.

Realizamos xenodiagnóstico en *Cholæpus*, con *Triatoma infestans* y *Triatoma dimidiata*, sin lograr la evolución del parásito.

Se citan las principales características del género *Endotrypanum*, sin poder dar su posición definitiva dentro de la familia *Trypanosomidæ*, por desconocer su ciclo evolutivo.

SUMMARY AND CONCLUSIONS

A chronological review of the existing literature on *Endotrypanum schaudinni* MESNIL and BRIMONT 1908 is made. An arrangement of the existing knowledge on these interesting trypanosomes is attempted and further facts are contributed.

The taxonomic position and characteristics of their vertebrate hosts, *Bradypus* and *Cholæpus*, is given as well as some observations on the biology and geographical distribution on the specimens captured in this country.

The morphology of the parasite has been observed both in fresh as well as in stained preparations, and trypanosome forms have been reported in *Cholæpus hoffmanni* for the first time.

Intracellular forms are reported only in those slides which were prepared immediately after obtaining the blood.

The technique and the different culture media employed in the primary isolation of the hemoparasite are given. The harmful effects of anti-clotting agents in the culture media is noticed. A study of the culture forms is carried out both on fresh as well as on stained preparations, reporting in our strains only the leishmania and leptomona forms. A comment is made in relation to the trypanosome forms that had been reported by CUNHA and MUNIZ (4).

Different laboratory animals were inoculated with blood of infected *Cholæpus* and with culture forms without being able to demonstrate infection in any of them, probably due to their great specificity toward edentates inferred easily from their strict intracellular parasitism. In addition, comments are made on the importance of the physiological state of the animals to be inoculated.

An adult *Cholæpus* and a human being were inoculated with fresh culture forms but negative results were obtained. This might be due to a loss of virulence of the "in vitro" strain or to a state of premunition of the adult specimen to a protozooisis.

Recently isolated culture forms were inoculated into the vitellin sac of the chick embryo with negative results. With respect to its evolutive cycle, the parasite does not present division forms in the peripheral blood stream nor were its tissular forms found in the histological examination.

The finding of parasite nests in a breast of *Bradypus griseus griseus* does not make its evolution in the vertebrate host any clearer to us due to the fact that the sloth was parasitized with another trypanosome and that the presence of a kinetoplast could not be demonstrated in these forms, all of which suggests the possibility of a toxoplasmosis.

In exalated blood kept at room temperature the parasites leave the erythrocytes and show a better locomotive apparatus. This we relate to its evolutive cycle since this phenomenon probaly takes place in the intestinal tract of some intermediary arthropod host.

Several ectoparasites were collected from *Cholæpus*, among them a tick of the genus *Amblyomma*. In *Bradypus*, several arthropods that live in intimate relationship with this vertebrate are reported, such as *Cryptoses cholæpi*, among them a tick of the genus *Amblyomma*. In *Bradypus*, several arthropods that live in intimate relationship with this vertebrate are reported, such as *Cryptoses cholæpi*, *Trichillum bradyporum*, and a coleopterus of the family *Scarabeidæ*. In addition, *Amblyomma gertschi* was found and was carefully studied since it was the only hematophagous ectoparasite.

An unsuccessful effort is made at finding a hemipterus, *Belminus costaricensis*, that had been reported in a sloth. Although the search for the vector of this parasitosis was fruitless, we are convinced of its existence and will continue searching for it.

We carried out a xenodiagnosis on *Cholæpus*, with *Triatoma infestans* and *Triatoma dimidiata*, without being able to obtain the evolution of the parasite.

The main characteristics of the genus *Endotrypanum* are given but it cannot be definitely placed in the family *Trypanosomidæ* since its evolutive cycle is not known.

Fig. 1: *Bradypus griseus griseus*: Nótese los 3 dedos de las patas delanteras, cola y pelo corto.

Fig. 2: Mancha que presentan en el lomo los machos de *Bradypus*.

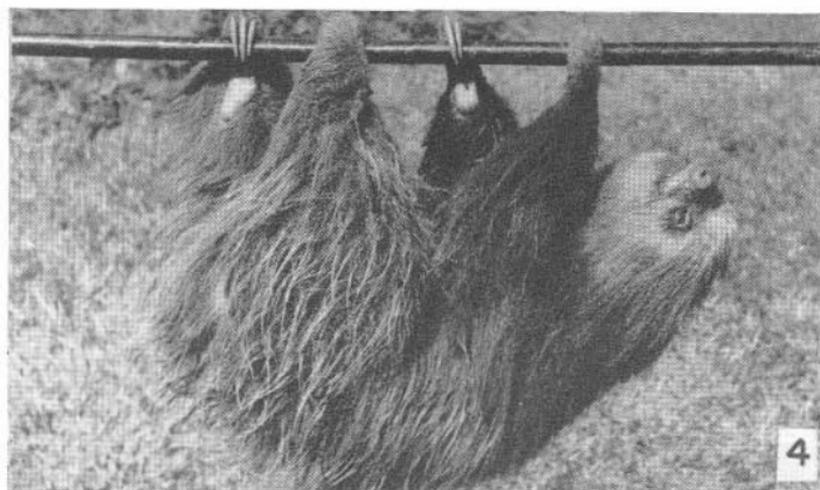
Fig. 3: Arbol del género *Cecropia* mostrando un *Bradypus* en una de sus ramas.



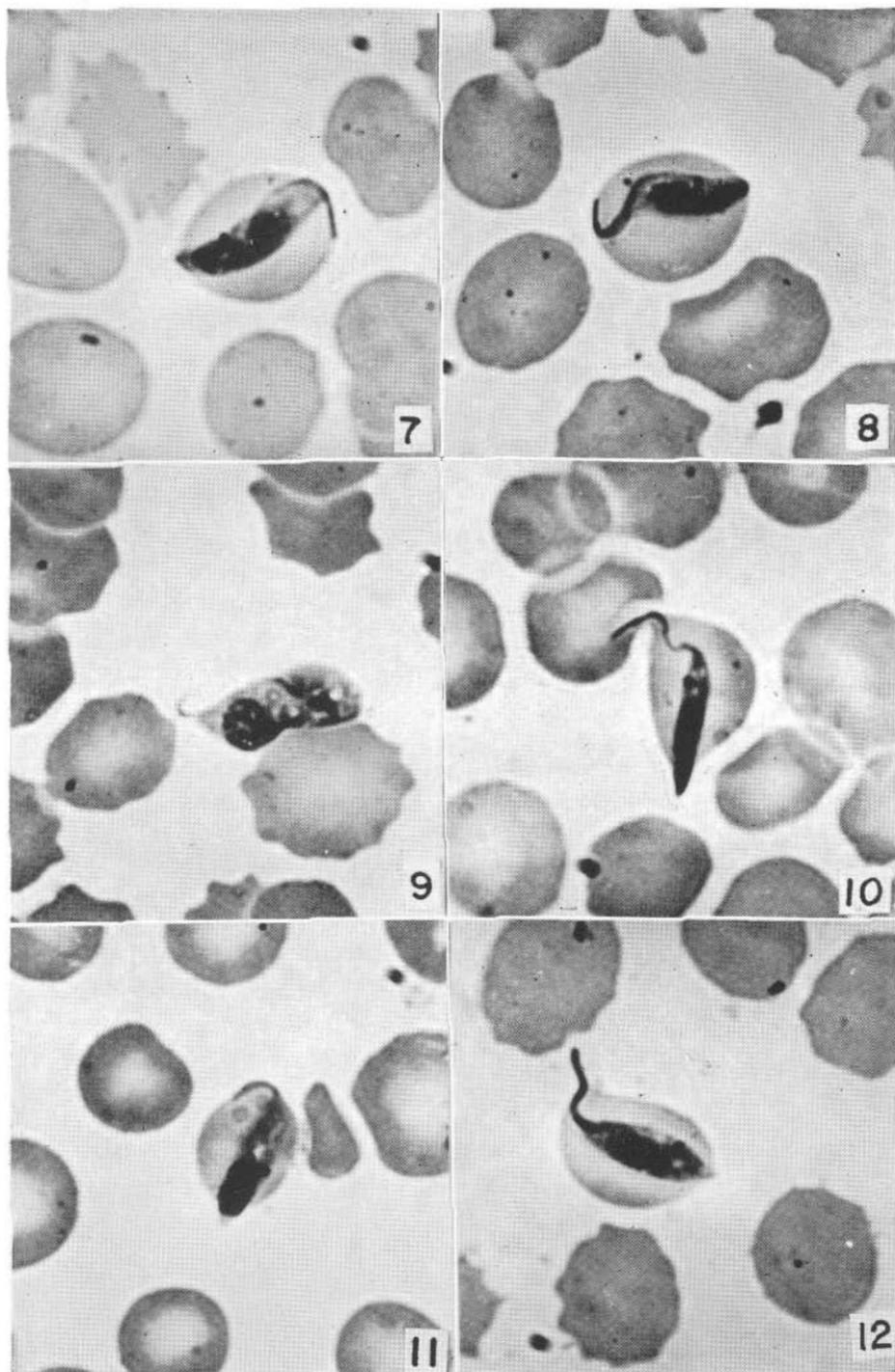
Fig. 4: *Cholæpus hoffmanni*: Nótese los dos dedos de las patas delanteras y la cara interna de las extremidades glabra.

Fig. 5: *Cholæpus hoffmanni* mostrando sus caninos característicos y el pelo largo.

Fig. 6: *Cholæpus hoffmanni*: Ojos grandes rodeados de una zona de pelo corto y negro.



- Fig. 7: *E. schaudinni* en sangre periférica de *Cholæpus hoffmanni*: Forma de tripanosoma con el flagelo adosado a la curvatura del eritrocito. 1700 X
- Fig. 8: *E. schaudinni* en sangre periférica de *Cholæpus hoffmanni*: Forma de tripanosoma en donde se aprecia la membrana ondulante. 1700 X
- Fig. 9: *E. schaudinni*: Forma de tripanosoma extracelular en sangre oxalatada en donde se aprecia la distribución de la cromatina nuclear. 1700 X
- Fig. 10: *E. schaudinni* en sangre oxalatada de *Bradypus griseus griseus*. Forma de critidias endoglobulares en donde se aprecia el flagelo, proyectado fuera del eritrocito. 1700 X
- Fig. 11: *E. schaudinni* en sangre periférica de *Bradypus griseus griseus*. Forma de critidia endoglobular. 1700 X
- Fig. 12: *E. schaudinni* en sangre oxalatada de *Cholæpus hoffmanni*: Forma de tripanosoma intracelular. Flagelo proyectado fuera del eritrocito. 1700 X



Figs. 13-14-15-16: Formas de cultivo, en medio de Rugai, de *E. schaudinni*.

Fig. 13: Forma de leishmania. 1700 X

Fig. 14: Formas de leptómona: cinetoplasto en la extremidad anterior donde se origina el flagelo. 1700 X

Fig. 15: Formas en división: Nótense en el elemento central dos núcleos y dos cinetoplastos. 1700 X

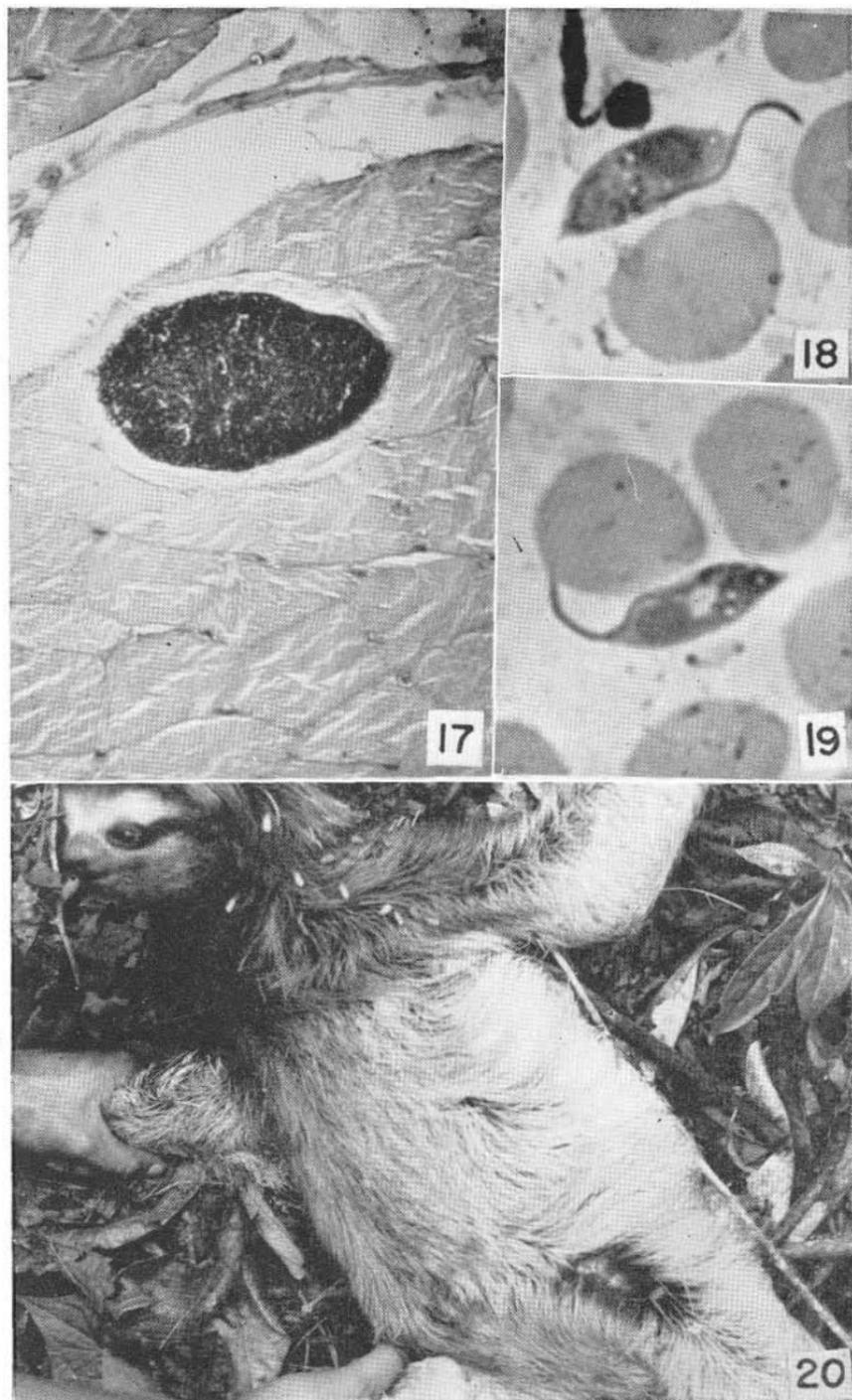
Fig. 16: Formas en división: Nótense en el elemento superior que la división del núcleo es previa a la del cinetoplasto. 1700 X



Fig. 17: Músculo de *Bradypus griseus griseus*, mostrando el aspecto de un nido parasitario. Col. con reactivo de Schiff y ácido peryódico. 375 X

Figs 18 y 19: *E. schaudinni* en sangre oxalatada de *Cholæpus hoffmanni*: Formas de tripanosomas extracelulares en donde se aprecia mejor el flagelo y la membrana ondulante. 1700 X

Fig. 20: *Cryptoses cholæpi* en un *Bradypus* recientemente capturado.



BIBLIOGRAFIA

1. BRAND T. VON
1952. *Chemical physiology of endoparasitic animals*. 339 pp. Academic Press. Inc. Publisher N. Y.
2. CONEJOS, M.
1948. Cultivo de *Schizotrypanum cruzi* en embrión de pollo. *An. Inst. Med. Reg.* 2 (2).
3. COX, H. R.
1938. Use of yolk sac of developing chick embryo as medium for growing rickettsiae of Rocky Mountain, spotted fever and typhus groups. *Publ. Health. Rep.*, 53: 2241-2247.
4. CUNHA, A. M. DA, & J. MUNIZ
1944. Pesquisas sobre o *Endotrypanum schaudinni* Mesnil e Brimont, 1908 parasita do *Cholæpus didactylus* (L). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 41 (1):179-194.
5. DARLING, S. T.
1914. The *Endotrypanum* of Hoffman's sloth. *Jour. Med. Res.* XXXI: 195-203.
6. GOODWIN, G. G.
1946. Mammals of Costa Rica. *Bull. Am. Mus. Nat. Hist.* N. Y. 87 (5):351-354.
7. HERRER, A., H. LENT, & P. WYGODZINSKY
1954. Contribución al conocimiento del género *Belminus* Stal, 1859. (Triatominae, Reduviidae, Hemiptera) *An. Inst. Med. Reg.* 4 (1)85-105.
8. LABERNADIE, V. G. F. & HUBAC
1923. Sur l'*Endotrypanum schaudinni* de l'unau, édenté de la Guyane (*Cholæpus didactylus*) *Compt. Rend. Soc. Biol.* LXXXVIII: 664.
9. MILLER, Jr. & R. KELLOG
1955. List of North American recent mammals. *U.S.A. Nat. Mus. Bull.* 205.
10. MESNIL, F. & E. BRIMONT
1908. Sur un hématozoaire nouveau (*Endotrypanum* n. gen. d'un édenté de Guyane) *Compt. Rend. Soc. Biol.* 65: 581-583.
11. RUGAI, E.
1941. Cultura das leishmanias. *Rev. Inst. Adolfo Lutz* 1 (1):153-159.
12. TREJOS, A. & F. MONTERO-GEI
1953. Estudios sobre tripanosómidos de *Edentata* en Costa Rica. I *Trypanosoma legeri* en *Bradypus griseus griseus*. *Rev. Biol. Trop.* 1 (1):21-27.
13. WENYON, S. M. & H. H. SCOTT
1925. *Endotrypanum schaudinni* in the two-toed sloth. *Trans. Roy. Soc. Med. & Hyg.* XXIX: 280-281.
14. WENYON, C. M.
1926. *Protozoology*. 2 Vols. XVI+IX+1563 pp. Bailliere, Tindall & Cox London