



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS DE LA SALUD

ÁREA ACADÉMICA DE MEDICINA

**“INFLUENCIA DE BACTERIAS SIMBIONTES DEL TRACTO INTESTINAL DE
TRITOMINOS SOBRE LA VIRULENCIA DE *TRYPANOSOMA CRUZI*”**

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MÉDICO CIRUJANO**

PRESENTA:

LESLIE IVETE OLIVARES VALDEZ

**DIRECTOR:
DR. MARCO ANTONIO BECERRIL FLORES**

PACHUCA DE SOTO, HIDALGO. MAYO 2007.

AGRADECIMIENTOS

A Dios:

Por permitirme descubrir la grandeza, belleza e importancia que existe en cada ser humano, el crecimiento y desarrollo que podemos alcanzar; la capacidad de cuestionarnos e investigar para intentar resolver un problema que ocasiona tristeza y sufrimiento en otro ser humano.

Gracias por guiarme, acercarme y darme la oportunidad de empezar a conocer lo maravilloso que puede ser dedicar la vida al servicio de los demás, por medio de esta hermosa profesión que es la medicina, y con ello no solo sanar el cuerpo, sino también, en ocasiones al alma.

A mis padres:

Por ser la piedra angular en mi vida, mi razón de ser y de esforzarme día tras día con la única finalidad de ser una mejor persona, para corresponderles como hija y como futura profesionalista.

Muchas gracias por el amor incondicional, por la familia maravillosa que se ha fundamentado siempre en el respeto y la comunicación.

No me queda más que decir: ¡GRACIAS! , ¡los amo!.

Jorge, Elyda y Beto:

Les agradezco su amor, apoyo, tiempo, comprensión y compañía a lo largo de todo este tiempo. Por brindarme su hogar, por la preocupación y a su vez los regaños, porque en muchas ocasiones me hicieron reaccionar y ver que existe gente que me quiere y se preocupa por mi bienestar en todos los sentidos.

Beto: Mi niño lindo, gracias por existir y por darnos esa chispa de amor, luz y de esperanza que nos impulsa a esforzarnos y a seguir adelante.

Dr. Marco:

Gracias por ser mi tutor y maestro, ya que sin usted este trabajo no sería posible, pero sobre todo gracias por ser mi amigo y permitirme ser un miembro más de su familia; Gaby y Marquito, les agradezco la hospitalidad, los consejos, las risas, los buenos momentos y el tiempo que de todo corazón me han ofrecido, saben que también los quiero mucho y que son muy importantes para mí, ya que me han adoptado como en una verdadera familia.

Pepe, Juan Pablo y Edwin:

Por ser parte importante de este trabajo, que aquí están reunidas nuestras inquietudes, experiencias, alegrías, risas, tristezas, muchas horas de trabajo, y de largos viajes, pláticas y aprendizaje; muchísimas gracias por su compañía, comprensión y la gran amistad que me han brindado.

*Los sueños son la esperanza perenne de nuestra vida y la energía que nos hace
vivir: ¡aférrate a ellos!*

Irene Fohri

ÍNDICE

CONTENIDO	PÁGINA
RESUMEN.....	1
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN.....	2
CAPÍTULO II. ANTECEDENTES.....	3
CAPÍTULO III. MARCO TEÓRICO.....	7
CAPÍTULO IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	17
4.1 Justificación.....	18
4.2 Objetivos.....	18
4.3 Hipótesis.....	19
CAPÍTULO V. MATERIAL Y MÉTODOS.....	20
5.1 Diseño epidemiológico.....	20
5.2 Ubicación espacio temporal	20
5.3 Identificación de las variables del estudio.....	20
5.4 Métodos: Procesamiento de muestras biológicas.....	21
5.4.1 Identificación de simbioses en los distintos estadios ninfales de los triatominos	21
5.4.2 Identificación de bacterias simbioses mediante el uso de antibacterianos	22
5.4.3 Aislamiento de <i>T. cruzi</i> <i>in vitro</i>	23
5.4.4 Aislamiento de bacterias simbioses de triatómicos...	23

5.4.5 Mezcla de bacterias simbiotes aisladas y <i>T. cruzi</i> <i>in Vitro</i>	24
5.4.6 Cinética de parasitemia, peso y sobrevivencia.....	24
5.4.7 Medición del histotropismo.....	24
5.5 Plan de análisis estadístico.....	25
5.6 Presupuesto y materiales.....	25
CAPÍTULO VI. ASPECTOS ÉTICOS.....	27
CAPÍTULO VII. RESULTADOS	28
CAPÍTULO VIII. DISCUSIÓN.....	38
CAPÍTULO IX. CONCLUSIONES.....	43
BIBLIOGRAFÍA.....	44

RESUMEN

Introducción: Una de las estrategias del control de la enfermedad de Chagas, está relacionada con la interacción parásito-vector. Dado que los triatominos son vectores transmisores del parásito *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), y en su intestino coexiste con bacterias simbiotes, era probable que la eliminación de los simbiotes influyera en el comportamiento del parásito, el cuál se puede ver reflejado en la atenuación de su virulencia. **Objetivo:** Determinar la influencia de simbiotes bacterianos, presentes en *Triatoma barberi* (*T. barberi*), el principal triatomo en México, sobre la virulencia de *T. cruzi*. **Material y Métodos:** Se aislaron bacterias simbiotes del intestino y de heces de ejemplares de *T. barberi*, desde primer estadio hasta la adultez, desarrollados en el laboratorio de investigación del ICSa de la UAEH, Pachuca, Hidalgo. También se aislaron tripanosomas a partir de contenido intestinal de triatominos infectados con el parásito en el laboratorio. Las bacterias aisladas se pusieron en contacto con *T. cruzi* en medio de cultivo y después de 2 pases se utilizó al parásito para infectar ratones, de igual manera se infectó otro grupo de ratones únicamente con el parásito sin tener contacto previo con las bacterias. **Resultados:** *Triatoma barberi* contiene simbiotes de tipo bacteriano desde el momento de la eclosión; éstos influyen negativamente en la reproducción de *T. cruzi*, y atenúan su patogénesis.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas es un problema importante de salud pública en México, y en el resto del continente americano. El agente causal denominado *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) es transmitido al humano a través de las deyecciones de insectos hematófagos denominados triatominos. Para control de la enfermedad es necesario evitar la transmisión, para ello, se han investigado las interacciones parásito-triatomino. Se sabe que estos insectos contienen en su intestino bacterias simbiotas que en algunas especies de triatominos favorecen o evitan la presencia de diferentes tripanosomátidos. En México existen 31 especies de triatominos, no se conoce su flora de bacterias simbiotas y mucho menos su interacción con *T. cruzi*. De causar un efecto negativo para el parásito el estudio de los simbiotas sería una estrategia de control de la transmisión. La pregunta principal de investigación es: ¿La presencia de bacterias simbiotas del tubo digestivo de *T. barberi* de triatominos, influyen sobre la virulencia de *T. cruzi*?

El objetivo principal de este trabajo, fué determinar la influencia de simbiotas bacterianos, presentes en *T. barberi*, el principal triatomo en México, sobre la virulencia de *T. cruzi*.

CAPÍTULO II

ANTECEDENTES

La enfermedad de Chagas es una parasitosis exclusiva del continente americano, y es causada por un protozooario hemoflagelado denominado *Trypanosoma cruzi*, el cual es transmitido principalmente por insectos hemípteros reduvidos de la subfamilia *Triatominae*, también llamados triatominos y que comúnmente se les conoce como chinches besuconas¹. A principios de los 90s, fué considerada como la infección parasitaria más importante en Latinoamérica y con un impacto socioeconómico alto².

Se sabe que 8-9 millones de personas que habitan en México, en países Andinos y en América Central, están infectados, y 25 millones están en riesgo de infección³. Para todo el continente americano hay 16 a 18 millones de personas infectadas, y 90 millones en riesgo de infección.^{1, 3} Esta infección se caracteriza por presentarse en tres fases: aguda, indeterminada y crónica; en esta última el paciente manifiesta cardiomegalia, megaesófago y megacolon; el más común es la cardiomegalia; la cuál conduce a problemas cardiacos y finalmente la muerte por insuficiencia cardiaca¹. La enfermedad de Chagas tiene además un impacto social y económico muy importante; por un lado la gente que vive en zonas endémicas convive con los triatominos; y estos se pueden asociar con pobreza, mala higiene e incluso pérdidas económicas y daño al ambiente por esfuerzos inapropiados mediante plaguicidas para controlarlas.⁴ Desde el punto de vista económico, el individuo infectado se

muestra discapacitado para laborar, provocando ausentismo; además de que el costo de atención médica para una persona infectada varía según el tratamiento, desde 150 hasta 1630 dólares EU por año⁵. Por tanto, es necesario realizar campañas de control y prevención de la transmisión de la enfermedad de Chagas. En algunos países sudamericanos, como es el caso de Uruguay, Chile, Argentina, Brasil, Paraguay y Bolivia los índices de infestación por triatominos en los hogares ha disminuido gracias al empleo de insecticidas; en Uruguay disminuyó de 6% en 1983 a 0.3% en 1996, en Chile en el mismo periodo disminuyó de 20% a 0.1%. De igual manera y como consecuencia de lo anteriormente mencionado, la infección en niños también disminuyó de un 7.2 a 0.1%.⁴

Con relación a México, la enfermedad de Chagas también es un problema de salud importante. La encuesta nacional seroepidemiológica en la que se muestrearon más de 66000 individuos de todo el país, muestra resultados de seropositividad con una prevalencia de 1.6%, variando desde 0.1 hasta 5% para los diferentes estados de la República Mexicana.⁶ Varios estudios reportan la presencia de individuos infectados con *T. cruzi*, la presencia de triatominos y el aislamiento del parásito.^{6, 7} En México, se reportan 31 especies de triatominos transmisores del parásito, considerándose por ello un problema importante de salud para nuestro país.⁷ Por un lado se impulsa un programa de control de la transmisión por transfusión sanguínea en diferentes bancos de sangre, aunque no se ha aplicado en todos los existentes del país.⁷ Con relación a la transmisión por triatominos, a pesar de las campañas de fumigación mediante el empleo de insecticidas, las zonas endémicas y vulnerables por la presencia de triatominos no se han reducido.^{3, 7} Además, el empleo de sustancias químicas pueden deteriorar el medio ambiente y su costo de fabricación puede resultar elevado para países tercermundistas. Se piensa que es imposible eliminar a los triatominos hasta su extinción, y quizás el empleo de insecticidas conduzca a su resistencia, por lo que es necesario comprender más aspectos bionómicos de su especie para el diseño de mejores y garantizados programas de control de la transmisión de la enfermedad de Chagas.^{8, 9}

Respecto a los triatomíneos, una interrogante que surge es: ¿Cuáles son los factores que permiten el establecimiento de *T. cruzi* dentro del intestino de los triatomíneos? Al conocer la respuesta a esta pregunta, se podrá diseñar alguna estrategia de control que pretenda interrumpir el ciclo de transmisión. En este sentido, se ha demostrado que los factores que influyen en dicho establecimiento están relacionados con los tejidos epiteliales del triatomíneo, con receptores moleculares en la superficie de *T. cruzi* y con el microambiente que permite dicha interacción, en el cual, están presentes moléculas que facilitan la interacción o microorganismos que son simbioses del intestino de los triatomíneos.^{10,11} Se ha demostrado que particularmente termitas y cucarachas contienen en su intestino microorganismos que actúan como simbioses que inclusive contribuyen a la dieta del propio insecto.¹¹ Sin embargo, es interesante conocer si estos simbioses producen sustancias que influyen positiva o negativamente con parásitos que puedan ser transmitidos por el insecto vector. A este respecto diversas moléculas que interfieren en el desarrollo del parásito dentro del transmisor, han sido identificadas.¹² De este modo se han establecido técnicas que transforman genéticamente a los vectores, ocasionando que ellos produzcan moléculas que interfieran con el desarrollo del parásito; así, los transmisores de parásitos de importancia médica como es el caso de los triatomíneos se han estudiado con la finalidad de buscar mecanismos que impiden el establecimiento de *T. cruzi*. Se ha observado que bacterias como *Rhodococcus rhodnii* y *Nocardia sp.* presentes en el intestino de triatomíneos, particularmente en *Rhodnius prolixus* y *Triatoma infestans*, respectivamente, afectan el desarrollo de algunas especies de tripanosomátidos: *Trypanosoma rangeli* y *Blastocryptidia triatoma*.¹³

Una estrategia que se ha diseñado con esta finalidad, es extraer las bacterias simbioses del intestino del triatomíneo, manipularlas genéticamente, introduciendo en ellas genes que codifican para moléculas que puedan eliminar o impedir el establecimiento de *T. cruzi* y volverlas a introducir al intestino para que realicen la acción esperada.^{14, 15} La bacteria *Rhodococcus rhodnii* fue aislada del triatomíneo

Rhodnius Prolixus y se le introdujo un plásmido con el gene que codifica para Cecropin A, un péptido con actividad tripanocida; cuando se volvió a introducir al triatmino, redujo o eliminó los tripanosomas presentes en el insecto.^{16, 17} Estos resultados permitieron crear una estrategia para eliminación de *T. cruzi* dentro del intestino de triatominos a los cuales por esta razón se les da el nombre paratransgénicos.^{18, 19}

Todos estos hallazgos muestran el papel que juegan las bacterias simbiotes presentes en el intestino de los triatominos y su relación con *T. cruzi*; sin embargo la literatura principalmente de países sudamericanos, como es el caso de Brasil Uruguay, Chile, Argentina, Paraguay y Bolivia ha reportado estudios en solo dos especies de triatominos, como es el caso de *Rhodnius prolixus* y *Triatoma infestans*. Mientras que en México existen 31 especies de vectores, en las cuales, aún no sabemos si se encuentran las mismas bacterias simbiotes y además qué efectos producen éstas con el desarrollo de las cepas de *T. cruzi* en nuestro país.

CAPÍTULO III

MARCO TEÓRICO

La tripanosomiasis americana o la enfermedad de Chagas es un grave problema de salud pública en Centroamérica y Sudamérica; es la enfermedad parasitaria más importante, y la que causa más morbilidad que todas las otras enfermedades parasitarias juntas; se estima que de 16 a 18 millones de personas son infectadas por la enfermedad de Chagas; de los infectados, 50 000 morirán cada año.¹

En su ciclo de vida incluye cuatro estadios básicos; los cuales se definen por su forma, la posición del cinetoplasto respecto al núcleo y la región por donde emerge el flagelo, de esta forma se identifican:

Epimastigote: No es infectiva, se encuentra en el intestino del vector y es la fase de reproducción del parásito. El cinetoplasto es anterior y está cerca del núcleo, y su flagelo es como una pequeña membrana ondulante.

Tripomastigote metacíclico: Esta es la forma no replicativa e infectiva para el humano y es la que se obtiene de la diferenciación de los epimastigotes en la porción distal del intestino del vector, éstos son expulsados junto con las heces

fecales y de esta manera pueden penetrar en el huésped ya sea por mucosas o soluciones de continuidad. Su núcleo es vesiculoso y en la parte posterior se encuentra el cinetoplasto esférico; el flagelo con su membrana ondulante está a lo largo de todo el cuerpo y se continúa libremente en el extremo posterior.

Amastigote: Es la forma replicativa intracelular y proviene de la diferenciación de los tripomastigotes tanto metacíclicos como sanguíneos y pueden infectar a otras células; su forma es redondeada, su flagelo no es visible y presentan un gran núcleo y cinetoplasto.

Tripomastigote sanguíneo: También es forma no replicativa pero infectiva para el vector y es producto de la diferenciación del amastigote.¹

Este parásito como ya se ha mencionado, es transmitido por los triatominos, los cuales han encontrado en nuestro entorno las condiciones adecuadas para su adaptación como lo son las características de la vivienda; ya que estos elaboran sus nidos dentro de los agujeros de las paredes de madera que son características de las zonas rurales; también pueden morar en los alrededores de las viviendas y emplear los troncos o desperdicios abandonados en los traspatios de las casas.¹

Los aspectos morfológicos que caracterizan a los hemípteros son: presencia de un rostro o pico recto por debajo de la cabeza, que consiste en un labio segmentado que aloja a las piezas bucales que son finas y delgadas (estiletos) y constituyen 2 mandíbulas (perforan la epidermis), y 2 maxilas (que penetran en busca de un capilar al momento de la picadura). Poseen antenas de 4 segmentos a ambos lados de la cabeza en la región anterior de los ojos; en el segundo segmento poseen pelos

finos y largos, que se insertan en depresiones redondas, llamados tricobotrios cuya distribución parece ser característica en diversas especies.²⁰ (ver Figura 1).

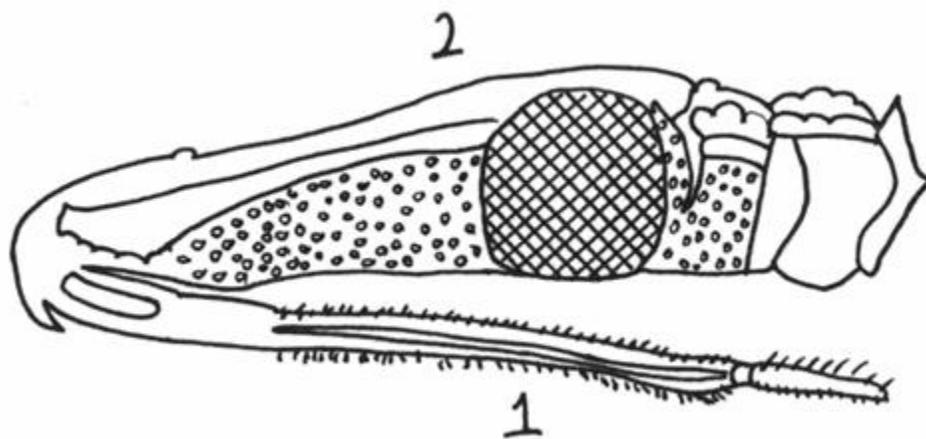


Figura 1. Estructura cefálica general de triatominos; donde se observa el labio segmentado que aloja a las piezas bucales que son finas y delgadas (estiletes) y constituyen dos mandíbulas y dos maxilas (1) y sus antenas (2).

El pronoto posee un lóbulo anterior y otro posterior, que pueden llevar espinas o tubérculos de interés taxonómico. El mesonoto está formado por un escutelo. El abdomen en los adultos, tiene 7 segmentos visibles; el primer segmento está escondido y los últimos tres son parte de los genitales de ambos sexos²⁰ (ver Figura 2).

El conectivo, o parte lateral del abdomen muestra generalmente manchas de colores y formas variadas dependiendo de la especie. Los adultos son alados; las alas

anteriores son verdaderos hemélitros con una porción dura (corio) y otra membranosa (ver Figura 2); las posteriores son delgadas, membranosas y se doblan debajo de las primeras.²⁰

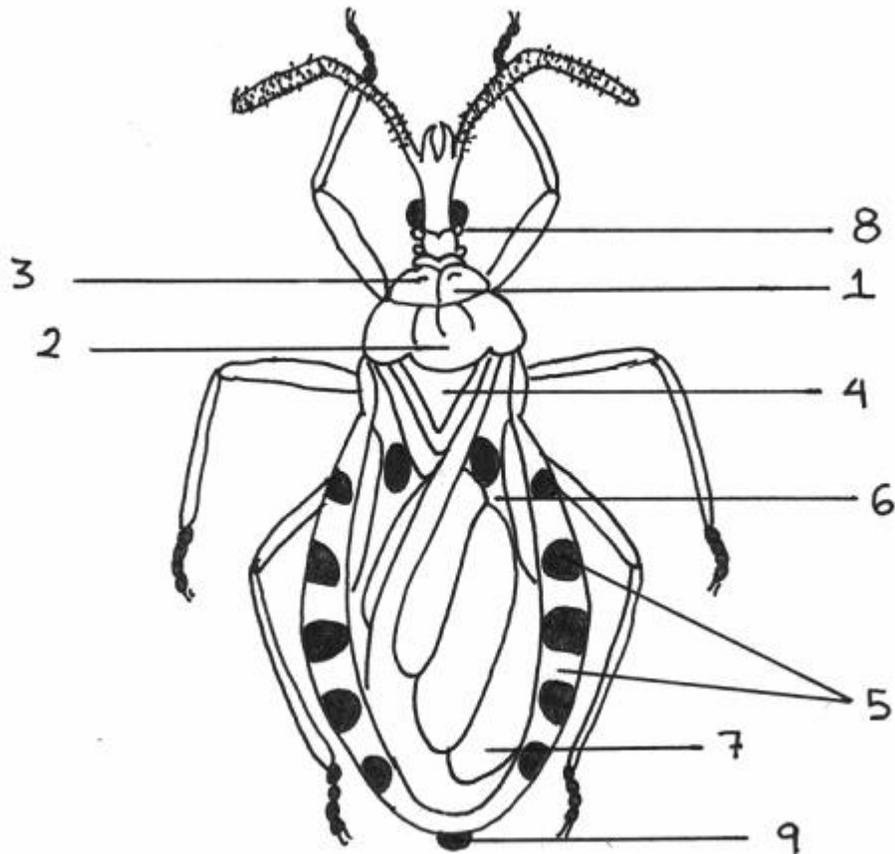


Figura 2. Estructura dorsal general de triatóminos donde se observan: lóbulo anterior del pronoto (1), lóbulo posterior del pronoto (2), espinas o tubérculos (3), escutelo (4), conectivo (5), corio (6), porción membranosa (7), ocelo (8), ovipositor (9).

Las ninfas no solo carecen de alas y de aparato genital, sino también de ocelos, escutelo y conectivo (ver Figura 3). En ellas su tórax posee sus tres porciones más o menos nítidas y el abdomen muestra 10 segmentos, aunque los últimos son muy

reducidos. Las características del tórax dorsal permiten reconocer cualquiera de los cinco estadios ninfales y el aspecto de los últimos segmentos abdominales de la ninfa de 5to estadio permite determinar el futuro sexo del adulto²⁰ (Figura 3).

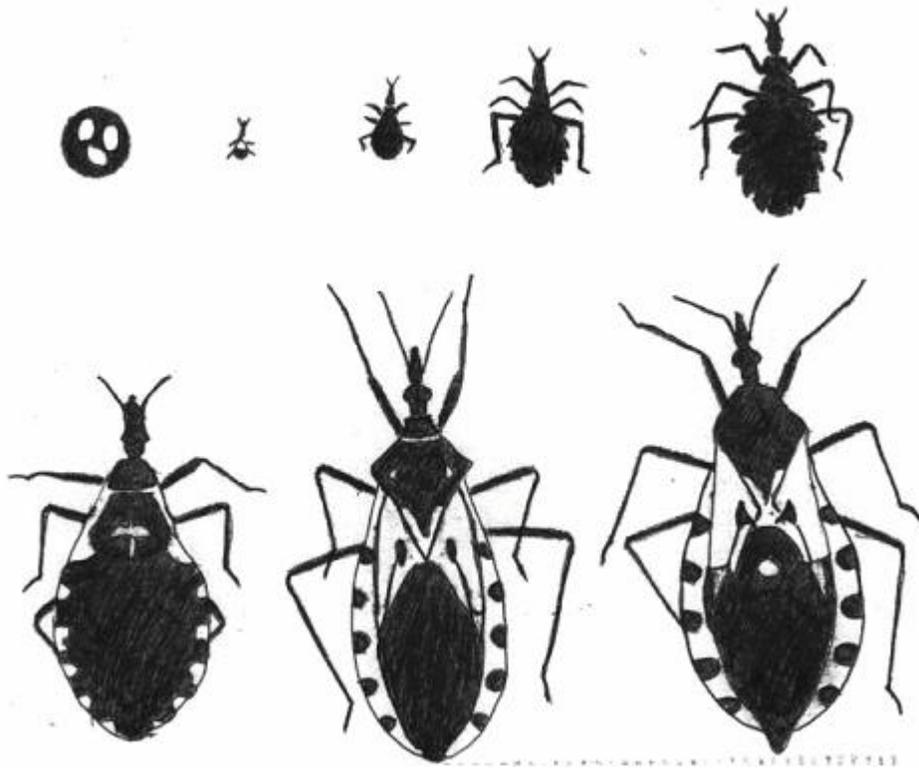


Figura 3. Estadios morfológicos de triatominos, desde huevo, pasando por cinco estadios ninfales hasta su diferenciación sexual, macho y hembra respectivamente.

El canal chupador de los triatominos, se continúa con la faringe; luego hay un esófago corto y un estómago distensible (promesenterón) en donde la sangre se acumula para su digestión. Este se continúa con una porción más delgada y larga (postmesenterón o intestino medio), que atrae los productos principales de la digestión, y que va a terminar en el saco rectal a la misma altura en que se abren las cuatro ampollas de los tubos de Malpighi que descargan la orina directamente en este saco el cual constituye por sí solo el intestino posterior. En esta sección se

encuentra una glándula especial, que tapiza la porción inicial del saco, llamada glándula rectal.²⁰

En cuanto a la transmisión de esta parasitosis, inicia cuando el triatomino no infectado se alimenta de la sangre de un mamífero que sí está infectado y porta a los parásitos en su sangre (ver Figura 4); los tripomastigotes pasan hacia el intestino del triatomino donde se transforman en epimastigotes; éstos se multiplican por fisión binaria y a los pocos días vuelven a convertirse en tripomastigotes metacíclicos en la porción distal del intestino.

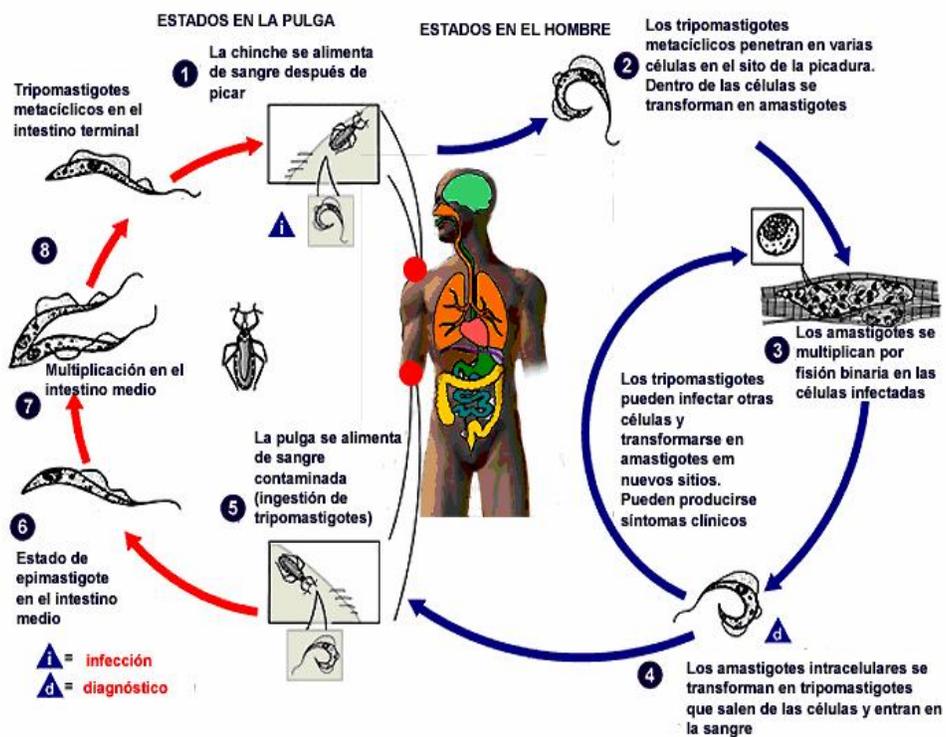


Figura 4. Ciclo biológico de *Trypanosoma cruzi*.

Cuando el vector se alimenta, puede defecar sobre la piel o mucosas del humano o mamífero, y de esta forma deposita las heces junto con los tripomastigotes metacíclicos infectantes; estos se introducen a las células del tejido del huésped vertebrado cercano al sitio de penetración, y aquí se transforman en amastigotes, los cuales también se multiplican por fisión binaria y llegan a la sangre cuando su

elevado número causa la muerte y destrucción de la célula infectada, pueden infectar otras células o transformarse en tripomastigotes sanguíneos y el ciclo finaliza cuando un triatomino se alimenta y adquiere el parásito.¹ Existen además otras vías de transmisión, aunque son menos frecuentes, como es el caso de la transfusión sanguínea con sangre infectada, ingestión de comida contaminada con el parásito, accidentes de laboratorio por inoculación directa, también por vía congénita o transmisión a través de lactancia materna.¹ La patogenia de esta enfermedad no se ha establecido con certeza, pero actualmente se han propuesto tres teorías principales; la primera habla de un daño directo, que se debe a la lesión que produce el parásito al invadir a las células del huésped desencadenando un proceso inflamatorio localizado, ya que al provocar la invasión, replicación y muerte de las células infectadas ocasionan liberación de los parásitos y reinfección de otras células produciendo daños irreversibles en los órganos afectados, en particular corazón, esófago y colón. La segunda teoría habla de afección autoinmunitaria, ya que se han descrito anticuerpos circulantes en pacientes chagásicos crónicos, que reaccionan contra proteínas de tejido conectivo, endocardio y proteínas de músculo estriado, entre otras; lo que ocasiona reconocimiento de las partículas proteínicas tanto propias como extrañas y activación de un proceso inmunológico humoral y celular en contra de los órganos del huésped. Y por último la teoría neurógena, que asume que el daño del parásito se observa principalmente en las células del sistema parasimpático que inerva los órganos afectados; esto tiene como consecuencia una estimulación simpática excesiva, que a través de los años causa lesión irreversible por sobrecarga de trabajo.¹

Las manifestaciones clínicas de la enfermedad de Chagas por lo regular se dividen en tres fases:

Fase Aguda. Es más visible en niños menores de 6 años, la mortalidad en esta etapa es muy baja. El periodo de incubación es de 3 días y se pueden encontrar

parásitos en sangre después de 14 a 28 días hasta 6 meses. Los signos más comunes son los de “puerta de entrada”, como el chagoma de inoculación (inflamación localizada en el sitio de infección) que produce inflamación, dolor y eritema; el signo de Romaña Mazza que es un edema bipalpebral unilateral, eritema conjuntival, adenitis de cadena cervical y dacriocistitis; este aparece cuando la vía de infección es por la conjuntiva ocular. Además, hay malestar general, hipertermia intermitente, linfadenitis generalizada, mialgias, escalofrío, hepatoesplenomegalia, astenia, adinamia.

Fase subclínica o indeterminada: Puede extenderse desde los 6 meses hasta 20 años, es un periodo asintomático, que se localiza antes de presentar el daño característico de la fase crónica. Puede haber manifestaciones electrocardiográficas, pero estas son muy inespecíficas.

Fase Crónica: Hay alteraciones cardiacas principalmente de la conducción, las cuales propician bloqueos completos o incompletos de alguna de las ramas del haz de His. El crecimiento ventricular es común, y éste puede llevar al paciente a una insuficiencia cardiaca, además de estas alteraciones podemos encontrar valvulopatías, la más común es la estenosis mitral. Esta dilatación progresiva nos lleva a una cardiomegalia visible en radiografías y en electrocardiograma.

En cuanto al diagnóstico debemos de tomar en cuenta otras patologías que ocasionan cuadros clínicos similares, como alergias (por el signo de Romaña Mazza), y mordeduras de insectos (por el chagoma). Durante la fase aguda de la enfermedad de Chagas se puede establecer un diagnóstico de manera directa por medio de observación en un frotis de sangre; de igual manera se puede emplear la inoculación de sangre del paciente en animales de experimentación, el hemocultivo y el xenodiagnóstico. Este último consiste en utilizar triatominos no infectados

alimentados con la sangre del paciente, y efectuar observaciones directas de las heces fecales en busca del parásito en los días 7, 14 y 30 después de alimentarse.¹ Y dentro de los métodos serológicos más aplicados durante todas las fases de la enfermedad, se encuentran la hemaglutinación indirecta (HAI), el método de ELISA, y la inmunofluorescencia (IFI).¹

Hablando de tratamiento, podemos afirmar que hasta el momento no existe un fármaco del todo efectivo e inocuo para el paciente contra la enfermedad de Chagas, dado que los suministrados hasta el momento, no son por completo eficaces en todas las fases de la enfermedad o producen graves efectos colaterales. El agente más prescrito en el tratamiento de la enfermedad de Chagas, es un derivado de la nitrofurfurilidina (3-metil-4-5-nitrofurfurilidenamino-tetrahidrol [1,4]-tiazino-1, 1-dióxido), el cuál es efectivo en los casos agudos y crónicos tempranos; su mecanismo de acción es la inhibición del desarrollo intracelular del parásito. El benznidazol se ha prescrito con cierto éxito para el tratamiento de la enfermedad de Chagas, sin embargo hay varias desventajas por su utilización: entre las cuales se encuentran la resistencia al medicamento por el parásito, reacciones secundarias en el paciente,¹ así como el costo de los medicamentos, por lo cual es preferible la profilaxis, en este sentido, el control de los triatomíneos ha llegado a ser una prioridad para la salud pública. A la fecha se han demostrado los beneficios que resultan del control eficaz en diferentes países de Sudamérica.^{21, 22} En la década pasada, los programas de control en la mayoría de los países endémicos, habían tenido un gran éxito, interrumpiendo la transmisión de la enfermedad y ocasionando una reducción sustancial de la enfermedad de Chagas.³ Sin embargo el empleo de insecticidas tiene sus desventajas: el costo de su fabricación, el deterioro del medio ambiente y finalmente la resistencia que se genera en los insectos. Por lo cual es importante la creación de nuevas herramientas de control.²¹⁻²³

El estudio de triatominos paratransgénicos es otra alternativa: la cuál consiste en extraerles los simbioses del intestino, introducir en estos simbioses genes que codifiquen para péptidos que tengan una función en contra de *T. cruzi*; de esta manera se impide que *T. cruzi* se desarrolle sin necesidad de desaparecer al vector.^{13-19, 24} Es posible que *T. cruzi*, sí se desarrolle en triatominos pero modifique su comportamiento y por tanto repercuta en su virulencia, la cuál se define como la capacidad del parásito para producir daño en el huésped. En el caso de las infecciones por *T. cruzi*, la virulencia se determina infectando ratones de experimentación: se mide la parasitemia, la mortalidad y la afinidad que tiene el parásito para infectar diferentes órganos (histotropismo), en un determinado tiempo (30 a 90 días de infección).^{25, 26}

CAPÍTULO IV

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Dado que la principal vía para adquirir la enfermedad de Chagas, es a través de la transmisión de *T. cruzi* por medio de las deyecciones de triatomíneos, el control de la infección se podría enfocar hacia el estudio de estos. Se sabe que presentan en su intestino simbiosis que interactúan con *T. cruzi*, como es el caso de *Rhodnius prolixus* y *Triatoma infestans*. Es posible que otras especies de triatomíneos también presenten simbiosis aunque no necesariamente los mismos que para aquellos triatomíneos. De hecho no se conoce la presencia de simbiosis en el intestino de otras especies que existen en nuestro país, como *T. barberi*, el transmisor más importante de *T. cruzi* en México, y por consiguiente no se conocen las repercusiones que traerá en la virulencia del parásito. Es por eso que surgió la siguiente pregunta:

¿Influye la presencia de bacterias simbiosis del tubo digestivo de especies mexicanas de triatomíneos, sobre la virulencia de *T. cruzi*?

4.1 Justificación

El mecanismo de transmisión de *T. cruzi* más frecuente es mediante las deyecciones de los triatomíneos infectados. Lo cual indica que en las zonas donde exista la presencia de estos insectos se convierten en regiones de alto riesgo de infección. Por lo que es indispensable el control de la transmisión bajo esta vía. No obstante que se han empleado insecticidas con la finalidad de controlar y disminuir la población de triatomíneos en zonas endémicas de enfermedad de Chagas, sabemos que éstos ocasionan daños a la naturaleza, intoxicaciones al humano y alta probabilidad de resistencia a los insectos, así como una gran inversión económica. Sin embargo, diversos estudios señalan la coexistencia de microorganismos simbiotes con *T. cruzi* dentro del tubo digestivo de los triatomíneos y que estos a su vez facilitan el establecimiento del parásito. Es probable que también influyan en la capacidad patogénica de *T. cruzi* y por lo tanto lo conviertan en un microorganismo con mayor potencial de infección y agresión al huésped. Conociendo los factores que influyen tanto en la adaptación como en la estimulación de la virulencia de *T. cruzi* será posible diseñar estrategias del control de la presencia de simbiotes sin necesidad de eliminar al triatomíneo que evolutivamente ha resistido catástrofes y lo convierten en un ser que difícilmente se extinguirá.

4.2 Objetivos

General

Evaluar la influencia de los simbiotes del tracto intestinal de triatomíneos en la virulencia de *T. cruzi*.

Particulares

- Caracterizar simbiontes aislados de flora habitual presentes en heces e intestino de triatominos mediante observaciones bacteriológicas.
- Establecer la adaptabilidad de *T. cruzi* en presencia de simbiontes bacterianos *in vitro*.
- Determinar la virulencia de *T. cruzi* en presencia y ausencia de simbiontes bacterianos por medio de infección de ratones.

4.3 Hipótesis

Los simbiontes del tracto intestinal de los triatominos son necesarios para incrementar la virulencia del *T. cruzi*.

CAPÍTULO V

MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Diseño epidemiológico

Se trata de un estudio experimental, descriptivo y comparativo.

5.2 Ubicación espacio temporal

La fase experimental se llevó a cabo en el laboratorio de Investigación del ICSa de la UAEH, Pachuca Hidalgo en el periodo de Agosto 2003 – Agosto 2006.

5.3 Identificación de las variables del estudio

VARIABLE	CLASIFICACIÓN METODOLÓGICA	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	ESCALA DE MEDICIÓN
Virulencia	Dependiente	Es la capacidad de un microorganismo para producir una	Es el grado de patogenicidad del parásito registrado	Cualitativa nominal dicotómica

		enfermedad en el huésped.	curvas de parasitemia, peso corporal, sobrevivencia, e histotropismo.	
Bacterias simbiotes	Independiente	Forma de vida caracterizada por la estrecha relación de organismos de diferentes especies, con el resultado de un mutuo beneficio	Es la presencia de microorganismos bacterianos dentro del tracto intestinal de los triatominos	Cualitativa nominal dicotómica

5.4 Métodos: Procesamiento de muestras biológicas

5.4.1 Identificación de simbiotes en los distintos estadios ninfales de los triatominos.

Se prepararon treinta cajas de Petri de 10 cm de diámetro con 15 ml de agar nutritivo, las cuáles se refrigeraron hasta su uso.

Se obtuvieron muestras de triatominos de la especie *T. barberi* libres de infección con *T. cruzi*, organizados en lotes de 5 triatominos de 3ro, 4to y 5to estadio respectivamente; se sujetaron por la parte lateral del abdomen ayudándose de pinzas de acero inoxidable, de tal manera que la región posterior de su cuerpo estaba dirigida hacia un portaobjetos limpio y con una gota de NaCl 0.85%. Se oprimió suavemente el abdomen de cada triatomino hasta provocar la deposición de heces sobre el portaobjetos; de igual manera se les realizó una punción en la región abdominal con jeringa de insulina con la finalidad de obtener una muestra del

contenido intestinal, el cuál también se colocó en un portaobjetos limpio y con una gota de NaCl 0.85%.

Se obtuvieron muestras del extracto total de ninfas recién eclosionadas, de 1er estadio de más de 1 semana de su eclosión, y de 2do estadio. Posteriormente se les realizó la tinción de Gram de cada una de las muestras obtenidas anteriormente. Así mismo, cada muestra se sembró en las cajas de Petri por estría y por agotamiento y se incubaron a 27°C por 2 semanas. Una vez desarrolladas las colonias, se identificaron las de distinta morfología y se les realizó tinción de Gram nuevamente.

5.4.2 Identificación de bacterias simbiotes mediante el uso de antibacterianos.

Se prepararon cuatro cajas de Petri de 10 cm de diámetro con 15 ml de medio de cultivo agar nutritivo. A una caja, se adicionó el antibacteriano (penicilina-estreptomicina), a otra antiparasitario (metronidazol), una más con antifúngico (nistatina) y la última no se adicionó antibiótico. Se refrigeraron hasta su uso. También se preparó una caja de Petri de 10 cm de diámetro con 15 ml de medio de cultivo agar sabouraud, sin agregar antibiótico. Se refrigeró hasta su uso.

A un triatomino adulto de especie *T. barberi* que estaba libre de infección, se le provocó la deposición de heces sobre un portaobjetos, de acuerdo a la metodología antes mencionada. Se sembraron las heces del triatomino en las cinco cajas de Petri (4 con agar nutritivo y una con agar sabouraud), mediante estría y por agotamiento. Se incubaron las cinco cajas a 27°C durante 2 semanas. Se procedió a puncionar la región abdominal del mismo triatomino y el contenido obtenido se procesó de igual manera que la muestra de heces.

Se repitió el paso 5.4.2 para heces y contenido intestinal de otro triatomino de la misma fase y especie.

5.4.3 Aislamiento de *T. cruzi* in vitro

Con la finalidad de obtener tripomastigotes sanguíneos para experimentar con la microbiota bacteriana, a un ratón infectado con la cepa Juana de *T. cruzi*, se le realizó seguimiento de la infección: cada semana se cortó la punta de la cola de los ratones; la sangre se colectó de manera cuidadosa y estéril sobre portaobjetos limpios y secos, de aquí se obtuvieron 5 μ L de sangre y se diluyeron 1:5 con solución de NH₄Cl al 0.87% dejando reposar durante 5 minutos. De esta suspensión se tomaron 10 μ L, se colocaron en una cámara de Neubauer y se contaron el número de tripomastigotes sanguíneos/ml de sangre; cuando llegó a su máximo punto de parasitemia se le anestesió con éter y se sujetaron sus cuatro extremidades mediante alfileres sobre un soporte de unicel con la cara ventral hacia arriba. Se practicó punción cardíaca con la finalidad de obtener la mayor cantidad de sangre posible. Se verificó mediante el microscopio la presencia de *T. cruzi*. Los tripomastigotes se pasaron a un cultivo en medio LIT (liver infusion tryptose) para el aislamiento *in vitro* de *T. cruzi*.

5.4.4 Aislamiento de bacterias simbiotes de triatominos

A partir de los cultivos desarrollados en el momento donde se aplicaron los antimicrobianos; que se obtuvieron a partir de heces y contenido intestinal, se verificó mediante tinción de Gram la presencia de bacterias. Las bacterias aisladas como colonias se separaron transfiriéndolas a tubos de 13X100 mm que contenían caldo nutritivo y se incubaron a 28°C hasta su desarrollo.

5.4.5 Mezcla de bacterias simbiotes aisladas y *T. cruzi* in vitro

Tubos de 13X100 estériles conteniendo medio LIT fueron sembrados con *T. cruzi* aislado como se indicó en el paso 5.4.3 y de la misma manera se agregó una suspensión de las bacterias que se lograron aislar en su totalidad (ver paso 5.4.4). La cantidad de cada inóculo fue aproximadamente 1×10^6 .

5.4.6 Cinética de parasitemia, peso y sobrevivencia

Los tripanosomas obtenidos de los cultivos anteriormente mencionados (*T. cruzi* en presencia y *T. cruzi* en ausencia de bacterias simbiotes), se inocularon por vía intraperitoneal a 2 lotes de 5 ratones Balb/c a dosis de 1×10^4 parásitos por cada ratón. A cada ratón se le determinó la parasitemia semanalmente, tal y como se explicó en el punto 5.4.3. Asimismo se llevó a cabo un registro del peso corporal de los ratones a lo largo de todo el periodo de infección.

5.4.7 Medición del histotropismo

Los ratones que sobrevivieron a los 56 días de infección se sacrificaron por dislocación de médula espinal para el estudio de histotropismo, de igual manera se utilizaron los ratones que fueron muriendo a lo largo de la medición de parasitemia. De cada ratón se disecaron los siguientes órganos: cerebro, músculo esquelético y corazón. Estos fueron incluidos en parafina, se realizaron cortes en microtomo a 8 micras, y posteriormente las muestras se analizaron microscópicamente para la identificación y conteo de nidos de amastigotes.

5.5 Plan de análisis estadístico

Los resultados de la influencia de los simbioses bacterianos sobre el comportamiento de *T. cruzi* se analizaron comparativamente para determinar diferencias significativas mediante un ensayo de ANOVA con la prueba de F de Tukey $P < 0.05$. Para saber si la cantidad de distintos tipos de bacterias simbioses presentes en los triatomos estaba asociada a su desarrollo ninfal, mediante determinación de variabilidad entre los distintos estadios, también se realizó la prueba de Tukey. Como un ensayo para saber si la detección de simbioses era igual durante la obtención de la muestra de los triatomos y después del aislamiento en medio de cultivo se realizó la determinación del índice de similitud de Jaccard.

5.6 Presupuesto y Materiales

El trabajo se realizó con el equipo, material y reactivos existentes en el laboratorio de investigación del ICSa; teniendo un costo aproximado estos dos últimos, de \$1,976.90 M.N. de acuerdo a los presupuestos obtenidos de Grupo DIMEBA S. de R.L. de C.V. del año en curso.

Recursos humanos: Cuatro personas

Un asesor de Tesis

Un alumno tesista

Un alumno tesista colaborador

Una laboratorista

Material Biológico:

5 triatomos de la especie *T. barberi* de cada uno de los 5 estadios incluyendo además machos y hembras

10 ratones de la cepa Balb/c

Equipo:

Microscopio

Microtomo

Campana de extracción

Materiales y reactivos de laboratorio		
Cantidad	Descripción	Precio
40	Cajas de Petri	\$ 204.00
1	Agar nutritivo	\$ 217.00
1	Agar sabouraud	\$ 580.00
1	Mechero de Bunsen	\$ 41.50
1	Asa bacteriológica	\$ 35.00
1	Caja de guantes de látex	\$ 80.00
15	Tubos de ensaye para medio de cultivo	\$ 158.00
1	Caja de penicilina-estreptom icina	\$ 40.00
1	Caja de metronidazol	\$ 58.00
1	Caja de óvulos de nistatina	\$ 60.00
1	Caja de portaobjetos	\$ 18.70
1	Caja de cubreobjetos	\$ 57.70
1	Frasco de 500 ml de cristal violeta	\$ 20.00
1	Frasco de 500 ml de lugol	\$ 25.00
1	Frasco de 500 ml de safranina	\$ 340.00
1	Paquete de 500 grs de parafina para inclusión de órganos	\$ 42.00

TOTAL \$ 1, 976.90

CAPITULO VI

ASPECTOS ÉTICOS

De acuerdo al trabajo de experimentación realizado y conforme lo dicta el reglamento de la Ley General de Salud en materia de ética aplicada a la investigación para la salud, dentro del título séptimo llamado. “ De la investigación que incluya la utilización de animales de experimentación”, el presente trabajo cumple con los siguientes artículos.

Artículo 122: Las investigaciones se diseñarán a modo de evitar al máximo el sufrimiento de los animales.

Artículo 123: Cuando sea necesario sacrificar un animal de experimentación, se empleará un procedimiento que asegure en lo posible su muerte sin sufrimiento.

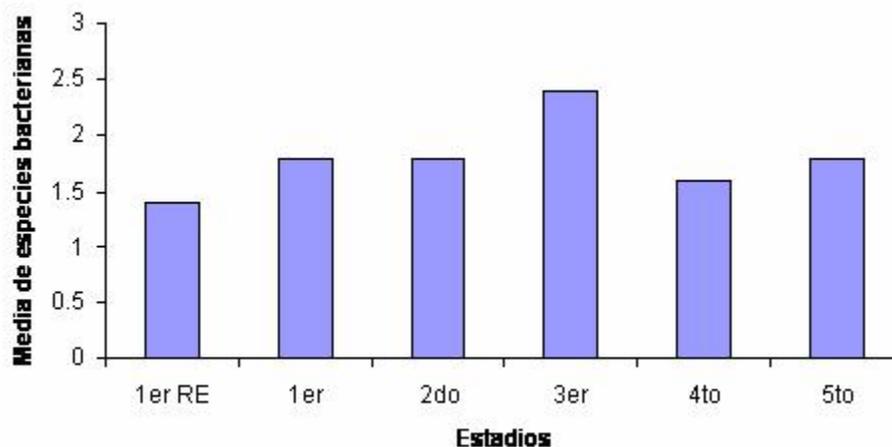
CAPÍTULO VII

RESULTADOS

Identificación de simbioses en los distintos estadios ninfales de los triatominos

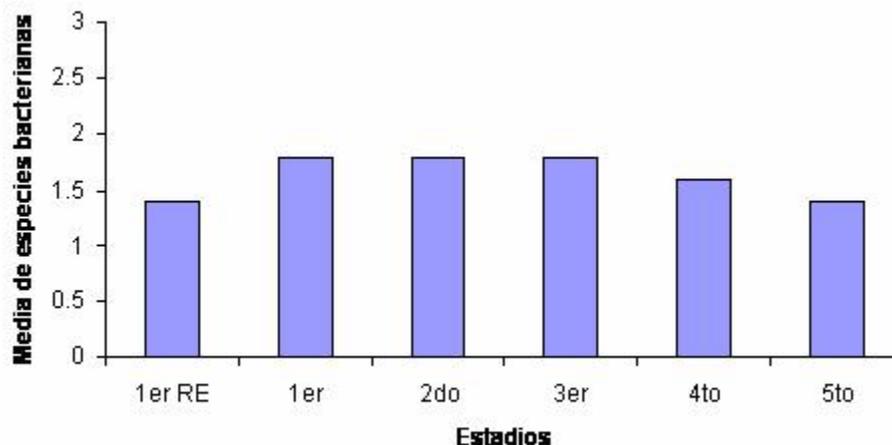
Con la finalidad de verificar la existencia de bacterias simbioses en el tracto intestinal de triatominos de la especie *T. barberi* desde el momento de su eclosión hasta su diferenciación sexual pasando por los 5 estadios ninfales se obtuvieron muestras de heces y de contenido intestinal, obteniendo como resultados los siguientes:

Figura 1. Número de especies bacterianas presentes en el intestino de triatominos



En la Figura 1 se observa que los triatominos recién eclosionados (RE) y a lo largo de sus 5 estadios ninfales albergan bacterias simbiotes en el intestino, el promedio de especies bacterianas varía entre 1.4 y 2.4. Estos resultados se analizaron con la prueba F de Tukey, con una $p > 0.05$, siendo el valor de $F = 0.83$ con 5 y 24 grados de libertad, lo cuál indica que no hay variabilidad estadísticamente significativa entre las medias del número del tipo de simbiotes en cada estadio ninfal.

Figura 2. Número de especies bacterianas presentes en heces de triatominos



La Figura 2 también muestra la presencia de bacterias simbiotes en heces de ninfas en las diferentes fases, desde el primer estadio inmediatamente después de la eclosión hasta completar los 5 estadios ninfales; la media de los tipos de especies bacterianas encontradas oscila entre 1.4 y 1.8, de igual manera al compararse en el análisis estadístico con la prueba F de Tukey no hay variabilidad entre las medias obtenidas para cada estadio ninfal, ya que se obtuvo una $p > 0.05$ con una $F = 0.233$ con 5 y 24 grados de libertad.

Tabla 1. Índice de similitud de Jaccard de bacterias en el tracto intestinal de triatominos de acuerdo al Gram antes y después del aislamiento.

Intestino		Heces	
1er RE	11%	1er RE	11%
1er	27%	1er	27%
2do	13%	2do	16%
3er	11%	3er	25%
4to	14%	4to	0%
5to	16%	5to	11%

La Tabla 1 muestra un índice de similitud, donde se comparan las especies bacterianas identificadas antes y después del cultivo. Se observa que en el intestino, todos los resultados tuvieron un índice de similitud entre el 11 y 27%; mientras que en las muestras obtenidas de heces se alcanza un porcentaje del 27% en el 1er estadio recién eclosionadas. Es importante notar que ninguno de los tipos bacterianos que se encontraron antes del aislamiento fueron exactamente los que se identificaron después de su desarrollo en cultivo.

Identificación de bacterias simbiotes mediante el uso de antibacterianos

Para identificar el tipo de microorganismos presentes en el tracto intestinal de triatominos, una muestra de éste y de las heces de los insectos reducidos, se sembraron en medio de cultivo para aislamiento de bacterias (agar nutritivo) y hongos (sabouraud). Después de 20 días de incubación, se observaron colonias de microorganismos sensibles a penicilina-estreptomicina, lo cuál sugirió presencia de bacterias únicamente (ver tabla 2).

Tabla 2: Aislamiento e identificación del tipo de microorganismos en contenido intestinal y heces de triatomino.

	METRONIDAZOL+ DIYODOHIDROXIQUINOLE INA	NISTATINA	PENICILINA + ESTREPTOMICI NA	SABOURAU D*
T1He1	++	+++	-	NC
T1He2	++	++	-	NC
T1Int1	++	+++	-	NC
T2He1	++	+++	-	NC
T2He2	++	++	-	NC
T2He3	++	+++	-	NC
T2He4	++	++	++++	NC
T2Int1	++	+++	-	NC

T: Triatomino; He: Muestra tomada de heces; Int: Muestra tomada de intestino; +: Crecimiento de microorganismos; -: Inhibición de microorganismos; NC: No se presentó crecimiento; *: Medio de cultivo que presenta condiciones favorables para el desarrollo de hongos. El número de signos indica la intensidad de crecimiento o inhibición.

Aislamiento de bacterias simbiotes de triatominos.

Se aislaron ocho colonias de microorganismos simbiotes a partir de Heces (He), o de contenido intestinal (Int) de 2 triatominos de la especie *T. barberi*, (adultos) en agar nutritivo después de 20 días de incubación, a las cuales se les clasificó de acuerdo al número de triatomino seleccionado y al sitio o material biológico de donde se aislaron (ver Figura 3). A cada una de las colonias se les realizó tinción de Gram para la identificación de las bacterias (Figura 4). Los simbiotes aislados se sembraron en tubos de ensaye con caldo nutritivo (Tabla 3).

Figura 3. Ejemplos de las colonias bacterianas simbiotas aisladas de triatominos.

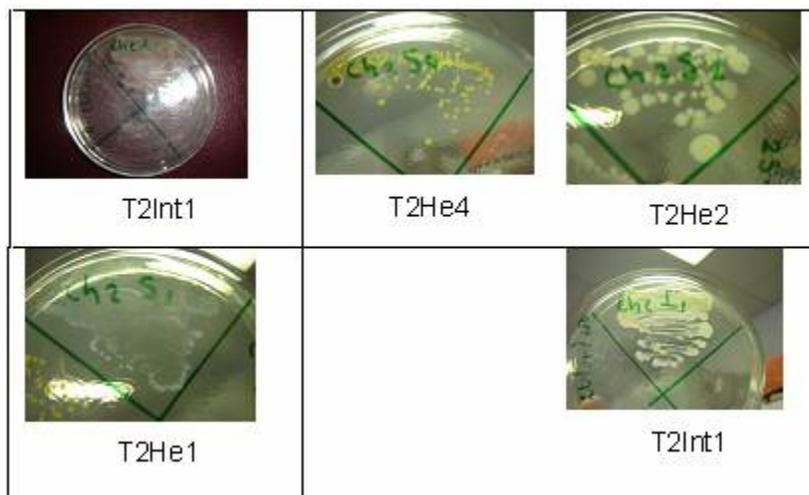


Tabla 3: Identificación al Gram de las bacterias aisladas.

Tubo	Nomenclatura	Bacterias	Gram
1	T2He1	Estreptococos	Neg
2	T1He1	Estreptococos	Pos
3	T2Int1	Bacilos Pleomórficos	Neg
4	T2He4	Bacterias Pleomórficas	Neg
5	T2He3	Bacilos largos Pleomórficos	Neg
6	T1He2	Estreptococos	Neg
7	T2He2	Bacilos cortos	Neg
8	T1Int1	Cocos aislados	Neg

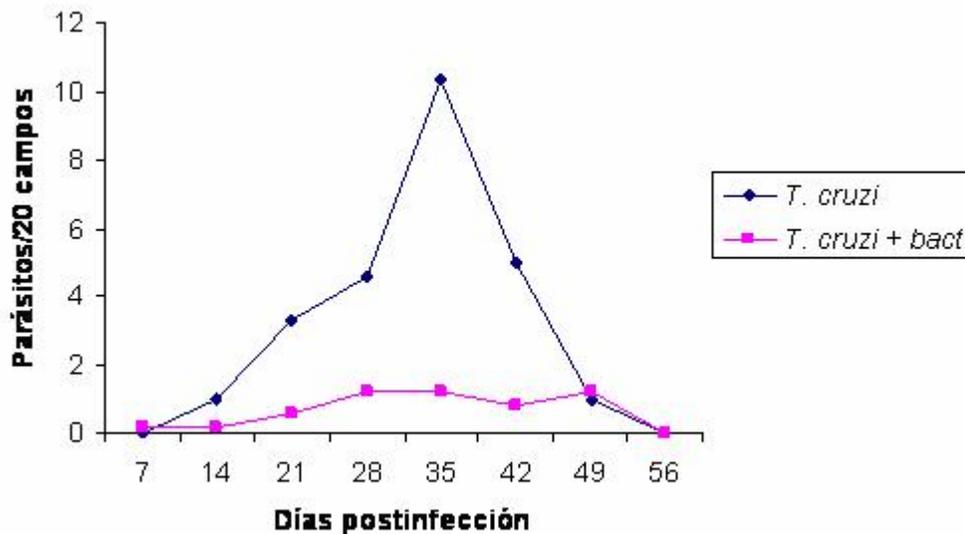
T: Triatomino; He: Muestra de heces; Int: Muestra de intestino; los números indican si provienen de diferentes triatominos o diferentes números de muestra biológica obtenida del mismo triatomino (ir a material y métodos).

Figura. 4 Imágenes de tinción de Gram de las 8 bacterias simbiotes aisladas.



Medición de parasitemia

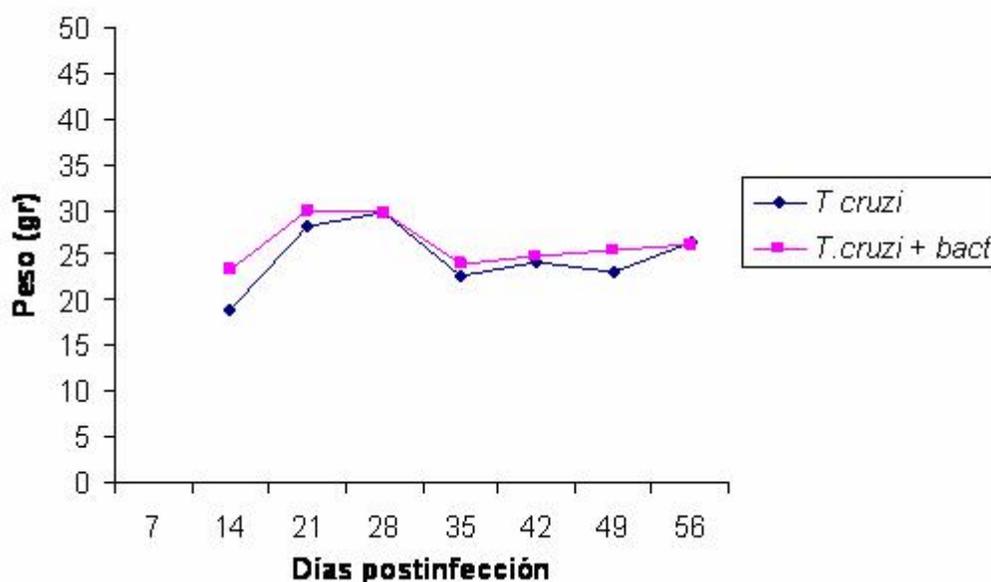
Figura 5. Curva de parasitemia de ratones infectados con *T. cruzi* en presencia o ausencia de bacterias simbiotas en triatominos.



En la Figura 5 se observa el efecto de la parasitemia producida u ocasionada por *T. cruzi* en presencia o ausencia de bacterias simbiotas de triatominos. Se puede observar que cuando *T. cruzi* infecta ratones sin la presencia de bacterias, la intensidad de infección es mayor estadísticamente significativo ($p < 0.05$, $F = 48.27$ para 1 y 6 grados de libertad), alcanzando un pico de máxima parasitemia de 10 parásitos por 20 campos; mientras que en presencia de los simbiotas el pico de la parasitemia solo alcanza hasta 1 parásito en 20 campos. En el primer caso el pico se alcanza al día 35 post-infección; en el segundo caso del día 28 al día 49 se mantiene en un parásito por 20 campos. La detección de parásitos se observó hasta el día 56 post-infección en ambos casos.

Registro de peso

Figura 6. Cinética del peso de los ratones infectados con *T. cruzi* en presencia o ausencia de bacterias simbiotes.



En la Figura 6 se muestra que el peso de los ratones infectados con *T. cruzi* en presencia o ausencia de bacterias simbiotes, no sufre ninguna variación durante el tiempo de infección de manera significativa ($p > 0.05$, $F = 1.55$ para 1 y 7 grados de libertad); manteniéndose en un peso mas o menos constante desde el inicio y durante todo el periodo de infección correspondiente a 56 días.

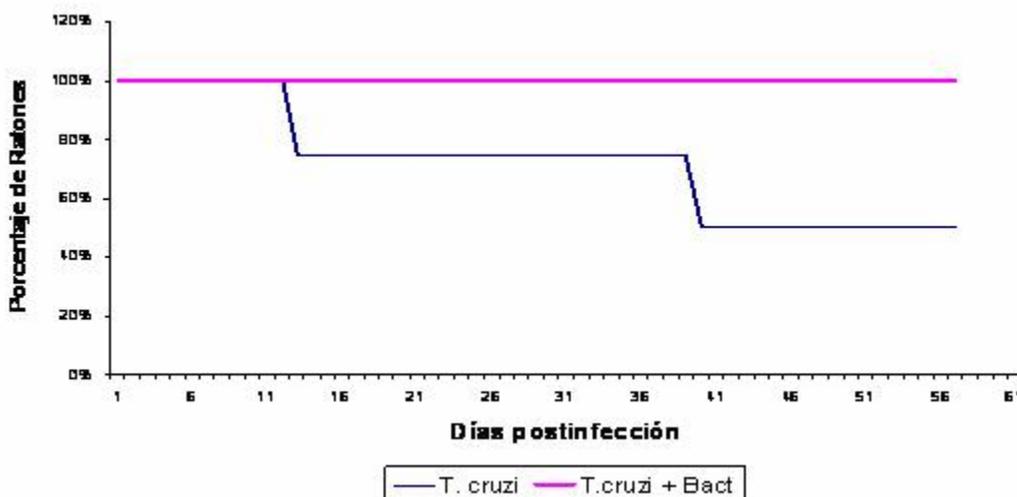
La virulencia de la cepa de *T. cruzi* fue evaluada en ratones por medio de la cinética de parasitemia, curva de sobrevivencia e histotropismo registrada al final de la infección (56 días). Las curvas de parasitemia mostradas en la Figura 5 indican que cuando los parásitos infectaron a los ratones en ausencia de las bacterias

simbiontes, la parasitemia aumenta con el tiempo hasta alcanzar un pico promedio de máxima intensidad de 10 parásitos/20 campos al día 35 de infección, mientras que cuando se encuentra en presencia de los simbiontes, nunca rebasó los 2 parásitos/ 20 campos.

Registro de sobrevivencia

En cuanto a la cinética de sobrevivencia, en la Figura 7 se puede observar que cuando *T. cruzi* es incubado en presencia de simbiontes, el parásito no produce muerte de ratones a lo largo del experimento, mientras que en ausencia de simbiontes *T. cruzi* causa la muerte al 50% de los ratones estudiados, comenzando a matar a partir del día 12 de infección.

Figura 7: Curva de sobrevivencia de ratones infectados con *T. cruzi* en presencia o ausencia de bacterias simbiontes.



En la Figura 7 se representa una curva de sobrevivencia, donde se observa que el tripanosoma en presencia de simbiontes no causa la muerte de los ratones a lo largo

de 56 días, mientras que cuando *T. cruzi* infecta a los ratones en ausencia de simbioses permite la sobrevivencia del 75% al día 12 de infección, y 50% al día 38.

Medición del histotropismo

Respecto al histotropismo *T. cruzi* no produjo nidos de amastigotes en presencia de simbioses a lo largo de la infección de los ratones, sin embargo en ausencia de simbioses llegó a presentar nidos de amastigotes en músculo esquelético y en músculo cardíaco.

Los resultados no se muestran dado que actuaron como controles para los grupos de experimentación de tripanosomas en contacto con simbioses con los que no se produjeron amastigotes y en el que el criterio fue el siguiente:

Encontrar un nido de amastigotes, considerando esto como suficiente para decir que la cepa *T. cruzi* era infectiva y ocasionaba histotropismo.

CAPÍTULO VIII

DISCUSIÓN

Desde 1935 ha sido demostrado que *T. cruzi* se adapta al ambiente existente en el intestino de los triatomíneos, y que dentro de éste no habita solo, sino que también pueden encontrarse microorganismos simbiotes,^{27, 28} por ejemplo los identificados en *Rhodnius prolixus*, como el actinomiceto *Rhodococcus Rhodnii*, *Nocardia sp*, *Corynebacterium* y *Gordonia.K.*^{11,13,15-17,29-32}

Las especies de simbiotes que se han identificado varían entre las distintas especies de triatomíneos;^{13-16, 30} el efecto o consecuencia de dicha relación entre *T. cruzi* y simbiotes es variable, algunas especies de simbiotes se ha demostrado que favorecen el desarrollo de *T. cruzi* proporcionándole complementos nutricionales en su dieta: por ejemplo vitamina B, como es el caso de *Rhodococcus Rhodnii*.^{17,30, 33} Sin embargo algunas otras especies son capaces de disminuir el desarrollo de *T. cruzi*, inclusive pueden ser modificados genéticamente para sintetizar sustancias que lo afecten.^{16-18, 34}

Por otro lado, otras especies de tripanosomátidos además de *T. cruzi* pueden afectar el desarrollo de los simbiotes intestinales en los triatomíneos.³⁵⁻³⁶ En México existen 31 especies de triatomíneos y no se saben los efectos de la presencia de simbiotes que conviven con *T. cruzi* en el intestino de los triatomíneos; de hecho, ni siquiera se sabe si también hay simbiotes o son aposimbióticos pues como señalan Durvasula, Beard, y Dotson ejemplares de 1er estadio y hasta 5to estadio de *Rhodnius Prolixus*

han sido aposimbóticos, es decir carecen de simbioses.^{13,14,17} En este trabajo como primer objetivo se investigó si *T. barberi*, la principal especie transmisora de *T. cruzi* en México, durante todo su desarrollo ninfal y hasta su fase adulta también presenta simbioses. Se pudo observar por pruebas de identificación que su contenido intestinal e inclusive en sus heces contienen simbioses de tipo bacteriano.

También pudimos demostrar que estas bacterias simbioses son capaces de convivir con *T. cruzi* permitiendo su desarrollo. Este resultado es similar al de Eichler, Beard, Cordon-Rosales y Durvasula^{13,15} en el que se muestra que *T. cruzi* aislado de *Rhodnius prolixus* no es afectado por la presencia de su simbioses *Rhodococcus Rodnii*, inclusive en la parte superior y media del intestino del triatómino hay mayor cantidad de simbioses. Lo anterior puede significar que los simbioses produzcan sustancias o nutrientes que favorecen la reproducción de *T. cruzi*;^{11,34,37-39} sin embargo, de acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo se observa que el número de parásitos en sangre de los ratones infectados es menor cuando se encuentra en presencia de simbioses. Probablemente esto ocurra a nivel de la fase de reproducción de *T. cruzi*, que como sabemos extracelularmente es el epimastigote, el cuál se puede reproducir en el intestino medio de los triatominos y de manera *in vitro* en medios de cultivo. Por lo tanto es probable que no favorezca la producción o transformación a la fase de tripomastigote metacíclico, ya que en la parte final del intestino de los triatominos se ha demostrado que la cantidad de parásitos es menor y que a su vez la cantidad de simbioses también es menor, lo cual se pudo observar en medio de cultivo en este trabajo.

Respecto a la virulencia tal parece que se atenúan los factores patogénicos de *T. cruzi* en presencia de los simbioses bacterianos, puesto que la mortalidad que producen en los ratones es nula en comparación de los ratones que no estuvieron en contacto con los simbioses e infectaron ratones quienes mataron el 50% de los animales. Lo anterior se puede explicar tomando en cuenta que los simbioses

favorecen la presencia de epimastigotes, la cual es una fase de replicación pero no es infectiva o bien que más que la presencia de epimastigotes no induzcan la producción o síntesis de moléculas que intervienen en la patogénesis de *T. cruzi*. Este resultado se relaciona con el histotropismo en donde se observa que *T. cruzi* en presencia de simbioses no induce histotropismo, sin embargo *T. cruzi* en ausencia de los simbioses si produce infección en músculo cardiaco y músculo esquelético. Por lo tanto podemos inferir que las bacterias simbioses son elementales en la sobrevivencia y adaptación del triatomino, este resultado concuerda con lo mostrado por Dasch, donde encuentra que si los triatominos no son colonizados con las bacterias, tienen mayor mortalidad entre las mudas y no sobreviven a la adultez.³⁰

Este estudio es el primero que se realiza para saber si los simbioses de triatominos pueden o no favorecer la síntesis de factores de virulencia en *T. cruzi*, como una estrategia para el control de la transmisión de *T. cruzi* por los triatominos, ya que si *T. cruzi* depende de los simbioses para incrementar o disminuir su virulencia, aquellos pueden modificarse genéticamente (transgénesis) y reintroducirlos a los triatominos (paratransgénesis) con la finalidad de eliminar a *T. cruzi*, o por lo menos atenuar su virulencia sin que el triatomino desaparezca.^{15,18,40-42} Estos intentos ya se han logrado en otros estudios y se ha visto que se puede lograr disminuir la cantidad de *T. cruzi* en el triatomino. Por ejemplo Durvasula en 1997 demostró que *Rhodococcus rhodnii* ha sido modificado genéticamente introduciéndole un gene que codifica para cecropin A, un péptido del tipo formador de poros, que tiene una actividad tripanolítica y que inclusive, se ha logrado que el gene se mantenga estable dentro del simbiote hasta por 6 meses. Esta bacteria se ha reintroducido en *Rhodnius prolixus* y se ha ocasionado que la población de *T. cruzi* se vea disminuida dentro del triatomino.^{15,17,43-45} Un péptido de un fragmento de fracción constante de inmunoglobulina también se ha logrado expresar en *Rhodococcus Rhodnii* y al efectuar la paratransgénesis también se ha logrado disminuir la población de *T. cruzi* en el triatomino.^{14,15,23}

Debido a que en México la presencia de triatominos se presenta en casi toda la República Mexicana y que buena parte de ellos están infectados con *T. cruzi*; como una estrategia alternativa de control de la transmisión, sería recomendable emplear la transgénesis en especies de triatominos que existen en México en lugar de la aplicación de insecticidas que son tóxicos, deterioran el ambiente y que por cuestiones evolutivas, se sabe que la extinción de los insectos es prácticamente imposible.^{15-17,46} Sin embargo antes de emprender estas acciones se tiene que conocer el tipo de simbioses y su comportamiento con relación a *T. cruzi* que existen en las especies de triatominos presentes en México. De acuerdo a Durvasula, Beard y Dash; en el caso de *Rhodnius prolixus*, los simbioses se adquieren por coprofagia,^{11,14,36,47} sin embargo en otras especies de triatominos como es el caso de *T. barberi*, importante en México, la coprofagia no se observa a menudo, de aquí que surja la pregunta ¿Cómo adquieren los simbioses los triatominos a través de las generaciones?, pues de acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo, observamos bacterias simbioses desde el momento de la eclosión de los triatominos, hasta su fase de diferenciación sexual pasando por los 5 estadios ninfales, lo que hace suponer que estos no son aposimbióticos ni en el momento de estar dentro del huevo, o que sufren algún tipo de contaminación al momento de la eclosión, similar a lo que ocurre en el humano que adquiere su flora habitual en el canal del parto al momento del nacimiento. Otra manera de explicar este suceso según Dillon y Beard; es que *Rhodnius prolixus* adquiere al simbiote de generación en generación por coprofagia.^{11,14}

Otra inquietud que surgió fue la de identificar a los simbioses en los 5 estadios para ver si únicamente contenían un tipo de bacterias o eran variadas, como ya se mostró en los resultados se identificaron entre 1.4 y 2.4 tipos diferentes en intestino y en heces entre 1.4 y 1.8; lo que indica que en la misma especie los simbioses son muy parecidos a lo largo del tracto intestinal. De estos resultados se desprenden varias interrogantes para demostrar que el estudio de los simbioses permite entrar a una nueva área de control de la transmisión de *T. cruzi*. Por ejemplo: ¿bajo qué

circunstancias los simbioses favorecen o perjudican la presencia de *T. cruzi* en los triatomos?, ¿todas las especies presentes en México tienen los mismos simbioses? O varían entre ellas, o inclusive entre las poblaciones de triatomos de la misma especie pero que colonizan diferentes regiones geográficas?, ¿qué papel juega cada simbiote entre ellos y en conjunto con *T. cruzi*?

Comprender la interacción simbiote-*T. cruzi* en el interior de triatomos y demostrar si los simbioses repercuten en el desarrollo del parásito permitirá establecer una nueva estrategia de control de la transmisión sin necesidad del empleo de insecticidas, con la posibilidad de crear triatomos paratransgénicos, o en su defecto tratando de eliminar simbioses que favorecen el crecimiento de *T. cruzi* dentro del intestino de los triatomos o, por el contrario transferir simbioses que afectan el desarrollo de *T. cruzi* a triatomos que normalmente no forman parte de su ambiente intestinal.

CAPÍTULO IX

CONCLUSIONES

1. *Triatoma barberi* contiene simbioses de tipo bacteriano desde el momento de la eclosión hasta su etapa de diferenciación sexual.
2. Los simbioses influyen negativamente en la reproducción de *T. cruzi*, y atenúan su patogénesis.
3. El estudio de los simbioses es una nueva alternativa con posibilidad de control de la transmisión de *T. cruzi* a través de triatomíneos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Becerril-Flores MA, Romero-Cabello R. Parasitología Médica de las moléculas a la enfermedad. 1ra. edición. México, D.F. Editorial MCGraw-Hill Interamericana, 2004;73-83.
2. World Bank. World Development Report 1993. Investing in health. New York. Oxford University Press, 1993.
3. WHO Expert Committee. Control of Chagas disease. World Health Organ Tech Rep Ser 2002;905.
4. Dias JC, Silveira AC, Schofield CJ. The impact of Chagas disease control in Latin America: a review. Mem Inst Oswaldo Cruz 2002;97:603-612.
5. Del Ray EC, Basombrio MA, Rojas CL, Guzmán MM. Costos de los tratamientos del mal de Chagas. Asociación Argentina de Economía Política, Anales XXVIII Reunión Anual 1993; 1-25.
6. Velasco-Castrejon O, Valdespino JL, Tapia Conyer R, Salvatierra B, Guzmán C, Magos C, Llausás A, Gutierrez G, Sepúlveda J. Seroepidemiología de la enfermedad de Chagas en México. Salud Pública México 1992;34:186-196.
7. Guzmán-Bracho C. Epidemiology of Chagas disease in Mexico: an update. TRENDS in Parasitology 2001;17:372-376.

8. Vidal-Acosta V, Ibañez-Bernal S, Martínez-Campos C. Infección natural de chinches triatominae con *Trypanosoma cruzi* asociadas a la vivienda humana en México. *Salud Pública México* 2000;42:496-503.
9. Ramsey JM, Schofield CJ. Control of Chagas disease vectors. *Salud Pública México* 2003;45:123-128.
10. Azambuja P, García ES, Ratcliffe NA. Gut microbiota and parasite transmisión by insect vectors. *Trends Parasitol* 2005;21:568-572.
11. Dillon RJ, Dillon VM. The gut bacteria of insects: nonpathogenic interactions. *Annu Rev Entomol* 2004;49:71-92.
12. Riehle MA, Jacobs-Lorena M. Using bacteria to express and display anti-parasite molecules in mosquitoes: current and future strategies. *Insect Biochem Mol Biol* 2005;35:699-707.
13. Eichler S, Schaub GA. Development of symbionts in triatomine bugs and the effects of infections with trypanosomatids. *Exp Parasitol* 2002;100:17-27.
14. Beard CB, Dotson EM, Pennington PM, Eichler S, Cordon-Rosales C, Durvasula RV. Bacterial symbiosis and paratransgenic control of vector-borne Chagas disease. *Int J Parasitol* 2001;31:621-627.
15. Beard CB, Cordon-Rosales C, Durvasula RV. Bacterial symbionts of the triatominae and their potential use in control of Chagas disease transmission. *Annu Rev Entomol* 2002;47:123-141.
16. Dotson EM, Plikaytis B, Shinnick TM, Durvasula RV, Beard CB. Transformation of *Rhodococcus rhodnii*, a symbiot of the Chagas disease vector *Rhodnius prolixus*,

with integrative elements of the L1 mycobacteriophage. *Infect Genet Evol* 2003;3:103-109.

17. Durvasula RV, Gumbs A, Panackal A, Kruglov O, Aksoy S, Merrifield RB, Richards FF, Beard CB. Prevention of insect-borne disease: an approach using transgenic symbiotic bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1997;94:3274-3278.

18. Beard CB, Mason PW, Aksoy S, Tesh RB, Richards FF. Transformation of an insect symbiont and expression of a foreign gene in the Chagas' disease vector *Rhodnius prolixus*. *Am J Trop Med Hyg* 1992;46:195-200.

19. Hoy MA. Transgenic insects for pest management programs: status and prospects. *Environ Biosafety Res* 2003;2:61-64.

20. Zeledón R. El triatoma dimidiata Latreille, 1811 y su relación con la enfermedad de Chagas. Costa Rica: Editorial Universidad Estatal a distancia, 1981:2-12.

21. Schofield CJ. Triatominae. *Biología y control*. 1ª edición. UK: Eurocommunica publications, Zeneca Public Health, 1994; 7-13.

22. Schofield CJ, Días JCP. A cost-benefit analysis of Chagas disease control. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 1991;86:285-295.

23. Conte JE Jr. A novel approach to preventing insect-borne diseases. *N Engl J Med* 1997;337:785-786.

24. Durvasula RV, Gumbs A, Panackal A, Kruglov O, Taneja J, Kang AS, Cordon-Rosales C, Richards FF, Whitham RG, Beard CB. Expression of a functional antibody fragment in the gut of *Rhodnius prolixus* via transgenic bacterial symbiont *Rhodococcus rhodnii*. *Med Vet Entomol* 1999;13:115-119.

25. Perez-Brandan C, Padilla AM, Diosque P, Basombrio MA. Tripanosoma cruzi: Infectivity modulation of a clone after passages through different hosts. *Exp Parasitol* 2006.
26. Andrade SG, Campos RF, Sobral KS, Magalhaes JB, Guedes RS, Guerreiro ML. Reinfections with strains of tripanosoma cruzi, of different biotopes as a factor of aggravation of myocarditis and myositis. *Rev Soc Bras Med Trop* 2006;39:1-8.
27. Erikson D. The pathogenic aerobic organisms of the *Actinomyces* group. Medical Research Council Special Report Series 1935;203:5-61.
28. Campbell BC. On the role of microbial symbiotes in herbivorous insects. In *Insect-Plant Interactions*, ed. EA Bernays, 1990;1:1-44. Boca raton, FL: CRC Press.
29. Wigglesworth VB. Symbiotic bacteria in a blood-sucking insect, *Rhodnius prolixus* Stal (Hemiptera, Triatomidae). *Parasitology* 1936;28:284-289.
30. Dasch GA, Weiss E, Chang K. Endosymbionts of insects. *Bergey's Manual of systematic Bacteriology Vol 1*, pp 1984;811-833.
31. Eichler S. "Interaktionen von Triatominen mit ihren Symbionten und Trypanosomatiden". PhD dissertation, Fac.Biology, Ruhr-University Bochum, Germany.
32. Eichler S, Reintjes N, Jung M, Yassin AF, Schaal KP, Junqueira A, Coura JR, Schaub GA. Identification of bacterial isolates and symbionts from wild populations of *Triatoma infestans* and *T.sordida*. *Memorias do Instituto OswaldoCruz* 1996;91:125.
33. Goebel W, Gross R. Intracellular survival strategies of mutualistic and parasitic prokaryotes. *Trends Microbiol* 2001;9:267-273.

34. Watkins R. Histology of *Rhodnius prolixus* infected with *Trypanosoma rangeli*. *Journal of invertebrate Pathology* 1971;17:59-66.
35. Watkins R. "Host-Parasite Interaction between *Trypanosoma* species and *Rhodnius prolixus* Stal (Hemiptera, Reduviidae)." PhD thesis, University of California, Berkeley 1969.
36. Watkins R. *Trypanosoma rangeli*: Effect on excretion in *Rhodnius prolixus*. *Journal of invertebrate Pathology* 1971;17:67-71.
37. Douglas AE, Beard CB. Microbial brokers of insect-plant interactions. *Proc. 8th Int. Symp. Insect-Plant Relationships* 1992:329-336.
38. Tanada Y, Kaya HK. Associations between insects and nonpathogenic microorganisms. *Insect Pathology* 1993:12-51.
39. Appel HM. The chewing herbivore gut lumen: physicochemical conditions and their impact on plant nutrients, allelochemicals and insect pathogens. In *Insect Plant Interactions* ed EA Bernays 1994;5:209-221.
40. Beard CB, Aksoy S. Genetic manipulation of insect symbionts. In *Molecular Biology of Insect Disease Vectors*, ed JM Crampton 1998:555-560.
41. Beard CB, Durvasula RV, Richards FF. Bacterial symbiosis in arthropods and the control of disease transmission. *Emerg. Infect. Dis* 1998;4:581-591.
42. Beard CB, Durvasula RV, Richards FF. Bacterial symbiont transformation in Chagas disease vectors. In *Insect Transgenesis* Boca Raton Florida 2000:289-303.
43. Boman HG. Antibacterial peptides: key components needed in immunity. *Cell* 1991;65:205-207.

44. Boman HG, Faye I, Gan R, Gudmundsson GH, Lidholm DA. Insect immunity a gene system for antibacterial proteins. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 1987;82:115-124.
45. Xanthopoulos KG, Lee JY, Gan R, Kockum K, Faye I, Boman HG. The structure of the gene for cecropin B, an antibacterial immune protein from *Hyalophora cecropia*. *Biochem* 1988;172:371-376.
46. WHO. Vector resistance to pesticides. Fifteenth report of the WHO Expert Committee on Vector Biology and Control. WHO Tech.Rep.Ser. 1992:818-862.
47. Durvasula RV, Kroger A, Goodwin M, Panackal A, Kruglov O, Taneja J, Gumbs A, Richards FF, Beard CB, Cordon-Rosales C. Strategy for introduction of foreign genes into field populations of Chagas disease vector. *Ann. Entomol. Soc. Am* 1999;92:937-943.

NOTA:

El índice de similitud de Jaccard se obtuvo de:

Real R, Vargas JM. The Probabilistic Basis of Jaccard's Index of Similarity. *Syst. Biol.* 1996;45(3):380-385.