



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

**INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA
CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
ÁREA ACADÉMICA DE BIOLOGÍA
LICENCIATURA EN BIOLOGÍA**

**EFFECTO DE LA PRESENCIA DE ENDOSIMBIOTES SOBRE EL DESARROLLO DE
Triatoma barberi Y LA COLONIZACIÓN DE *Trypanosoma cruzi*.**

TESIS QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

LICENCIADA EN BIOLOGÍA

P R E S E N T A

Abigail García Castro

DIRECTOR: Marco Antonio Becerril Flores

MINERAL DE LA REFORMA, HIDALGO

MAYO 2014

Índice

Índice de figuras	iv
1. Resumen.....	1
3. Marco Teórico.....	3
3.1 Agente etiológico	3
3.2 Ciclo biológico de <i>Trypanosoma cruzi</i>	6
3.4 Epidemiología.....	9
3.5 Vías de transmisión de <i>Trypanosoma cruzi</i>	10
3.5.1 Transmisión vectorial	10
3.5.2 Transmisión por transfusión sanguínea.....	10
3.5.3 Transmisión congénita.....	11
3.5.4 Transmisión accidental	12
3.6 Triatomíneos	13
3.6.1 Características morfológicas	14
3.6.2 <i>Triatoma barberi</i>	16
3.7. Simbiosis y simbiotes.....	19
3.8. Tratamiento y prevención contra la enfermedad de Chagas.....	20
4. Antecedentes.....	21
5. Planteamiento del problema.....	25
6. Hipótesis.....	25
7. Justificación.....	25
8. Objetivos.....	26
8.1 Objetivo general	26
8.2 Objetivos particulares.....	26
9. Material y métodos.....	26
9.1 Aislamiento y selección de endosimbiontes	26
9.2 Selección de antibióticos	27
9.3 Selección de la concentración óptima del antibiótico.....	28
9.4 Cultivo de endosimbionte seleccionado.....	29
9.5 Cultivo de <i>Trypanosoma cruzi</i>	30
9.6 Determinación de la viabilidad de <i>Trypanosoma cruzi</i> en un medio <i>in vitro</i>	30

9.7 Determinación de la viabilidad de <i>Trypanosoma cruzi</i> en un medio <i>in vitro</i> sobre sangre hemolizada	31
9.8 Desarrollo de triatomíneos libres de endosimbiontes.....	32
10. Resultados	33
10.1 Aislamiento y selección de endosimbiontes.....	33
10.2 Selección de antibiótico	35
10.3 Concentración óptima del antibiótico.....	38
10.4 Determinación de la viabilidad de <i>Trypanosoma cruzi</i> en un medio <i>in vitro</i>	40
10.5 Viabilidad de <i>Trypanosoma cruzi</i> en un medio <i>in vitro</i> sobre sangre hemolizada ..	41
10.6 Desarrollo de triatomíneos libres de endosimbiontes	43
11. Discusión.....	45
12. Conclusiones	50
Referencias Bibliográficas.....	51

Índice de figuras

1: Formas de desarrollo de <i>Trypanosoma cruzi</i>.	5
2: Ciclo biológico de <i>Trypanosoma cruzi</i>.	7
3: Morfología externa de triatominos. Vista dorsal.	14
4: Ciclo biológico de triatominos.	15
5: Distribución geográfica de las especies de triatominos en México.	17
6 Distribución geográfica de las especies de triatominos en Hidalgo.	18
7: Agara sangre hemolizado por bacterias.	27
8: Método y zona de conteo en cámara de Neubauer	31
9: Celdas de esterilidad para el mantenimiento de los huevos de <i>Triatoma barberi</i>.	33
10: Hemólisis β de los cuatro endosimbiontes seleccionados Tbn 1.2, Tbn 1.3, Tbn 1.4 y Tbn 4.4.	34
11: Antibiogramas realizados a endosimbiontes hemolíticos.	36
12: Halos de inhibición de eritromicina sobre endosimbiontes	39
13: Curvas de crecimiento de <i>Trypanosma cruzi</i> en presencia y ausencia del endosimbionte Tbn 1.3.	41
14: Curva de crecimiento de <i>Trypanosoma cruzi</i> sobre un medio con sangre hemolizada.	42
15: Ninfas de <i>Triatoma barberi</i> en celdas estériles.	44

Dedicatorias y Agradecimientos

A mi familia:

A mi papá y a mi mamá, gracias por sus consejos, su apoyo, su sabiduría, por saber guiarme en este difícil camino. Los quiero infinitamente. A mi querido hermano por tus risas, tus historias, siempre contarás conmigo. Te quiero. A Gustavo, por estos 4 años juntos, por tu compañía, tus ánimos, tu comprensión y por todo tu cariño, gracias por estar aquí.

A mi Director:

Gracias por permitirme trabajar en su laboratorio, gracias por las enseñanzas, las pláticas, los consejos y el tiempo que ha dedicado en la realización de este trabajo que también es suyo.

A mis amigos:

A todos mis amigos y compañeros de laboratorio que hacen que las horas se disfruten en especial a Laura, César y a Paty por siempre apoyarnos en todo lo que necesitamos. Y a todos los que han trabajado en el laboratorio que a pesar de haber estado poco tiempo dejan una huella y un gran aprendizaje.

A mis amigos Sandy, Victor, Salvador, Karen, Sergio que han estado conmigo durante varios años y agradezco su amistad infinitamente.

Son muchas las personas a la que me gustaría agradecer su amistad, su apoyo, ánimo y compañía en las diferentes etapas de mi vida. Algunas están aquí conmigo, otras han seguido caminos diferentes y algunas en mis recuerdos. Gracias a todos lo que han estado conmigo.

"La dicha de la vida consiste en tener siempre algo que hacer, alguien a quien amar y alguna cosa que esperar."

Thomas Chalmers

1. Resumen

La enfermedad de Chagas, cuyo agente etiológico es el protozooario flagelado *Trypanosoma cruzi*, es un problema de salud pública que amenaza la vida de la gente que vive en zonas endémicas, es decir cualquier región en donde se presente la existencia de insectos vectores denominados triatominos, así como *Trypanosoma cruzi* y personas infectadas. Conocer las interacciones mutualistas entre el parásito y las colonias microbianas que se encuentran dentro del intestino del triatomino puede conducir a planear una estrategia para el control de la enfermedad, diseñando distintos modelos que ayuden a contrarrestar el crecimiento del parásito, conociendo si el desarrollo del parásito depende de la presencia de los endosimbiontes, así como el desarrollo del propio triatomino.

Para saber si los endosimbiontes favorecen el desarrollo de *T. cruzi*, se trabajó con una cepa de endosimbiontes que tuviera la característica de haber sido aislada del intestino de triatomino, ser hemolítica y susceptible a un antibiótico. Para este ensayo se realizaron diversos antibiogramas y se seleccionaron los endosimbiontes que resultaron mejor inhibidos en su crecimiento y que tuvieran la capacidad de hemolizar la sangre, para poder estudiar su interacción con el parásito *T. cruzi* y el insecto vector *Triatoma barberi*. Igualmente se utilizó sangre hemolizada por los endosimbiontes, considerando si es posible que éstos le proporcionan la sangre hemolizada a *T. cruzi* para su desarrollo.

Los resultados señalan que en presencia de endosimbiontes *T. cruzi* es afectado en su desarrollo impidiendo su crecimiento, de manera que se pueden diseñar estrategias donde se infecten triatominos con endosimbiontes hemolíticos evitando el establecimiento del parásito en el insecto transmisor. Lo contrario sucede con *Triatoma barberi*, el cual su desarrollo depende de la presencia de endosimbiontes. Por último, los resultados

demonstraron que aunque *Triatoma barberi* necesita de una microbiota intestinal para su desarrollo, no es necesariamente para su digestión, ya que con el uso de sangre hemolizada por dichos endosimbiontes no existe crecimiento de *Trypanosoma cruzi*.

2. Introducción

La enfermedad de Chagas (también conocida como Tripanosomiasis Americana), es considerada como una de las enfermedades parasitarias de mayor incidencia en toda América superando otras enfermedades como la malaria, Leishmaniasis y equistosomosis (Schofield y Dias, 1999). Esta enfermedad representa un grave problema de salud en todo el continente Americano, ya que existen alrededor de 16 a 18 millones de personas infectadas, y se estima que 100 millones de ellas están en peligro de contraer la enfermedad (Zavala-Castro, 2011). El agente causal de este padecimiento es el protozoario flagelado *Trypanosoma cruzi*, cuyo vector es un insecto hematófago denominado triatomino. El principal mecanismo de transmisión es a través de las deyecciones de triatominos, cuando se están alimentando del humano o de un animal de sangre caliente, la picadura produce comezón sobre la piel del mamífero y éste al rascarse se auto infecta con el parásito que está presente en las heces del insecto vector.

Una de las principales especies de triatominos hematófagos en México que actúa como vector del parásito es *Triatoma barberi* (Usinger, 1944), la cual se encuentra en 12 estados de la República, incluyendo al estado de Hidalgo. Se sabe que dentro del intestino de estos triatominos existe una microbiota compuesta de bacterias simbiotes, que en algunos casos pueden ayudar o evitar la presencia de distintos tripanosomátidos (De la Cruz, 2013).

En México, se conoce poco sobre la relación que estos endosimbiontes tienen con los triatominos y con *Trypanosoma cruzi*. El objetivo principal de este trabajo fue investigar el efecto de la presencia de endosimbiontes sobre el desarrollo de *Triatoma barberi* y sobre el establecimiento de *Trypanosoma cruzi* mediante el uso de un antibiótico, para observar la reacción del parásito al eliminar los endosimbiontes que interactúan con él.

3. Marco Teórico

3.1 Agente etiológico

La clasificación de *Trypanosoma cruzi*, el agente etiológico de la enfermedad de Chagas es la siguiente:

Reino: Protista

Subreino: Protozoa

Phylum: Sarcomastigophora

Subfilum: Mastigophora

Clase: Zoomastigophora

Orden: Kinetoplastida

Familia: Trypanosomatidae

Género: *Trypanosoma*

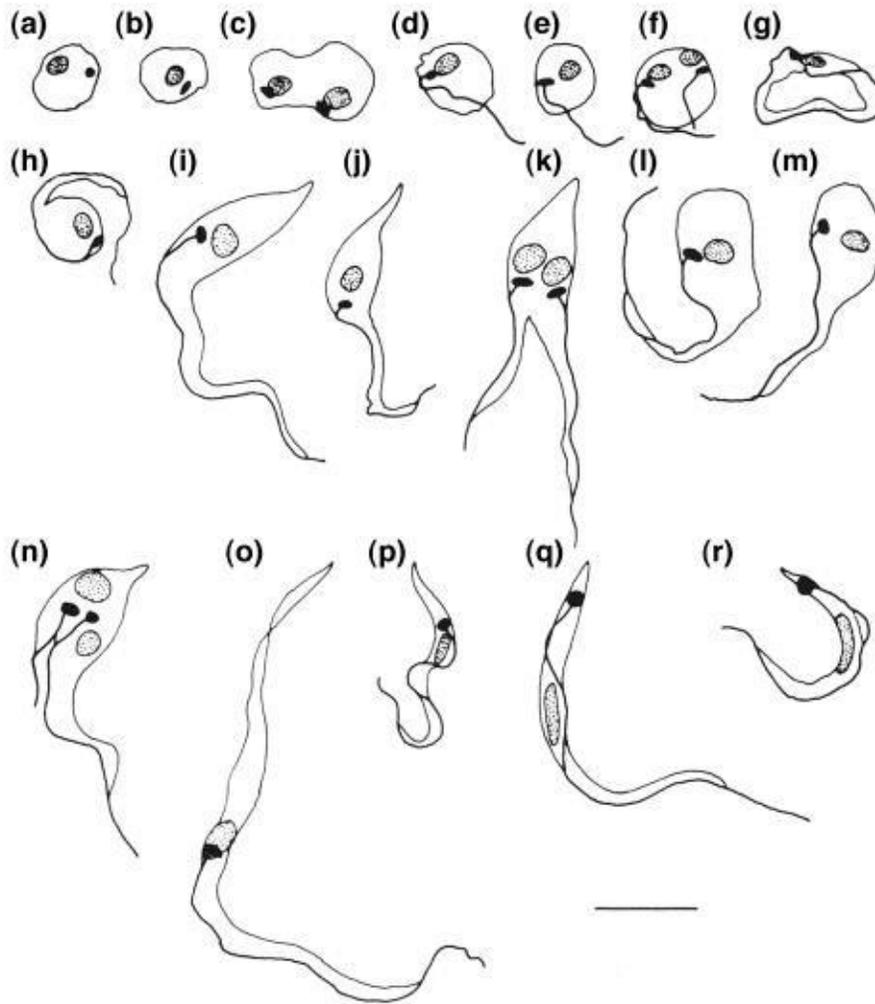
Subgénero: *Schizotrypanum*

Especie: *Trypanosoma cruzi*

Su nombre taxonómico completo es: *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* (Beaver *et al.*, 1986; Cuyás y García, 1995; Kenneth, 1982).

Este protozoario existe en al menos tres formas morfológicamente distintas (Figura 1): tripomastigotes sanguíneos y metacíclicos, los cuales se caracterizan por ser la forma infectante dentro del ciclo; los epimastigotes, que se encuentran principalmente en el insecto vector y en los cultivos donde se mantienen a los parásitos; y los amastigotes que se encuentran dentro de la célula infectada de cualquier mamíferos (Hernández *et al.*, 1991; García, 1995).

El tripomastigote presenta una forma alargada, fusiforme y presenta una membrana ondulante bordeada por un flagelo que se inicia en el cinetoplasto y sale del parásito por su extremo anterior, su tamaño aproximado es de 20 μm de longitud, posee un núcleo grande cerca de la parte central de su cuerpo (Moncayo, 1999). Los epimastigotes presentan un cinetoplasto y al igual que el tripomastigote tiene una longitud aproximada de 20 μm , presenta un flagelo libre, es en ésta etapa donde el parásito se multiplica asexualmente en el intestino medio del vector (Atias y Neghme, 1991). Los amastigotes presentan una forma redonda u ovoide, mide aproximadamente de 1.5 a 4 micras, el cinetoplasto posee una forma de bastón o esférico, se reproduce por fisión binaria, formando nidos en el interior de las células. El tamaño notoriamente grande de este parásito permite diferenciarlo del resto de las demás especies de tripanosomas (Moncayo, 1999).



1: Formas de desarrollo de *Trypanosoma cruzi*.

Figura 1. Formas de desarrollo de *Trypanosoma cruzi* encontrados en el intestino delgado y el recto de *Triatoma infestans*. Amastigotes (a-c) y Esferomastigotes (d-f) con cinetoplasto redondo (a, d) y con cinetoplasto horizontal (b, e); etapas de división (c, f); fases intermedias de Esferomastigotes y Epimastigotes, de forma circular (g) o forma enrollada (h); Epimastigotes de forma larga (i) corto (j) o en fase de división (k); formas intermedias entre Esferomastigotes (o Epimastigotes) y Tripomastigotes con un centro posterior y un cinetoplasto lado (l) o al lado posterior del núcleo (m); formas intermedias entre Epimastigotes y Tripomastigotes, incluyendo divisiones diferentes (n) y las etapas largas y delgadas (o) o corto (con un cinetoplasto al lado o detrás del núcleo, pero no subterminal) (p); Tripomastigotes con un cinetoplasto subterminal largo (q) o corto (r) (Tomado de De la Cruz, 2013).

3.2 Ciclo biológico de *Trypanosoma cruzi*

El ciclo inicia cuando un vector se infecta al chupar la sangre del hombre o mamíferos con tripomastigotes sanguíneos (Figura 2). La digestión de sangre por los triatomíneos es un proceso lento, por lo que la infección se da después de 10 a 30 días posterior a la picadura del huésped infectado. Una vez que el vector ha sido infectado, permanece así toda su vida, aunque los parásitos pueden sobrevivir durante varios días después de la muerte de la chinche (Wilson, 1991). En el intestino de los insectos los tripomastigotes sanguíneos se transforman en epimastigotes y en el recto sufren otra transformación a tripomastigotes metacíclicos, el cual es la forma infectante para el huésped vertebrado y finalmente son eliminados con el líquido de las heces de la chinche (Heyneman y McKerrow, 1991). La defecación de la chinche se produce en el momento de la picadura, mientras se alimenta, o muy poco después. Esto ocurre en la noche y la picadura ocasiona prurito (Tomlinson *et al.*, 1995), por lo que el hombre picado en el transcurso del sueño, se auto infecta rascándose la herida (Krogstad, 1994).

Una vez en el huésped vertebrado, los parásitos entran a las células susceptibles, en las cuales se liberan del flagelo y de la membrana ondulante transformándose en amastigotes, que se replican intracelularmente y formando nidos de amastigotes, que conllevan a la rotura celular. Los amastigotes son liberados a la circulación sanguínea, se alargan, forman flagelos y se convierten en tripomastigotes. Éstos entran a otras células para repetir el ciclo o son ingeridos por el insecto vector (Anselme y Moleiro, 1974). En esta etapa se asegura la transmisión de la enfermedad debido a la elevada parasitemia.

Todos los tejidos pueden ser invadidos, pero los más afectados son aquellos ricos en células del sistema reticuloendotelial, teniendo preferencia por los macrófagos, el tejido muscular cardíaco, muscular estriado, muscular liso, y el menos frecuente, el tejido nervioso (Luquetti, 1994).

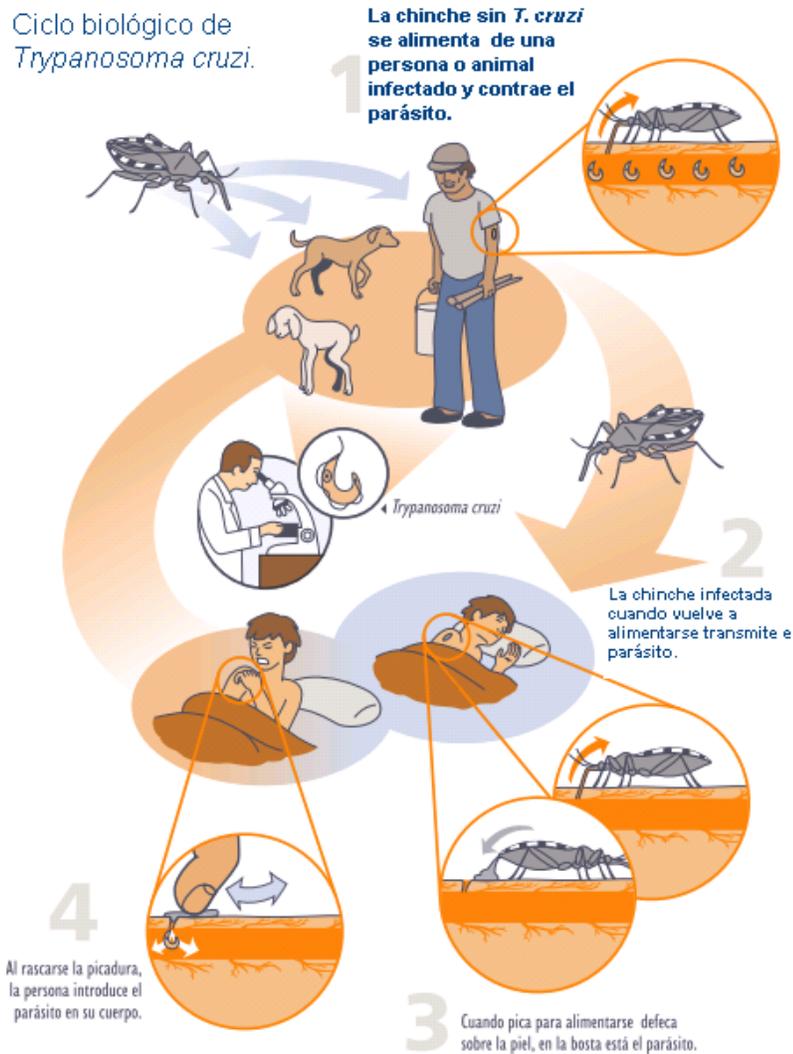


Figura 2 Ciclo biológico de *Trypanosoma cruzi*. El principal mecanismo del ciclo comienza donde una chinche no infectada se alimenta de mamíferos con *Trypanosoma cruzi* y contrae el parásito, transmitiendo así la enfermedad de Chagas en humanos y animales de sangre caliente (Tomado y editado de Blanco et al., 2006).

3.3 Enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas, es una zoonosis causada por *T. cruzi*, un protozooario hemoflagelado transmitido a vertebrados susceptibles por hemípteros hematófagos de la subfamilia Triatominae. Fue reportada por primera vez en 1909 por Carlos Chagas, este investigador descubre la enfermedad en el estado brasileño Minas Gerais y describe los hechos etiológicos, clínicos, epidemiológicos y parasitológicos que le conciernen. Está restringida al área continental de América, por lo que se denomina también tripanosomiasis Americana (Benenson, 1992).

Esta enfermedad, se mide por el impacto económico que se produce en los países afectados. La OMS calculó que entre 1985 y 1987 se perdieron 2 740 000 años productivos, lo que equivale a US \$ 6,500 millones (Zavala-Castro, 2011).

La enfermedad de Chagas presenta tres fases, aguda, intermedia y crónica.

Fase aguda: En esta etapa se pueden encontrar parásitos después de 14 a 28 días y hasta 6 meses, a partir de la infección. Se caracteriza por una intensa multiplicación parasitaria. Es más visible en menores de 6 años, la mortalidad en esta etapa es muy baja. Es común que en esta etapa se produzca una lesión inflamatoria en la puerta de entrada del parásito y se le conoce con el nombre de Chagoma, cuando se compromete el párpado se le llama signo de Romaña-Mazza, se caracteriza por la inflamación indolora de ambos párpados, con presencia de pápulas rojizas y edema (García, N.M., 1995; Benenson, 1997).

La fase aguda puede durar hasta 60 días y se caracteriza por malestar general, fiebre continua, dolores musculares, epistaxis, escalofrío, hepatoesplenomegalia y esplenomegalia, además de que el individuo también llega a presentar astenia y adinamia

(Becerril-Flores y Romero-Cabello, 2004). Generalmente esta fase pasa desapercibida y se presenta con mayor frecuencia en lactantes y niños, mientras que en el adulto puede ser asintomática o los síntomas pueden ser leves o poco característicos y de intensidad variable como anorexia, vómitos, diarrea, postración y cefalea (Botero y Restrepo, 2003).

Fase intermedia: Este período que va desde el final de la fase aguda hasta la aparición de los primeros síntomas de la fase crónica es llamado latente o indeterminado con una duración media de hasta 20 años. En esta fase el paciente es asintomático a pesar de las complicaciones que se inician en el corazón y el tubo digestivo. Puede haber manifestaciones electrocardiográficas, en ocasiones muy inespecíficas (Botero y Restrepo, 2003).

Fase crónica: Esta fase se caracteriza por lesiones típicas del corazón o tubo digestivo, durante esta etapa la patología más importante es la cardiopatía chagásica, es muy frecuente la muerte súbita sin haber desarrollado insuficiencia cardíaca, se presenta hasta 10 años o más después de la fase aguda. Las manifestaciones clínicas del corazón dependen de la extensión de las lesiones de este órgano y son frecuentes las palpitaciones, los mareos, náuseas, diarrea, dolor pectoral, síncope y edema (Botero y Restrepo, 2003).

3.4 Epidemiología

Esta enfermedad es una infección zoonótica y afecta tanto a animales domésticos y salvajes como al hombre (Asin y Giojalas, 1995). La enfermedad de Chagas es transmitida por insectos hematófagos nocturnos, que pertenecen al Orden Hemiptera y corresponde a tres géneros de la Familia Reduviidae, conocidos como reduvidos o triatomíneos. El nombre de las especies por las que son popularmente conocidas varían en los diferentes países y según la región en la que se encuentre, algunos de los nombres

son: “chinchas besuconas, vinchucas, pitos, barbeiros, chipos”, entre otros. Estos insectos suelen habitar en las grietas de las casas rurales, saliendo de noche para alimentarse, en la cual el hombre es víctima (Petry y Eisen, 1989; Wilson, 1991). Las vías de transmisión para el hombre pueden ser: el insecto transmisor infectado, transfusión de sangre contaminada, transmisión congénita. Otros mecanismos de transmisión menos frecuentes son los trasplantes de órganos procedentes de donantes parasitados, accidentes de laboratorios, por lactancia materna o por vía oral (ingestión de carne semicruda o sangre de animales parasitados y de bebidas contaminadas con materia fecal de triatominos (Velasco *et al.*, 1994; Benenson, 1997). Las chinchas pueden contraer la infección, absorbiendo las deyecciones infectadas de otras chinchas (Petry y Eisen, 1989; Wilson, 1991).

3.5 Vías de transmisión de *Trypanosoma cruzi*

3.5.1 Transmisión vectorial

La transmisión vectorial se produce indirectamente, cuando se produce contacto con la materia fecal infectada de parásitos, ya sea con el orificio de la piel producido por la picadura del triatmino, o por el contacto de las heces sobre mucosas del huésped como el ojo, nariz y boca (Garrido *et al.*, 2007).

3.5.2 Transmisión por transfusión sanguínea

Actualmente la transmisión por transfusión sanguínea es la segunda causa de infección por *T. cruzi*, después de la transmisión vectorial. La enfermedad de Chagas, es potencialmente transmisible por transfusión sanguínea, por lo que debe ser estudiada principalmente en zonas endémicas, donde existan donadores infectados (Werner *et al.*, 2008).

El número de casos de Chagas post-transfusional ha de entre 300 y 800 casos (Wendel, 1998; Hernández-Becerril *et al.*, 2005), si bien son cifras que se consideran infravaloradas. Una de las causas de esta infravaloración es la existencia de personas asintomáticas infectadas por transfusión (Leiby *et al.*, 1999). La transfusión actualmente se ha convertido en una fuente importante de contagio en América Latina, principalmente derivado del flujo migratorio de zonas rurales a zonas urbanas (Schmunis, 1991).

3.5.3 Transmisión congénita

Se trata de una de las vías más importantes, junto a la vectorial y comienza a adquirir mayor relevancia precisamente en las regiones endémicas donde está presente la enfermedad (Moncayo, 1999). Este tipo de transmisión se da cuando ocurre el paso intrauterino de *T. cruzi* al embrión, aunque los parásitos también pueden pasar a través de la leche materna al recién nacido (Werner, 1972).

El riesgo de infección congénita reportada por la OMS (Organización Mundial de la Salud) es del 1%, lo que indica que 8000 niños al año son infectados congénitamente en Latinoamérica (Andrade y Matelli, 1994).

En Argentina, se estima que por cada contagio de la enfermedad de Chagas debido a la transmisión vectorial, habrá alrededor de 10 casos congénitos, usualmente asintomáticos, y por cada uno de estos casos congénitos que se detectan y notifican a instituciones de Salud Pública, habrá entre 6 y 12 que no se descubren ni se tratan (Lucero *et al.*, 2006).

3.5.4 Transmisión accidental

Ocurre en laboratorios u hospitales, y se da por el manejo inadecuado del material biológico contaminado por parte de los mismos investigadores, o del personal colaborador y auxiliar. Por ejemplo: manejo de triatominos, cultivos, animales de experimentación infectados, manejos de sangre de pacientes, entre otros. Esta enfermedad presenta un riesgo mayor con respecto a la enfermedades infecciosas, incluyendo infecciosas virales y bacterianas. En el 2002, la OMS registra más de 70 casos bien documentados en técnicos, médicos e investigadores, al manipular diferentes tipos de materiales contaminados, como excretas de triatominos, cultivos de parásitos y sangre infectada de seres humanos y animales.

3.6 Triatominos

Los triatominos comprenden el único grupo de hemípteros con hábitos hematófagos obligados a través de todo su ciclo de vida (Usinger, 1944). Tal característica le da importancia en salud pública por ser transmisores del hemoparásito *Trypanosoma cruzi*. Su clasificación taxonómica es la siguiente (Borror, 1979; Castillo, 2000):

Reino - Animalia

Phylum – Arthropoda

Subphylum - Mandibulata

Clase – Insecta

Orden - Hemiptera

Familia - Reduviidae

Subfamilia - Triatominae

Géneros – *Triatoma*

Dipetalogaster

Rhodnius

Panstrongylus

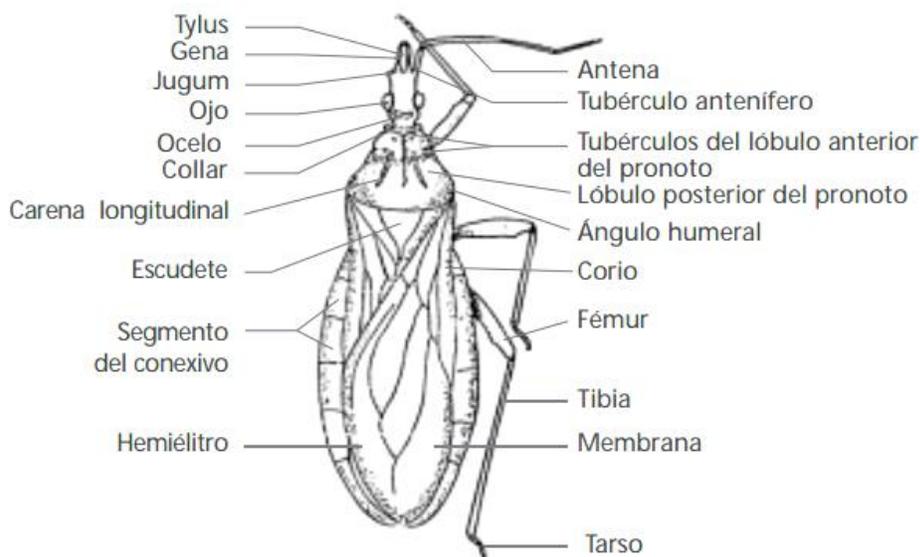
Eratyrus

Belminus

Paratriatoma

3.6.1 Características morfológicas

Como la mayoría de los insectos, los triatominos presentan el cuerpo dividido en tres regiones: cabeza, tórax y abdomen, posee tres pares de patas y dos pares de alas; un par anterior llamado hemiélitros compuesto por una parte basal endurecida y una parte distal membranosa y el segundo par totalmente membranoso. Presentan un conexivo, que es el margen lateral del abdomen, achatado y sobresaliente, generalmente oscuro con manchas claras; aparato bucal picador-chupador (Figura 3); posee una metamorfosis incompleta con un estado de huevo, ninfa (cinco estadios) y adulto (Figura 4).



3: Morfología externa de triatominos. Vista dorsal.

Figura 3. Las distintas especies de triatominos difieren por su aspecto morfológico como el tamaño del cuerpo y la coloración, así como la división y el color de los segmentos del conexivo (Tomado y editado de Abalos, 1981).



4: Ciclo biológico de triatominos.

Figura 4. Los triatominos presentan distintos estadios morfológicos, que van desde huevo pasando por cinco estadios ninfales hasta su diferenciación sexual macho y hembra respectivamente (Tomado de Blanco *et al.*, 2006).

A diferencia de que algunas chinches entomófagas o depredadoras, cuyo pico es curvo, las chinches hematófagas, tienen un aparato bucal recto. El tamaño varía desde 5 a 45 mm, por lo general la hembra es de mayor tamaño que el macho y posee genitales externos. Las dimensiones, la coloración y el conexivo varían según la especie de chinche.

Los huevos son colocados sueltos en lugares ocultos, presentan un color blanquecino cuando recién son puestos, cambiando a rosado cuando el embrión se desarrolla. Las hembras ponen cientos de huevos que eclosionan entre los 15 y 50 días, según la temperatura ambiente. En experimentos realizados bajo condiciones controladas de laboratorio (27°C y frecuencia de alimentación cada 15 días) el tiempo de desarrollo ninfal fue de aproximadamente 5 meses y la media de vida del adulto hembra es de 4.6 meses (Carcavallo y Martínez, 1972). En experimentos realizados en ranchos experimentales bajo condiciones naturales, la media de vida del adulto fue de 6.7 meses (Cécere *et al.*, 2003). Las ninfas mudan de cutícula 5 veces, aumentando cada vez su

tamaño, son parecidas a los adultos pero éstos carecen botones o primordios alares. En la última muda aparecen las alas y el insecto adopta el aspecto adulto.

Las chinches son hematófagas en todos sus estadios y desde que comienzan a alimentarse, pueden infectarse y transmitir el parásito. Pueden pasar varias semanas e incluso varios meses sin ingerir alimento (Blanco *et al.*, 2006).

3.6.2 *Triatoma barberi*

Existen 31 especies de triatominos reportados en México, de las cuales, nueve son consideradas como importantes por su contribución al mantenimiento de la enfermedad en humanos y animales (Cruz-Reyes y Pickering-López, 2006). En el estado de Hidalgo se reportan cuatro especies, la más importante es *Triatoma barberi*, esta especie se encuentra ubicada dentro de las 10 especies que presentan mayor relevancia epidemiológica por la transmisión del parásito *T. cruzi* a los humanos (Galvão *et al.*, 2003; Guzmán-Bracho, 2001; Guzmán-Marín, 1990). *Triatoma barberi* es considerada la especie endémica más importante en México transmisora de la enfermedad de Chagas debido a sus hábitos domésticos y peridomésticos (Salazar-Schttino *et al.*, 2005; Zárate, 1983), por presentar una amplia distribución geográfica que abarca 14 estados (Figura 5) principalmente en la región central del país y porque generalmente coexiste con otras especies domésticas como *Triatoma dimidiata* y *Triatoma pallidipennis* (Guzmán-Bracho, 2001; Peterson *et al.*, 2002).

En el estado de Hidalgo la Enfermedad de Chagas comienza a considerarse un problema de salud pública. Se sabe que existe una seropositividad de 0.78% y en el 2001, se notificaron 7 casos agudos confirmados. En el Laboratorio Estatal de Salud Pública de Hidalgo de 1996 a 2001 se estudiaron 5,552 triatominos, los cuales se identificaron taxonómicamente, se les realizó la búsqueda de *T. cruzi* y se obtuvieron los registros

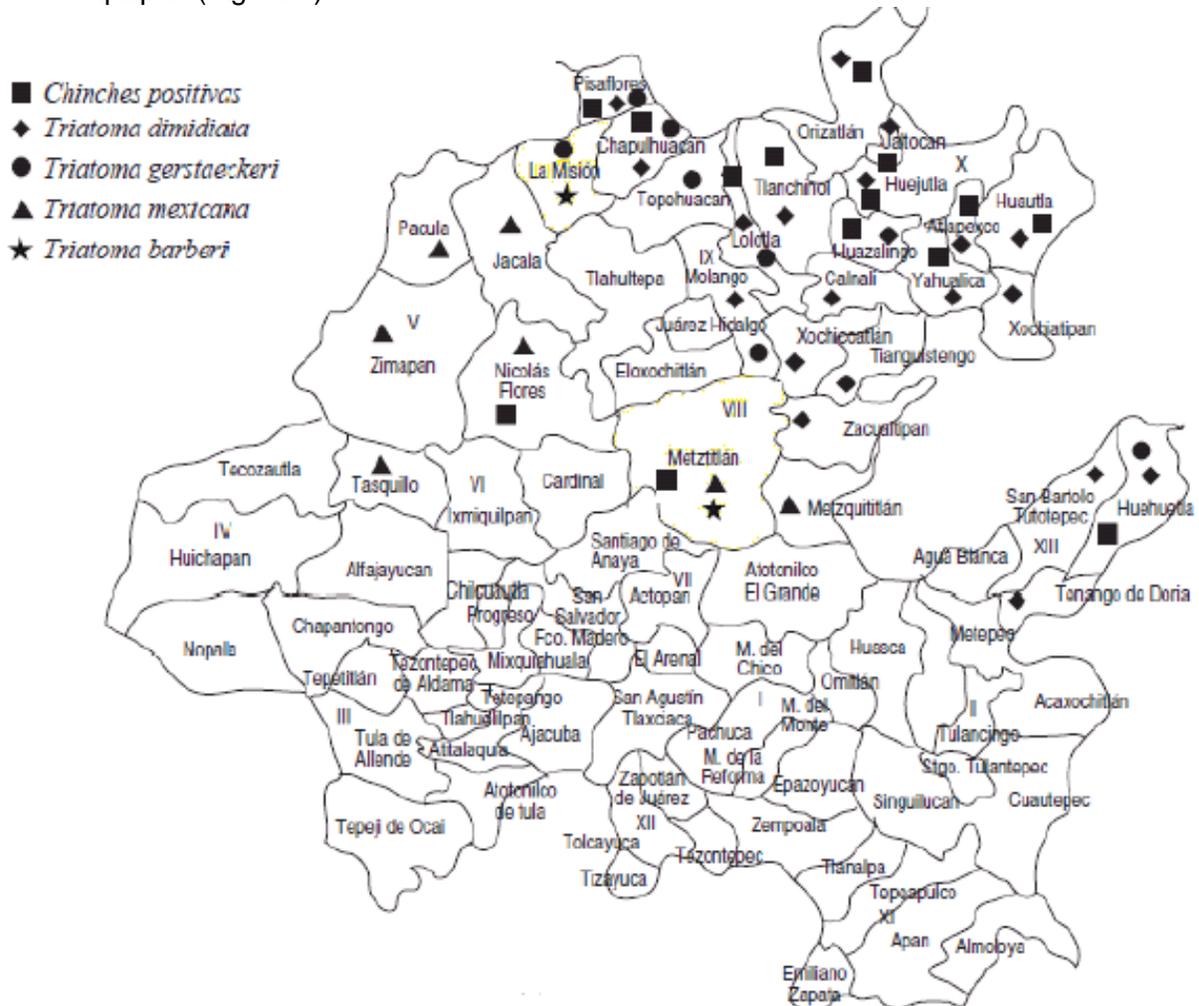
geográficos de su colecta. La positividad de infección con *T. cruzi* fue de 12.5% (Téllez-Rendón *et al.*, 2002).



5: Distribución geográfica de las especies de triatominos en México.

Figura 5. Distribución geográfica de las especies de triatominos con hábitos domiciliarios y peridomiciliarios en México. *Triatoma barberi* la especie de interés en este trabajo, se encuentra en los estados del centro de México como Jalisco, Michoacán, Guerrero, México, Oaxaca, Tlaxcala, Morelos, Distrito Federal e Hidalgo (Tomado de Martínez, 2003).

Los triatominos encontrados en el estado son: *T. diminiata*, *T. gerstaeckeri*, *T. mexicana* y *T. barberi*, distribuyéndose principalmente en las zonas de Huejutla, Molango e Ixmiquilpan (Figura 6).



6 Distribución geográfica de las especies de triatominos en Hidalgo.

Figura 6. Distribución geográfica de distintas especies de triatominos que se encuentran en el estado de Hidalgo. Se observa la distribución de *Triatoma barberi* la especie de interés, así como de las chinches positivas con *Trypanosoma cruzi* (Tomado de De la Cruz, 2013).

3.7. Simbiosis y simbioses

El término simbiosis fue usado por primera vez en 1879 por Antón de Bary, para referirse a dos o más especies que viven permanentemente en estrecha asociación, durante al menos una parte de su ciclo de vida, ya sea con la coexistencia de un individuo sobre el otro o uno dentro del otro (Gil *et al.*, 2004).

Los insectos representan un modelo especial, apto para el estudio de las relaciones simbióticas, debido a su gran diversidad que constituye la mayor parte de todos los invertebrados y a su gran tolerancia a organismos foráneos, que les permite coexistir con muchos microorganismos diferentes y en gran variedad. La mayor parte de los hexápodos están involucrados en algún tipo de simbiosis, especialmente con bacterias (Gil *et al.*, 2004). Los simbioses pueden pasar de una generación a otra mediante dos estrategias generales; la transmisión horizontal, que se da por un proceso infeccioso donde el simbiote se adquiere desde el ambiente externo y la transmisión vertical, mediada por la herencia, casi siempre vía materna, a través del citoplasma de los huevos (Grijalva y Giraldo, 2006).

Las especies de simbioses que se han identificado varían entre las distintas especies de triatomíneos (Dasch *et al.*, 1984; Eichler, 2002), el efecto o consecuencia de dicha relación entre *T. cruzi* y simbioses también es variable, algunas especies de endosimbioses se ha demostrado que favorecen el desarrollo de *T. cruzi* proporcionándole complementos para su dieta: por ejemplo vitamina B, como es el caso de *Rodococcus rhodnii* (Dasch *et al.*, 1984; Durvasula *et al.*, 1997; Goebel y Gross, 2001).

También existen simbioses en distintos insectos, como es en el caso de cucarachas y termitas, en el caso de las cucarachas los simbioses encontrados parecen

ser esenciales para su reproducción y en el caso de las termitas presentan un papel importante para la digestión de celulosa (Douglas, 1989).

El efecto que la simbiosis con bacterias puede ejercer sobre los insectos es variado e incluye principalmente alteraciones del desarrollo (Braendle *et al.*, 2003); mecanismos nutricionales suplementan una dieta pobre con algún componente o la digestión de recursos alimenticios como la celulosa (Bauman, 2005); alteraciones de la reproducción que pueden traducirse en eventos de especiación (Hurst y Werren, 2001; Stouthamer *et al.*, 1999); defensa contra el ataque de enemigos naturales (Scarborough *et al.*, 2005) y compensación por la pérdida del simbionte primario (Koga *et al.*, 2003).

3.8. Tratamiento y prevención contra la enfermedad de Chagas

Una de las prioridades principales del control de la enfermedad es evitar la transmisión dentro del hogar combatiendo el vector intradomiciliario con insecticidas compuestos de piretroides sintéticos como Permetrina, Deltametrina y Lambdacihalotrina, la llegada de éstos, significó un progreso importante para el control de la enfermedad de Chagas (Beaver *et al.*, 1986).

La prevención de la parasitosis no solo debe estar dirigida a interrumpir la transmisión vectorial, sino también la que se produce por transfusión sanguínea, trasplante de órganos, infección congénita o por accidentes de laboratorio (Beaver *et al.*, 1986).

Actualmente se cuenta con dos medicamentos para el tratamiento de esta parasitosis. Los medicamentos tripanocidas están indicados en la infección aguda del niño y del adulto, en la infección congénita y en la crónica reciente.

Los pacientes con enfermedad crónica avanzada no se benefician con el tratamiento. En las fases aguda y crónica reciente, se administra nifurtimox a dosis diarias

oral de 10 a 12 mg/kg de peso en pacientes de hasta 40 kg y de 7.5 mg/kg al día, los que excedan éste peso. Otro medicamento utilizado es benznidazol, el cual se administran 7.5 mg/kg en pacientes de hasta 40 kg de peso y 5 mg/kg al día para los que sobrepasen dicho peso. Los dos medicamentos se administran en dos o tres dosis diarias por 30 a 60 días. En la fase crónica se utiliza nifurtimox de 8 a 10 mg/kg al día durante 60 a 90 días cada ocho horas y benznidazol de 5 mg/kg al día por 60 días cada 8 o 12 horas. El tratamiento de la infección congénita se hace con nifurtimox de 10 a 15 mg/kg al día o benznidazol 10 mg/kg al día, comenzando con la mitad de la dosis en niños bajos de peso (Beaver *et al.*, 1986; Cúyas y Garcia, 1995; Kennet, 1982).

Hasta el momento no existe un fármaco del todo efectivo e inocuo para el paciente contra la enfermedad, dado que los medicamentos, no son por completo eficaces en todas las fases de la enfermedad o producen grandes efectos colaterales.

4. Antecedentes

Desde 1909, cuando Carlos Chagas anunció sus descubrimientos en Brasil, sobre evidencias clínicas del agente causal y los vectores de la enfermedad, se iniciaron las investigaciones en América Latina. En México en 1928, se reportó la presencia del primer triatomino *Triatoma dimidiata* (Hoffman, 1928), pero no fue hasta 1936 que se anunció el primer caso de una infección con *T. cruzi* diagnosticado en nuestro país (Mazzoti, 1936).

Después de 90 años del descubrimiento de la enfermedad de Chagas, se han propuesto 3 periodos de evolución sobre los casos clínicos y epidemiológicos de la enfermedad; a) Primeros estudios sobre la enfermedad de Chagas en Lassance (Municipio brasileño localizado en el norte del estado de Minas Gerais),

b) Periodo de incertidumbre y reportes de casos aislados, c) Periodo de consolidación de los conocimientos y de reconocimiento de la enfermedad de Chagas como una extensa entidad endémica rural (Prata, 1999).

Algunos países de Latinoamérica como Uruguay, Brasil y Chile, están avanzando en el control de la enfermedad de Chagas, mediante medidas nacionales que se enfocan en el control de los triatomíneos que existen en las poblaciones rurales, también en el tamizaje de la sangre de transfusión, así como en el apoyo terapéutico para los casos infectados de *T. cruzi*. Uruguay, Chile y la mayor parte del sur de Brasil, ya están certificados por la Organización Panamericana de la Salud (OPS), como libres de la transmisión de la enfermedad de Chagas. Por otro lado en los países de Perú, Ecuador y México, se encuentran en las fases iniciales de la planeación de las campañas de control de la enfermedad (Ramsey y Scholfield, 2003).

En México la enfermedad también es un caso de salud de gran importancia. En los últimos años, se han implementado programas que buscan la detección de la enfermedad por transfusión sanguínea, solo en algunos bancos de sangre. También, aunque existen programas de fumigación y uso de insecticidas en las zonas endémicas y zonas vulnerables para la sobrevivencia de triatomíneos transmisores, estas zonas no han disminuido (Guzmán-Bracho, 2001).

Una pregunta importante que preocupa actualmente es: ¿Cuáles son los factores que permiten el establecimiento de *T. cruzi* dentro del intestino del triatómino? Respondiendo a esta pregunta se pueden diseñar estrategias que rompan el ciclo de la infección.

Se ha demostrado que existen factores que influyen con el establecimiento de *T. cruzi* relacionados con los tejidos epiteliales del triatomino, 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, es decir microorganismos simbiotes del intestino de los triatominos (Dillon y Dillon, 2004; Azambuja *et al.*, 2005).

Es importante conocer si estos endosimbiontes influyen positiva o negativamente al triatomino y que puedan ser favorables para la infección con *T. cruzi*, como es en el caso de termitas y cucarachas que en su intestino contienen bacterias que ayudan con la digestión de su dieta (Dillon, 2004).

La eliminación de los simbiotes en los insectos, por medio de antibióticos, permite determinar y a veces cuantificar el aporte de los simbiotes a su hospedero. En la actualidad, los beneficios que recibe el hospedero de la relación simbiótica, son casi siempre definidos, pues la eliminación en condiciones de laboratorio de los microorganismos, así como su cultivo en medios artificiales, permite estudiar de forma detallada las consecuencias para el hospedero. No obstante, los beneficios para los microorganismos simbiotes no lo son tanto, razón por la cual, incluso, han llegado a considerarse como esclavos del hospederos en vez de mutualistas (Werren y O'Neill, 1997). En los insectos que presentan una dieta altamente especializada (como insectos hematófagos), pueden enfrentar la escasez de algún o algunos componentes esenciales para su desarrollo. La asociación con microorganismos simbiotes permite a estos insectos obtener los nutrientes faltantes en su dieta (Douglas, 1989).

Anteriormente se han realizado trabajos donde se eliminan simbioses en insectos, por medio de antibióticos, lisozimas y anticuerpos. Un ejemplo es el trabajo de Askoy (2003), donde eliminó los simbioses de la mosca tse-tsé (insecto hematófago estricto), vector del parásito *Trypanosoma brucei* que produce tripanosomiasis Africana, también conocida como enfermedad del sueño, la eliminación de su microbiota intestinal produjo retardo en el crecimiento del insecto y una disminución en la producción de huevos (Askoy, 2003).

Otro ejemplo de trabajos realizados anteriormente, es el de De la Cruz (2013) donde utilizó endosimbioses de triatomíneos para observar el efecto sobre *Triatoma barberi* y sobre la colonización de *T. cruzi*, encontrando que la presencia de simbioses en *Triatoma barberi* es indispensable para su desarrollo, ya que las chinches que manejó se mantuvieron estériles para evitar que formaran una microbiota intestinal y comprobar que este efecto provoca retraso en su desarrollo y una muerte prematura. En el caso de *T. cruzi* la presencia de endosimbioses de *Triatoma barberi* provocaron que la reproducción del parásito se viera afectada, probablemente por competencia de espacio o para evitar una sobrepoblación de *T. cruzi* (De la Cruz, 2013).

Previamente a este trabajo Espino de la Fuente (2013), registró la presencia de tres endosimbioses distintos de *Triatoma barberi*: *Staphylococcus warneri*, *Enterococcus faecalis* y *Brevundimonas bullata*, en donde evaluó la interacción *in vitro* con *T. cruzi*. En dicho trabajo demostró que el parásito en presencia de *S. warneri* muestra una disminución en el número de parásitos, lo mismo ocurre con la interacción del parásito con *E. faecalis*, contrariamente a estos resultados en presencia de *E. bullata* el parásito presentó una actividad indiferente, es decir su crecimiento no se vio afectado con éste último endosimbionte.

5. Planteamiento del problema

Se han probado diversos métodos de control de la transmisión de *Trypanosoma cruzi* al huésped vertebrado, principalmente a través del uso de insecticidas; sin embargo, ninguno ha sido totalmente eficaz, aunque se sabe que insectos contienen microbiota que les es útil para su desarrollo y que cuando es eliminada parcial o totalmente el artrópodo se ve afectado en su desarrollo; en el caso de triatomíneos como *Triatoma barberi* no se sabe qué tan importante es la microbiota, e igualmente si le es necesaria o indispensable para *T. cruzi*, por lo que se formuló la siguiente pregunta:

¿Cómo influye la presencia de endosimbiontes en el intestino de *Triatoma barberi* sobre su desarrollo y la colonización de *Trypanosoma cruzi*?

6. Hipótesis

Si la microbiota es indispensable para el desarrollo y sobrevivencia de *Triatoma barberi*, al eliminarla de su aparato digestivo provocará defectos en su desarrollo o hasta su muerte; por lo tanto, es posible que *T. cruzi* deje de colonizar al triatomíneo y como consecuencia no se transmita al huésped vertebrado.

7. Justificación

El principal mecanismo de transmisión de *T. cruzi*, es mediante las deyecciones de los triatomíneos infectados después de su alimentación, por lo tanto, la gente que habita en las zonas donde existen los triatomíneos se encuentran en alto riesgo. Las estrategias para erradicar la enfermedad, se basan en la eliminación del insecto mediante el uso de insecticidas, provocando intoxicaciones en la población, daños a la naturaleza y hasta aumentos en la resistencia de los triatomíneos sobre el insecticida, sin olvidar los gastos económicos que se generan con el uso de este método.

Si se conocieran los mecanismos que permiten el desarrollo y sobrevivencia de triatominos, así como la interacción de *T. cruzi* con éstos, se podrían utilizar herramientas que permitan disminuir la infección de los insectos con el parásito sin el uso de insecticidas y por lo tanto habrá más control de la transmisión de *T. cruzi* y como consecuencia habrá menos personas infectadas, que como se sabe presentan problemas cardíacos, que conducen al ausentismo en los lugares laborales o escuelas e incluso habrá menos inversión en la atención médica, compra de medicamentos y atención hospitalaria.

8. Objetivos

8.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de la presencia de endosimbiontes en *Triatoma barberi* sobre su desarrollo y sobre la colonización de *Trypanosoma cruzi* mediante el empleo de un antibiótico.

8.2 Objetivos particulares

Seleccionar el endosimbionte que evaluará el desarrollo de *T. cruzi* mediante el empleo de un antibiótico.

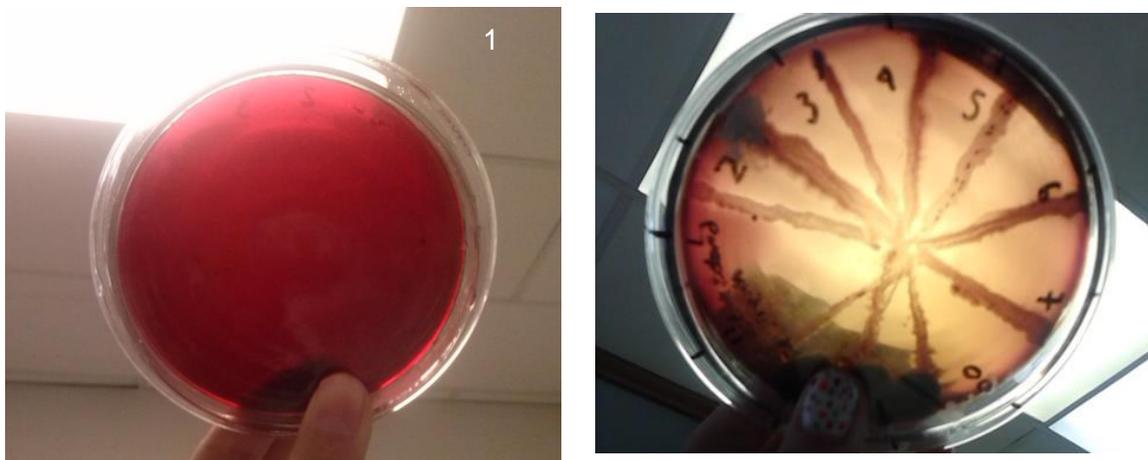
Determinar el efecto que causan los endosimbiontes sobre el desarrollo de triatóminos y su interacción con *T. cruzi*.

9. Material y métodos

9.1 Aislamiento y selección de endosimbiontes

Los endosimbiontes que se utilizaron en este trabajo, fueron aislados del intestino de *Triatoma barberi* por De la Cruz (2013) previo a este trabajo de investigación bajo el

criterio de que sea un endosimbionte hemolítico, pues para demostrar la hipótesis se debería cumplir con este requisito. Para ello se sembraron distintos cultivos axénicos de simbiontes de *Triatoma barberi* en medio agar sangre y se seleccionaron los endosimbiontes que tuvieran una actividad hemolítica sobre la sangre, ya que la hemólisis representa el uso de la sangre por bacterias, esto quiere decir que las bacterias estarían ayudando a los triatominos para la obtención de sus nutrientes (Figura 7).



7: Agara sangre hemolizado por bacterias.

Figura 7. Muestra de bacterias hemolíticas sembradas en agar sangre. 1) agar sangre, con su color característico rojo antes de la siembra de bacterias endosimbióticas. 2) agar sangre hemolizado, presenta un color amarillo debido al proceso de las bacterias endosimbióticas hemolíticas.

9.2 Selección de antibióticos

Se preparó el medio agar de "Mueller-Hinton" de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Este medio de cultivo es recomendado universalmente para la realización de la prueba de sensibilidad a los antimicrobianos. Se colocaron aproximadamente 25 mL, del

medio en cajas Petri (de plástico) de 90 mm de diámetro y se dejó solidificar por aproximadamente 15 min.

Con un asa se tomaron de 4 a 5 colonias previamente aisladas, se estrió sobre el medio en tres direcciones diferentes para obtener un inóculo uniforme y se efectuó el último barrido sobre el borde de la placa, posteriormente se colocó el antibiograma con 12 multidiscos combinados BIO-RAD para Gram positivo y Gram negativo. Los discos se tomaron con pinzas estériles y se colocaron en el medio después de la siembra, los discos se presionaron ligeramente para asegurar el contacto con la superficie del medio (Bernal y Guzmán, 1984).

Finalmente, se incubó a 28° C por 24 horas; pasado este tiempo se midieron los halos de inhibición obtenidos midiendo mediante una regla un fondo negro para una mejor observación. Se registraron dos características con respecto a la inhibición: Susceptible o Resistente. La susceptibilidad se considera si alrededor de la colonia se presenta un halo de al menos 5 mm de diámetro, la resistencia se considera si junto al papel filtro se presenta crecimiento del endosimbionte.

9.3 Selección de la concentración óptima del antibiótico

Para este punto, se realizó el método llamado Kirby-Bauer (Bernal y Guzmán, 1984), el cual consiste en impregnar papel filtro de algún antibiótico. Y se realizó de la siguiente manera.

A partir de cápsulas de 500 mg del antibiótico, se pesaron 15 mg en balanza analítica y se diluyeron con Dimetilsulfóxido (DMSO) en tubos Eppendorf, para obtener una solución inicial concentrada. Mediante esta solución se realizaron diluciones para obtener distintas concentraciones del antibiótico.

Se tomaron 10 μ L de la muestra inicial y se le agregaron 90 μ L de solución DMSO y así se obtuvo una concentración de 1500 μ g/mL, posteriormente de esta solución se tomaron 10 μ L + 90 μ L de DMSO para obtener una concentración de 150 μ g/mL, se siguió el mismo procedimiento hasta obtener concentraciones de 15 μ g/mL, 1.5 μ g/mL, 0.15 μ g/mL, 0.3 μ g/mL y 0,003 μ g/mL.

El papel filtro utilizado debía tener un diámetro de 0.5 mm, presentar un color blanco y estar estéril. Al cumplir con estas características, cada disco se impregnó con la concentración correspondiente.

Previamente los endosimbiontes hemolíticos seleccionados se sembraron en agar "Mueller-Hinton" en cajas Petri, mediante la técnica de siembra por estría masiva. Posteriormente con pinzas estériles se tomaron los discos ya impregnados del antibiótico y se colocaron en la placa Petri sobre el medio y se presionaron para asegurar que éste toque la superficie. Los discos debían tener una separación no menor a 25 mm, para evitar la superposición de los halos de inhibición.

Finalmente las, cajas Petri se incubaron a 28° C por 24 horas y se observaron los halos de inhibición que presentaba cada concentración y se eligió la que presentara una inhibición óptima en cada uno de los endosimbiontes hemolíticos utilizados.

9.4 Cultivo de endosimbionte seleccionado

Se seleccionó solo un endosimbionte para la prueba de la viabilidad de *T. cruzi*, para observar la interacción con dichos parásitos. Con un asa se tomaron de 4 a 5 colonias, se inocularon en 5 mL de medio de cultivo LIT (Liver Infusion Tryptose) y se incubó a 28° C por 24 horas, hasta observar turbidez, posteriormente la turbidez se ajustó

a 0.01 nm mediante un espectrofotómetro “Jenway” 6405, a una longitud de onda de 620 nm, para una similitud en la concentración de endosimbiontes y de parásitos de *T. cruzi*.

9.5 Cultivo de *Trypanosoma cruzi*

Los parásitos que se utilizaron en los experimentos fueron obtenidos a partir de cultivos que se encuentran en el laboratorio de Histología en el Instituto de Ciencias de la Salud, los cuales fueron previamente aislados de ratones CD-1 por punción cardiaca. Para el mantenimiento de los parásitos, se realizaron resiembras a un nuevo medio de cultivo LIT cada 4 semanas.

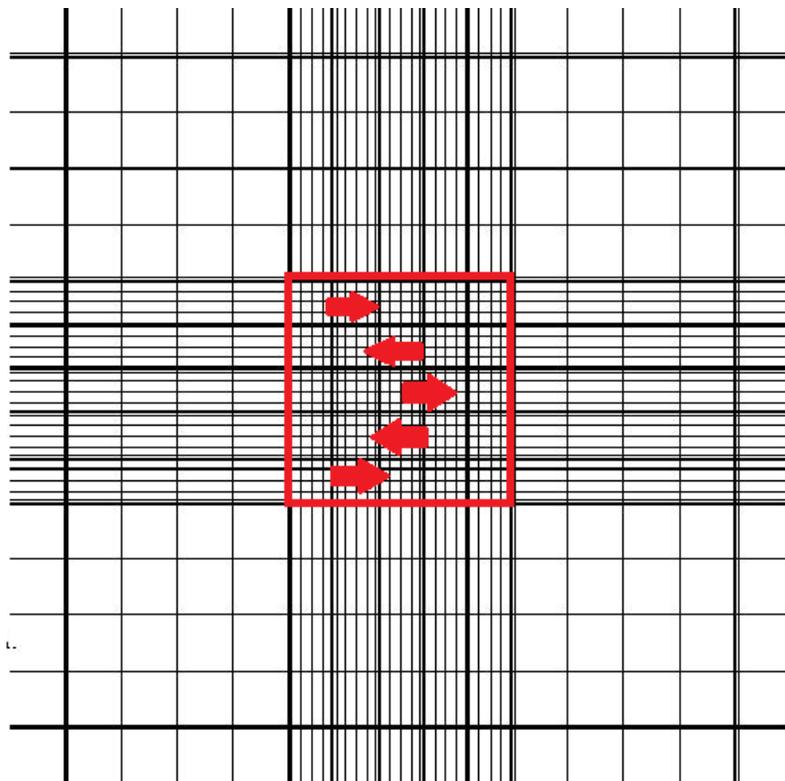
En un tubo estéril con medio LIT se inocularon parásitos y se incubaron a 28° C por 5 días para obtener una vasta cantidad de ellos y se realizaron conteos en cámara de Neubauer para obtener una cifra de 3×10^5 parásitos/mL ya que esta dosis de inóculo es la mínima que permite observar el crecimiento de *T. cruzi* mediante el método de conteo que se escogió dadas su sensibilidad.

9.6 Determinación de la viabilidad de *Trypanosoma cruzi* en un medio *in vitro*

Se realizaron cultivos de *Trypanosoma cruzi* en 4 tubos de ensaye de 13x100, adicionando 3 mL de medio LIT; tubos de ensaye: 1) 3×10^5 parásitos/mL, 2) 3×10^5 parásitos/mL+100µL de endosimbionte hemolítico, 3) 3×10^5 parásitos/mL+100µL de antibiótico seleccionado (150µ/mL)+DMSO y 4) 3×10^5 parásitos/mL+100µL de DMSO. En las pruebas de viabilidad de *T. cruzi*, se utilizó el diluyente DMSO, para observar si éste causa un efecto en el crecimiento de parásitos, así se evita confundir el efecto del antibiótico con el efecto de este diluyente.

Los cultivos se incubaron a 28° C durante 3 días, posteriormente se realizaron conteos de parásitos en cámara de Neubauer cada 48 horas durante 15 días para realizar

curvas de crecimiento e interpretación de resultados. El método de conteo en cámara de Neubauer se muestra en la figura 8.



8: Método y zona de conteo en cámara de Neubauer

Figura 8. Se inicia de izquierda a derecha, pasando por todos los recuadros, en forma de zig-zag.

9.7 Determinación de la viabilidad de *Trypanosoma cruzi* en un medio *in vitro* sobre sangre hemolizada

Para comprobar si los parásitos necesitan de endosimbiontes que hemolizan la sangre, se realizó una prueba donde se utilizó sangre hemolizada por dichas bacterias, para determinar la viabilidad de *T. cruzi*.

Se preparó medio LIT incompleto, es decir no se agregó suero fetal bovino y hemina. En 3 tubos estériles de 13x100 se inocularon 3 mL del medio y se adicionó con

500 µL de sangre, se agregaron 500 µL de bacterias hemolíticas, utilizando el mismo endosimbionte que se utilizó en el ensayo anterior.

Posteriormente los 3 tubos se incubaron a 28° C. Después de 48 horas el primer tubo se filtró con membrana de 0.32 µm, para eliminar las bacterias y residuos de las mismas utilizando solamente la sangre hemolizada, finalmente el tubo se refrigeró. El método se repitió transcurridas 96 horas y 168 horas respectivamente para los tubos sobrantes.

Finalmente como controles se prepararon 2 tubos más, uno con 3 mL de LIT incompleto y otro con 3 mL de LIT completo, posteriormente a cada tubo se les inocularon 30 µL de *T. cruzi* y 50 µL de estreptomycinina con la finalidad de evitar crecimiento bacteriano. Se incubaron a 28° C, durante 18 días y se realizaron conteos de parásitos después de 72 horas de incubación y se continuaron cada 72 horas. Finalmente se graficaron las curvas de crecimiento obtenidas por los conteos.

9.8 Desarrollo de triatominos libres de endosimbiontes

Con el fin de conocer si los endosimbiontes afectan el desarrollo de triatominos, se eligieron al azar 23 huevos viables de *Triatoma barberi*, los cuales se desinfectaron con etanol al 70% en gabinete de bioseguridad para evitar contaminación externa.

Posteriormente se colocaron en celdas pequeñas previamente desinfectadas y se cubrieron con una malla fina para facilitar la alimentación de las ninfas, así como evitar posible contaminación ambiental (Figura 9). Se incubaron a 28°C con una humedad de 60-70%, una vez eclosionados, de manera estéril se alimentaron en superficie de voluntario previamente desinfectado con etanol al 70%, para determinar el desarrollo de las ninfas.



9: Celdas de esterilidad para el mantenimiento de los huevos de *Triatoma barberi*.

Figura 9. Se les colocó una malla para evitar el mayor contacto posible con el aire y también para facilitar su alimentación, pero al mismo tiempo manteniendo sus condiciones de esterilidad.

10. Resultados

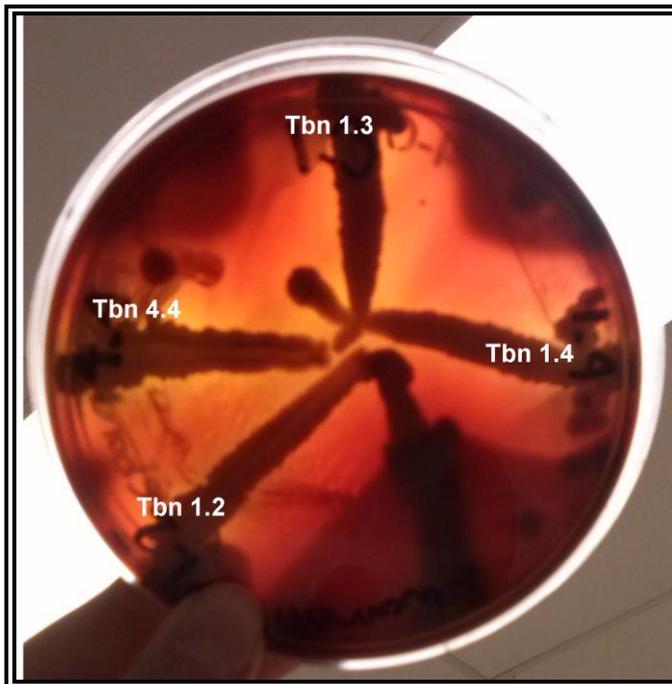
10.1 Aislamiento y selección de endosimbiontes

Cuando se seleccionó el endosimbionte se partió de cuatro posibles cepas que cumplían con el requisito de ser hemolíticas: Tbn 1.2, Tbn 1.3, Tbn 1.4 y Tbn 4.4. Sin embargo era suficiente trabajar con una cepa para demostrar la interacción con el triatomino y *T. cruzi*, para ello se utilizó como criterio seleccionar aquella que fuera eliminada fácilmente con un antibiótico, pues se necesitaría eliminarla del tracto intestinal del triatomino para que éste no tuviera endosimbiontes y se observara el efecto sobre su desarrollo y el de *T. cruzi*, también otra característica importante es que este endosimbionte presentara un alto nivel de hemólisis. Primeramente las cuatro cepas de endosimbiontes que se emplearon en esta investigación se sembraron en agar sangre, con la finalidad de observar su producción de hemolisina. Las cepas seleccionadas presentaron distintas características morfológicas y microscópicas (Cuadro 1).

Cuadro 1. Características morfológicas y microscópicas de las cepas seleccionadas. Gran parte de las cepas seleccionadas presentaron un Gram positivo y una morfología blanca entera y convexa.

Endosimbionte (<i>Triatoma barberi</i> No.)	Descripción morfológica (Color, borde y elevación)	Descripción microscópica (Tinción de Gram)
Tbn 1.2	Blanco, Entero y Convexa	Bacilos curvos G+
Tbn 1.3	Blanco, Entero y Convexa	Bacilos curvos G+
Tbn 1.4	Blanco, Entero y Convexa	Bacilos curvos G+
Tbn 4.4	Blanco, Entero y Convexa	Bacilos cortos G-

Finalmente, se seleccionó el endosimbionte Tbn 1.3 para la realización de las pruebas *in vitro* ya que fue la cepa que presentó mayor halo de hemólisis y mayor halo de inhibición con el antibiótico (Figura 10).



10: Hemólisis β de los cuatro endosimbiontes seleccionados **Tbn 1.2, Tbn 1.3, Tbn 1.4 y Tbn 4.4.

Figura 10. Se observa el color amarillento que se produce cuando las bacterias hemolizan la sangre (**Tbn= *Triatoma barberi* No.)

10.2 Selección de antibiótico

Se realizaron antibiogramas a los endosimbiontes hemolíticos, con la finalidad de obtener un antibiótico óptimo, realizando siembras en agar “Mueller-Hinton” (ver método 9.2). Se obtuvieron distintos halos de inhibición en cada endosimbionte y con antibióticos diferentes (Figura 11).

A continuación se presentan los resultados, después de la aplicación de antibiograma a los endosimbiontes seleccionados, en donde se observan qué antibióticos fueron utilizados, así como la lectura de los halos de inhibición que cada antibiótico producía sobre los endosimbiontes (Cuadro 2).

También se elaboró un orden de susceptibilidad tomando en cuenta cuantos endosimbiontes eran inhibidos por el antibiótico, para determinar que antibiótico era el más eficaz en cada endosimbionte (Cuadro 3).



11: Antibiogramas realizados a endosimbiontes hemolíticos.

Figura 11. El punto rojo indica el antibiótico que presentó inhibición en todos los endosimbiontes probados. Se observa la diversidad de antibióticos así como su efecto en cada endosimbionte.

Cuadro 2. Medición de halos de inhibición para endosimbiontes. En la presente tabla se muestran 12 antibióticos utilizados. Se resaltan los antibióticos que presentaron un halo de inhibición mayor a 5 mm en todos los endosimbiontes. Dónde: R= Resistencia, S=Susceptibilidad al antibiótico y *S= mayor de 5 mm de susceptibilidad.

Endosimbiontes	Tbn 1.2	Tbn 1.3	Tbn1.4	Tbn 4.4
Antibiótico				
Amikacina AK	R	* S	* S	R
Ampicilina AM	R	3mm S	7mm S	4mm S
Cefalotina CF	10mm R	8mm S	* S	R
Ceftriaxona CRO	R	6mm S	* S	R
Cloranfenicol CL	R	7mm S	* S	R
Dicloxacilina DC	R	R	* S	R
Enoxacina ENX	7mm	5mm S	* S	7mm S
Eritromicina E	11mm	10mm S	10mm S	10mm S
Gentamicina GE	R	* S	* S	R
Netilmicina NET	R	10mm S	* S	R
Penicilina PE	R	2mm S	* S	R
Trimetroprim- SulfametoxazoLSXT	R	R	9mm S	R

Cuadro 3. Orden de susceptibilidad para 4 endosimbiontes. Dependiendo del número de endosimbiontes que presentaron susceptibilidad al antibiótico fue la importancia del mismo.

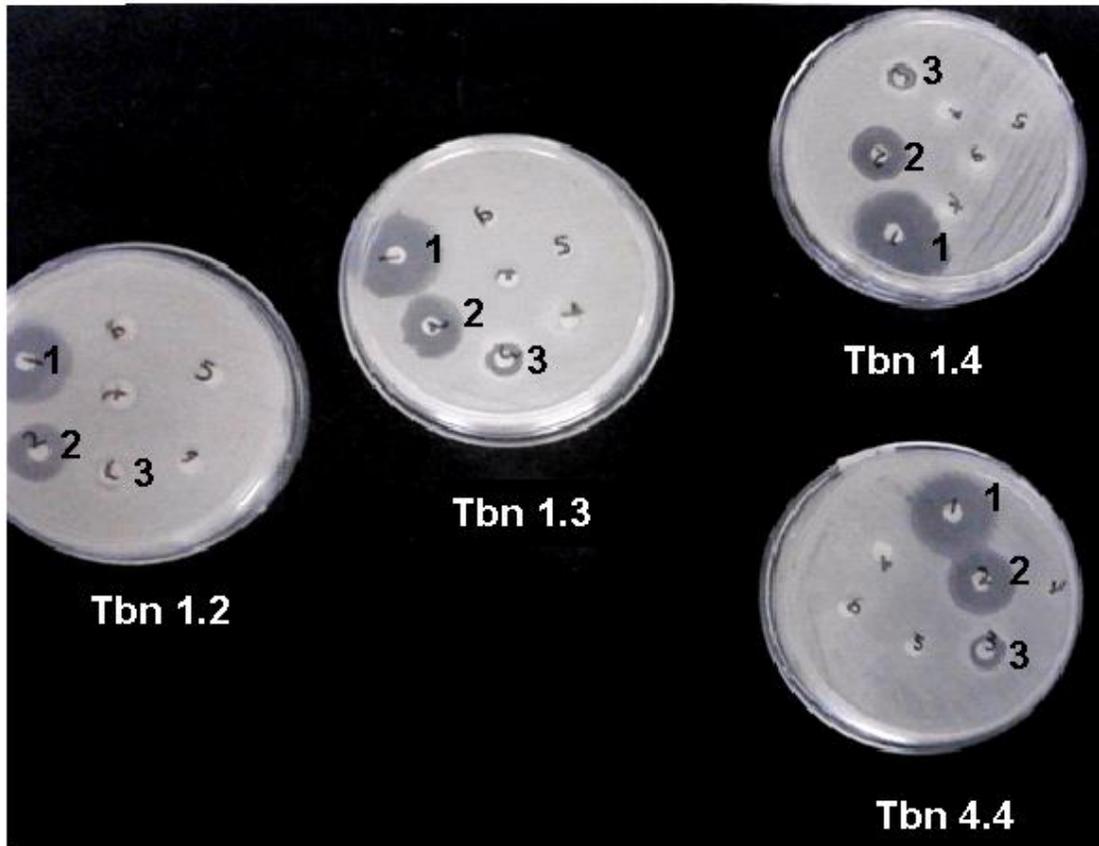
Antibiótico	E	ENX	CF	AM	AK	GE	NET	CL	CRO	PE	DC	SXT
No. de endosimbiontes susceptibles.	4	4	3	3	2	2	2	2	2	2	1	1

E= Eritromicina, ENX= Enoxacina, CF= Cefalotina, AM= Ampicilina, AK= Amikacina, GE= Gentamicina, NET= Netilmicina, CL= Cloranfenicol, CRO= Ceftriaxina, PE= Penicilina, DC= Dicloxacilina, SXT= Trimetoprim-Sulfametoxazol.

El objetivo de esta prueba, fue la búsqueda de un antibiótico susceptible con los 4 endosimbiontes. En este caso se obtuvieron dos antibióticos que los inhibían. Finalmente se eligió eritromicina como el mejor antibiótico, ya que produce una susceptibilidad de más de 10 mm en cada endosimbionte.

10.3 Concentración óptima del antibiótico

Después de las 24 h de incubación de la prueba de Kirby-Bauer, en la cual se impregnó papel filtro con distintas concentraciones de eritromicina: 1500µg/mL, 150 µg/mL, 15 µg/mL, 1.5 µg/mL, 0.15 µg/mL, 0.3 µg/mL hasta 0.03 µg/mL, con el objetivo de elegir una concentración óptima, se leyeron los halos de inhibición, que cada concentración presentó sobre los endosimbiontes hemolíticos (Figura 12).



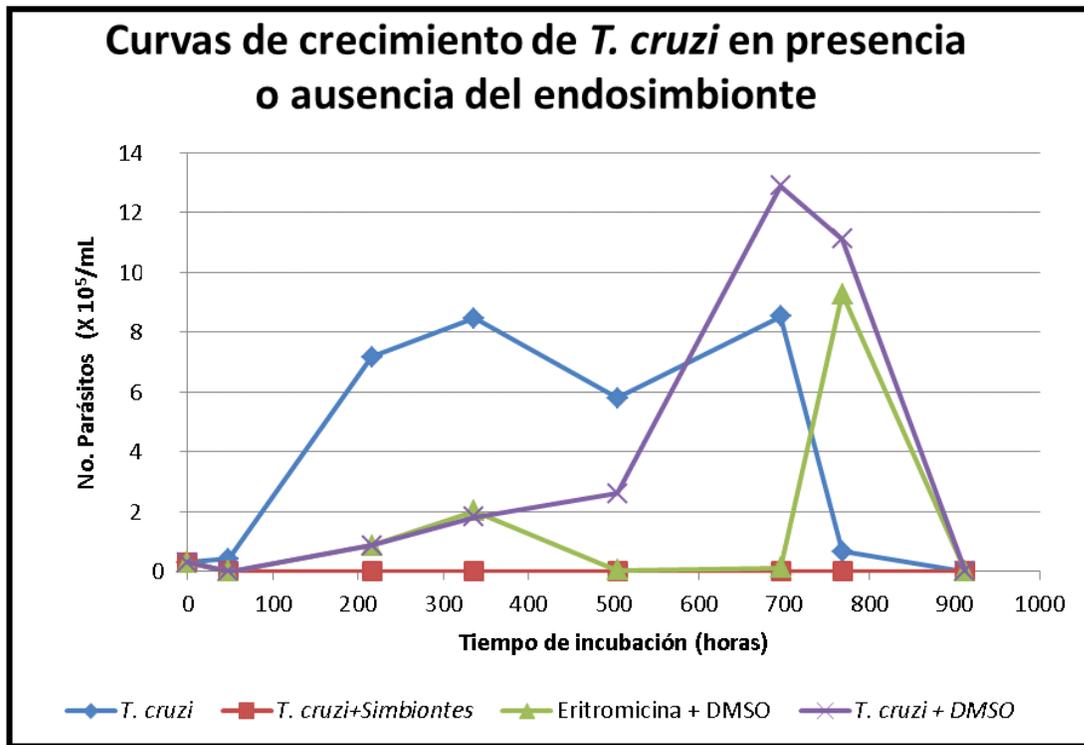
12: Halos de inhibición de eritromicina sobre endosimbiontes .

Figura 12. 1) 1500µg/mL, 2) 150 µg/mL y 3) 15 µg/mL. Cada endosimbionte obtuvo susceptibilidad en las dos primeras concentraciones, también se observa susceptibilidad en la concentración de 15 µg/mL, pero menor a 5 mm por lo que se considera como resistencia a esta concentración.

Finalmente se eligió la concentración de 150 µg/mL, ya que presentó un halo de más de 5 mm, por el contrario se rechazó la concentración de 1500 µg/mL, debido a que es una concentración muy alta y así se evitó que la inhibición de los endosimbiontes fuera más por intoxicación de eritromicina que por inhibición de ésta.

10.4 Determinación de la viabilidad de *Trypanosoma cruzi* en un medio *in vitro*

A partir de los cultivos *in vitro* realizados (ver método 9.6), con la finalidad de observar la interacción que *T. cruzi* presenta con los endosimbiontes, se realizaron curvas de crecimiento (Figura 13), donde se muestra la curva normal de crecimiento de *T. cruzi* (azul) sin adición de antibiótico ni endosimbiontes, para la segunda curva (rojo), se aprecia que en presencia del endosimbionte Tbn 1.3, *T. cruzi* no se reproduce, esto se puede interpretar como una competencia de espacio y nutrientes entre el parásito y las bacterias, posteriormente en la curva de crecimiento con antibiótico y DMSO (verde), se observa un rango donde *T. cruzi* no se reproduce, aunque éste se recupera en un intervalo de 200 h pero sin lograr una colonización alta dentro del medio, esto demuestra que el antibiótico podría afectar no solo a los endosimbiontes sino también al desarrollo de los parásitos, finalmente la curva en presencia de DMSO (morado) demuestra que DMSO también podría afectar el desarrollo del parásito, pero se observa que éste se recupera después de algunas horas. Como se puede observar en la figura 13, todas las curvas terminan en cero aproximadamente después de 900 horas, equivalentes a 37 días debido al término de nutrientes del medio LIT ocasionando la muerte tanto de parásitos como de bacterias.



13: Curvas de crecimiento de *Trypanosoma cruzi* en presencia y ausencia del endosimbionte Tbn 1.3.

Figura 13. Cada línea representa el crecimiento de *T. cruzi* y su efecto que provoca la presencia de simbioses, DMSO y eritromicina.

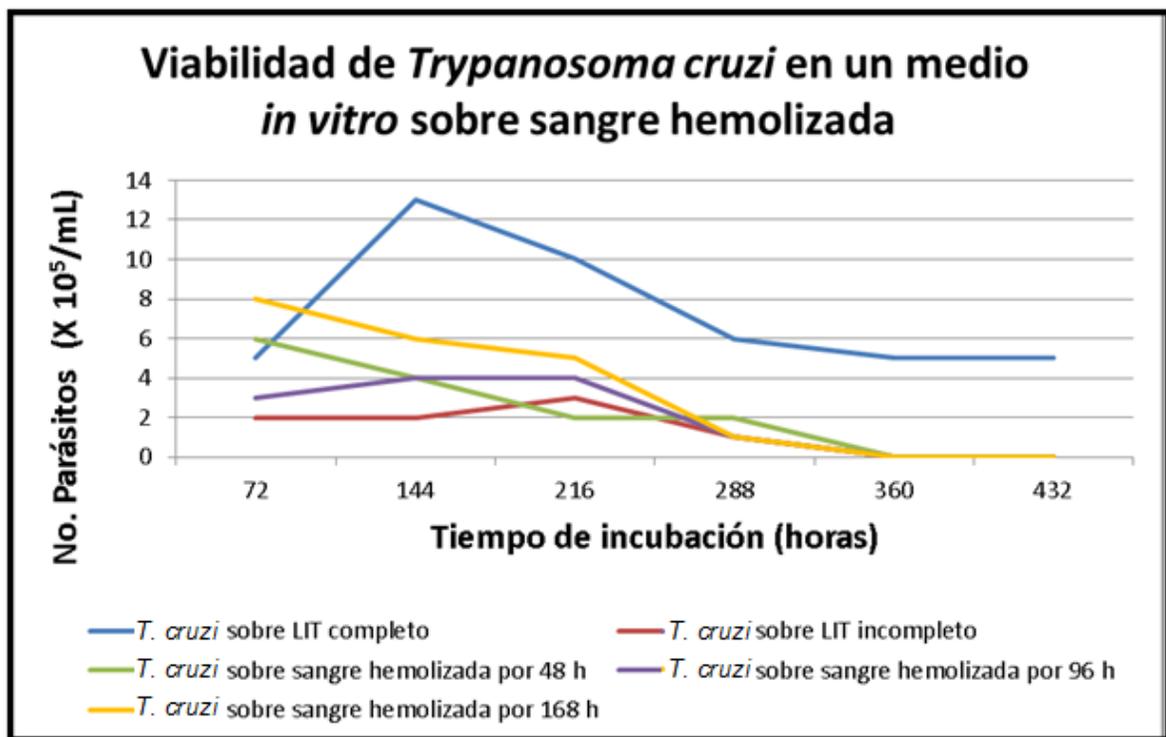
10.5 Viabilidad de *Trypanosoma cruzi* en un medio *in vitro* sobre sangre hemolizada

Se realizó una inoculación de 30 µL de parásitos en medios de distintas características (ver método 9.7), para observar si *T. cruzi* necesita de endosimbiontes que metabolizan la sangre.

Después de los conteos correspondientes, se observó la curva normal de crecimiento (Figura 14) de *T. cruzi* representado por una línea azul, en la cual se apreció el rango más alto del crecimiento del parásito a partir de las 144 horas después de la incubación, a partir de las 288 horas se observó una disminución en la reproducción de *T. cruzi*, pero se

volvió a estabilizar después de las 360 horas, transcurridas las 432 h aún se encontraron parásitos vivos, es por eso que en la tabla se observa como la curva de crecimiento de la línea azul no termina en ceros como en las demás curvas.

En las curvas restantes se observó que *T. cruzi* no necesita sangre hemolizada para su reproducción, ni de la presencia de endosimbiontes ya que como se observa en el ensayo anterior éstos alteran el desarrollo del parásito. Se observó, cómo el número de parásitos disminuye después de la incubación y cómo después de 216 h dejaron de reproducirse, se sugiere que las bacterias hemolíticas producen alguna exotoxina que evita la colonización de *T. cruzi*, o simplemente los endosimbiontes terminaron con los nutrientes de la sangre que el parásito necesita.



14: Curva de crecimiento de *Trypanosoma cruzi* sobre un medio con sangre hemolizada.

Figura 14. La línea azul, muestra la curva de crecimiento de *T. cruzi* en medio LIT completo y sin adición de sangre presentando una curva de crecimiento estable por 432 h.

10.6 Desarrollo de triatominos libres de endosimbiontes

Después de la selección y desinfección de huevos de *Triatoma barberi*, se incubaron a 28° C y con una humedad de 60-70% (Figura 15), se realizó un seguimiento del desarrollo de las ninfas. Se obtuvieron 25 huevos estériles, de los cuales 48% eclosionó, que corresponde a 12 ninfas. Se mantuvieron de forma estéril y se alimentaron 3 veces por semana durante 20 min en superficie del brazo de un voluntario previamente desinfectado con etanol al 70%. Todo esto con la finalidad de observar cuál es el tiempo que sobreviven los triatominos de forma estéril y sin contacto con su misma especie, para comprobar si es necesaria una microbiota intestinal para su desarrollo y que sucedería si no cuentan con ésta.

Se observó que las ninfas estériles comen tres veces menos, ésto a diferencia de las ninfas que se encuentran en laboratorio haciéndose evidente mediante comparación con el tamaño y la coloración que presentaban, éstas mudaron aproximadamente a los 30 días después de su eclosión, posteriormente no se observó ningún cambio en su tamaño. Presentaron dificultad para alimentarse, y finalmente a partir del día 35 en su 2º estadio comienzan a morir. Como conclusión se determina que las ninfas necesitan de un ambiente más abierto para su desarrollo, también requieren de contacto con su misma especie y un ambiente no desinfectado para su sobrevivencia. Una hipótesis es que la causa de la muerte, fue por la falta de endosimbiontes y por ende la dificultad que presentaron para alimentarse y para defecar.



15: Ninfas de *Triatoma barberi* en celdas estériles.

Figura 15. Mantenimiento de ninfas en un medio estéril a 28° C con una humedad del 66%. Las ninfas de *Triatoma barberi* se encontraban separadas, no existió contacto con otras chinches durante su incubación.

11. Discusión

En este trabajo se investigó si *Triatoma barberi*, una de las principales especies transmisoras de *T. cruzi* en México, necesita la presencia de una microbiota para su desarrollo y si estas bacterias son capaces de convivir con *T. cruzi* permitiendo su desarrollo. Se observó que *T. cruzi* se ve afectado por la presencia de endosimbiontes, una de las hipótesis sugeridas, fue por la invasión de espacio debido a que las bacterias se reproducen en menor tiempo que los parásitos. Esto mismo se reporta en el trabajo de De la Cruz (2013), donde realizó cultivos *in vitro* de *T. cruzi* y endosimbiontes, en el cual observó una disminución en el crecimiento del parásito aunque de una forma no tan significativa, algo similar ocurre en el trabajo de Espino de la Fuente (2013), quien observó que *T. cruzi* disminuye su crecimiento de manera progresiva en presencia de bacterias simbióticas como *Staphylococcus warnei* y *Enterococcus faecalis*.

Se piensa que los endosimbiontes juegan un papel importante, donde su presencia evita la sobrepoblación de parásitos actuando como protectores de los insectos contra enfermedades, como es en el caso del género *Anopheles*, insecto vector del parásito *Plasmodium* causante de la malaria, en el cual se realizaron experimentos donde se alimentaron los mosquitos con el antibiótico gentamicina, se observó que por causa del antibiótico los mosquitos eran más vulnerables a la infección con *Plasmodium* (Beier *et al.*, 1994), esto quiere decir que es importante la presencia de una microbiota no solo para el desarrollo de los insectos, sino que también son utilizados como estrategias para erradicar algunas enfermedades parasitarias. Además las bacterias endosimbióticas presentes en el intestino de insectos vectores facilitan la digestión y la defensa de la superficie intestinal frente a patógenos oportunistas, como lo son parásitos y otros microorganismos (Dillon y Dillon, 2004).

A diferencia del trabajo realizado por De la Cruz (2013), se efectuaron pruebas de viabilidad de *T. cruzi* en presencia de un antibiótico; cabe mencionar que no existen investigaciones que relacionen el crecimiento de *T. cruzi* en presencia de antibióticos. En estas pruebas, se observó que el antibiótico ejerce un efecto sobre el desarrollo del parásito, aunque aproximadamente 200 h después de su aplicación *T. cruzi* eleva su crecimiento, esto podría indicar que la vida media del antibiótico dentro del medio de cultivo se agotó, aunque la vida media de este antibiótico es de pocas horas, la eritromicina se vuelve más activa en pH moderadamente alcalino (Álvarez y García, 2002), cabe mencionar que el pH del medio LIT donde se inocularon los parásitos y los endosimbiontes es de 7.5, esto quiere decir que el antibiótico pudo haber alargado su promedio de vida.

Para asegurarse de que los resultados obtenidos sobre *T. cruzi* son por el antibiótico, se realizó una prueba de viabilidad de *T. cruzi* en presencia de Dimetilsulfóxido (DMSO), un diluyente orgánico utilizado para disolver la eritromicina, los resultados mostraron una disminución en el crecimiento del parásito en las primeras 500 h, posteriormente el parásito se recuperó. Sabemos que el ciclo de vida del parásito es muy complejo pasando por una serie de estadios llamados: amastigotes, epimastigotes y tripomastigotes.

En los cultivos de *T. cruzi* con DMSO, se observó un cambio radical en la morfología del parásito, pasando de ser una forma alargada (epimastigote y tripomastigote) hasta convertirse en una forma redonda (amastigote). Brener y Chian (1965) encuentran que las formas gruesas y delgadas de *T. cruzi in vitro* presentaban diferente comportamiento morfológico; cultivos con predominancia de formas gruesas regularmente cambian a amastigotes, los cuales se dividen y originan grandes colonias de

parásitos redondos y los cultivos con parásitos de forma delgada cambian a epimastigotes y las formas redondas son escasas. Esto quiere decir que en cultivos *in vitro* se observan cambios morfológicos de *T. cruzi*. Uno de los parámetros de conteo de parásitos en todas las pruebas, fue el conteo únicamente de las formas alargadas del parásito, ya que no todos los cultivos presentaron formas redondas de *T. cruzi*, así los conteos fueron equitativos. En presencia de DMSO, los parásitos redondos predominaban en las primeras 500 h, transcurrido este lapso de tiempo, los parásitos redondos evolucionaron a su forma alargada, es por eso que en la gráfica (Figura 13, línea verde), se observa un aumento del número de parásitos después de 500 h. Esto también ocurre en el cultivo de parásitos con eritromicina y DMSO. Lopez y De Jesus (1999) mencionan que, según la procedencia de la cepa de parásitos después de 7 a 15 días, al igual que en estos resultados, los parásitos aumentan de tamaño y comienzan a dividirse formando colonias y agrupaciones, esto ocurre en cultivos *in vitro*.

La prueba de viabilidad de *T. cruzi* en un medio *in vitro* sobre sangre hemolizada, se realizó con el objetivo de observar si los endosimbiontes ayudan al parásito a metabolizar la sangre y que éste la aproveche para su desarrollo, los resultados arrojaron que Tbn 1.3 no es indispensable para la alimentación de *T. cruzi* ya que como se muestran en los resultados, el parásito muere después de 216 h, en contraste con el control en el cual el número de parásitos vivos continua aún después de 432 h.

Las características principales de Tbn 1.3 son la alta producción de hemolisis beta y la presencia de una morfología en forma de bacilos Gram positivo en su estructura. En el trabajo de De la Cruz (2013), se realizan pruebas bioquímicas a todos los endosimbiontes aislados del intestino de *Triatoma barberi* para dar a conocer el tipo de especies que se encuentran dentro del insecto, según sus resultados Tbn 1.3

corresponde a la especie *Staphylococcus auricularis*. Gómez (2006) describe esta especie como una bacteria que produce un gran número de toxinas que destruyen la membrana de células eucariotas, entre esas toxinas se encuentran: hemolisinas, leucotoxinas, leucocidinas y exotoxinas como SE A-G, TSST-1 y ET, mismas que pudieron haber provocado la muerte de *T. cruzi* impidiendo su desarrollo sobre sangre hemolizada por Tbn 1.3.

Es importante estudiar la relación que tienen estos endosimbiontes con el triatomino para saber si causan algún efecto positivo o negativo sobre éste y si son necesarios para su desarrollo y nutrición, también es importante entender, cómo es que se adquiere la microbiota intestinal en insectos. Uno de los trabajos donde se explica esto, es el de Durvasula *et al.*, (1997), donde explican que *Rhodnius prolixus* un triatomino vector de *T. cruzi*, adquiere endosimbiontes mediante coprofagia, observando que después de la eclosión y hasta la fase adulta presentan una microbiota dentro de su intestino, también la adquisición de estas bacterias por el insecto podría estar relacionada con el momento en el que éstos se alimentan sobre la piel humana o de otros mamíferos, como es en el caso de la alimentación sobre ratones CD-1, técnica empleada en el laboratorio.

Uno de los experimentos realizados en este trabajo fue la mantención de triatominos de forma estéril, desde la desinfección de huevos de *Triatoma barberi*, hasta mantenerlos de forma aislada durante todo su ciclo, se observó que después de eclosionar, los triatominos no tuvieron un desarrollo normal llegando solamente a 2º estadio, aproximadamente después de 30 días de su eclosión, a diferencia de triatominos no estériles, las chinches estériles presentaron un tamaño menor, una coloración tenue y sin cambios después del 2º estadio hasta su muerte. Estos resultados se corroboran con

el trabajo de Huerta-Nuñez (2006), quien sugiere que los endosimbiontes juegan un papel importante en el desarrollo del triatomino y que los triatominos libres de endosimbiontes no logran llevar a cabo su desarrollo normal.

Se ha demostrado que los endosimbiontes juegan un papel importante en el desarrollo del hospedero y también en la adición de aminoácidos esenciales, como es en el caso de los áfidos que son insectos homópteros, también denominados pulgones, los cuales presentan un endosimbionte primario llamado *Buchnera aphidicola*, que genera efectos positivos en la reproducción de su hospedero (Douglas, 2003; Gil *et al.*, 2004).

Comprender la interacción entre endosimbiontes y *T. cruzi* en el interior de triatominos y demostrar si los simbiosis repercuten en el desarrollo del parásito, permitirá diseñar estrategias de control de la transmisión sin necesidad de emplear insecticidas o medicamentos que a largo plazo son perjudiciales para la salud, todo esto con la posibilidad de transferir simbiosis que afectan el desarrollo de *T. cruzi* a triatominos y hacer que éstos infecten a diversas poblaciones y así evitar la transmisión de *T. cruzi* en mamíferos.

12. Conclusiones

1. En presencia de endosimbiontes, *Trypanosoma cruzi* disminuye su desarrollo probablemente por la competencia de espacio y alimento.
2. El endosimbionte Tbn 1.3 es una bacteria que aunque presenta una alta producción de hemólisis, no le es indispensable a *T. cruzi* para su alimentación.
3. *Triatoma barberi* presenta en su intestino distintos endosimbiontes que son indispensables para su desarrollo y sin esta microbiota el triatomino se ve afectado en su crecimiento impidiendo terminar su ciclo de vida, viviendo solamente dos estadios.

Literatura citada

Abalos, J.W. 1981. La vinchuca transmisora de la enfermedad de Chagas". Ministerios de Bienestar Social de la Nación. Secretaría de Estado de Salud Pública. Servicio Nacional de Chagas.

Álvarez, M. y García, D.P. 2002. Eritromicina, descubrimiento, características y aplicaciones. *Farmacología*. 21(2):78:82.

Andrade, A.L. y Martelli, C.M. 1994. An Epidemiological Approach to Study Congenital Chagas Disease. Método Epidemiológico na Investigaçãõ de Infecçãõ Cong ê nita pelo *Trypanosoma cruzi*. *Cadernos de Saude Pública*. 10(2):6.

Anselme, A. y Moleiro, F. 1974. Pathogenic mechanisms in Chagas cardiomyopathy. En: A Ciba Foundation Symposium 20 (new series). Tripanosomiasis and Leishmaniasis with special reference to Chagas disease. Amsterdam: Elsevier. 125-136.

Asin, S.N. y Giojalas, L.C. 1995. Type of rectal contents and infectivity of domiciliary populations of triatoma infectans (Hemiptera: Reduviidae) in Argentina. *Journal Medic Entomology*. 399-401.

Askoy, S. 2003. Symbiosis in tsetse. *Insect Symbiosis*. CRC Press, Boca Ratón. 53-65.

Atias, A. y Neghme, A. 1991. *Parasitología Clínica*. 3ra edición. Editorial Mediterráneo. Chile.

Azambuja, P., García, E.S. y Ratcliffe, N.A. 2005. Gut a microbiota and parasite transmission by insect vectors. *Trends of Parasitology*. 21:568-572.

Bauman, P. 2005. Biology of bacteriocyte-associated endosymbionts of planta sap-sucking insects. *Annual Review of Microbiology*. 59:155-189.

Beaver, P.C., Jung, R.C. y Cupp, E.W. 1986. *Parasitología Clínica*, 2ª Ed. Barcelona. Editores Salvat. 65-112.

Becerril-Flores, M.A. y Romero-Cabello R. 2004. *Parasitología Médica de las moléculas a la enfermedad*. México, D.F. Editorial McGraw-Hill Interamericana. 73-83.

Beier, M.S., Pumpini, C.B., Beier, J.C. y Davis, J.R. 1994. Effects of para-aminobenzoic acid, insulin, and gentamycin on *Plasmodium falciparum* development in anopheline mosquitoes (Diptera: Culcidae). *Journal Medical of Entomology*. 31:561-565.

Benenson, A.S. 1992. El control de enfermedades transmisibles en el hombre. Informe oficial de la Asociación Estadounidense de Salud Pública. 15:538-542.

Benenson, A.S. 1997. Manual para el control de las enfermedades transmisibles. 16ª ed. Washington DC:OPS. 465-468.

Bernal, M. y Guzmán, M. 1984. El antibiograma de discos. Normalización de la técnica de Kirby-Bauer. *Biomédica*. 4:112-121.

Blanco, S., Spillmann, C., Canale, D., Ripoll, C., Audisio, M. y Martini, F. 2006. Programa Nacional de Chagas Argentinas. *Revista Ministerio de Salud de Nación Argentina*. 1:5-65.

Borror, D.J. 1979. *An introduction to the study of insects*. Holt RaW. Ed. New York.

Botero, D. y Restrepo, M. 2003. *Parasitosis Humanas*. 4ta Edición. Editorial CIB. Colombia.

Braendle, C., Miura, T., Bickel, R., Shingleton, A.W., Kambhampati, S. y Stern, D.L. 2003. Developmental origin and evolution of bacteriocytes in the aphid-*Buchnera* Symbiosis. PLoS Biology. Public Library of Science Biology. 1:70-76.

Brener, Z. y Chiari, E. 1963. Obsevações sobre a fase crónica de doença de Chagas experimental no camundongo. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo. Sao Paulo. 5:128-132.

Carcavallo, R.U. y Martinez, A. 1972. Life cycles of some species of *Triatoma* (Hemiptera, Reduviidae). Can. Ent. 104:699-704.

Castillo, D. 2000. Aspectos del comportamineto de los Triatominos (Hemiptera: Reduviidae), vectores de la Enfermedad de Chagas. Biomédica. 20:1-5.

Cécere, M.C., Canale, D.M. y Gürtler, R.E. 2003. Effects of refuge availability on the population dynimics of *Triatoma infestans* in central Argentina. Journal of Applied Ecology. 40:742-756.

Cruz-Reyes, A. y Pickering-López, J.M. 2006. Chagas disease in Mexico: an analysis of geographical distribution during the past 76 years- A review. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 101:345-54.

Cúyas, M.C. y García, J. 1995. Tripanosomiasis americana. Enfermedad de Chagas, *En:* Farrera, P. Rozman, C. Medicina Interna.13ª Ed. España. Editorial Mosby/Doyma. 2448-2451.

Dasch, G.A., Weiss, E. y Chang, K. 1984. Endosymbionts of insects. Bergey's Manual of systematic Bacteriology. Vol. 1. 811-833.

De la Cruz, M.M. 2013. Influencia de endosimbiontes sobre el desarrollo de *Triatoma barberi* y la colonización de *Trypanosoma cruzi*. Tesis de Maestría en Ciencias biomédicas y de la salud. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Pachuca, Hgo. 75p

Dillon, R.J. y Dillon, V.M. 2004. The gut bacteria of insects: nonpathogenic interactions. *Annual Review of Entomology*. 49:71:92.

Douglas, A.E. 1989. Mycetocyte symbiosis in insects. *Biology Reviews*. 64:409-434.

Douglas, A.E. 2003. Buchnera bacteria and other symbionts of aphids. *Insect symbiosis*. 23-38.

Durvasula, R.V., Gumbs, A., Panackal, A., Kruglov, O., Askoy, S., Merrifield, R.B., Richards, F.F. y Beard, C.B. 1997. Prevention of insect-borne disease: an approach using transgenic symbiotic bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 94:3274-3278.

Eichler, S. 2002. Interaktionen von Triatominen mit ihren Symbionten und Trypanosomatiden. PhD dissertation. Faculty. Biology. Ruhr-University Bochum, Germany.

Espino De la Fuente, M. C. 2013. Interacción de bacterias intestinales aisladas de *Triatoma barberi* con *Trypanosoma cruzi*. Tesis de Licenciatura en Biología. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Mineral de la Reforma, Hgo. 64p.

Galvão, C., Carcavallo, R.U., Rocha, D.S y Jurberg, J. 2003. A checklist of the current valid species of subfamily Triatominae Jeannel, 1919 (Hemiptera, Reduviidae) and their geographical distribution, with nomenclatural and taxonomic notes. *Zootaxa*. 202:1-36.

García, N.M. 1995. Desarrollo de un método inmunoenzimático para la detección de anticuerpos contra ADN de doble cadena. Tesis de Licenciatura en Especialista de Inmunología. ISCM. La Habana.

Garrido, F. C.J., Rivas, L. y Montiel, L. 2007. Guía para el diagnóstico, manejo y tratamiento de enfermedad de Chagas en fase aguda a nivel de los establecimientos de Salud. Venezuela: Dirección General de Epidemiología. 32p.

Gil, R., Latorre, A. y Moya, A. 2004. Bacterial endosymbionts of insects: insights from comparative genomics. *Environmental Microbiology*. 6:1109-1122.

Goebel, W. y Gross, R. 2001. Intracellular survival strategies of mutualistic and parasitic prokaryotes. *Trends of Microbiology*. 9:267-273.

Gómez, G.A. 2006. *Staphylococcus*: the ramification of a cluster. *Infectio*. 10(3): 157-159.

Grijalva, O. y Giraldo, G.I. 2006. Simbiosis bacteriana en insectos. *Boletín Del Museo de Entomología De la Universidad Del Valle*. 7:24-40.

Guzmán-Bracho, C. 2001. Epidemiology of Chagas disease in Mexico: an update. *Trends in Parasitology*. 17:372-376

Hernández, M.C., Fernández, A.M., Alcina, A. y Fresno, M. 1991. Caracterización de a Glycolyl-Phosphatidylinositol anchored membrane protein from *Trypanosoma cruzi*. *Infection and Immunity*. 59:1409-1416.

Hernández-Becerril, N., Mejía, A.M., Ballinas-Verdugo, M.A., Garza-Murillo, V., Manilla-Toguero, E., López, R., Trevethan, S., Cardenas, M., Reyes, P.A., Hirayama, K., y Monteón, V.M. 2005. Blood transfusión and iatrogenic risks in Mexico city. *Anti-*

Trypanosoma cruzi seroprevalence in 43,048 blood donors, evaluation of parasitemia, and electrocardiogram findings in seropositive. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz. 100:111-116.

Heyneman, D. y McKerrow, H.J. 1991. Parasitic Diseases. En: Stites P.D., Terr I.A; eds. Basic and Clinical Immunology. 7 Ed. California: Appleton and Lange. 672-681.

Hoffman, C. 1928. Revista Mexicana de Biología. En: Salazar-Schettino, Haro Arteaga y T. Uribarren Berrueta. (1988). Chagas Disease in Mexico. Parasitology Today. 4:348-35.

Huerta-Nuñez, L., Martínez, J., Alcocer, R.L. Ramsey, J.M. y Martínez.Romero, E. 2006. Diversidad de bacterias endosimbiontes de insectos de la subfamilia triatominae. Revista Latinoamericana de Microbiología. 48:2-14.

Hurst, G.G.D. y Werren, J.H. 2001. The role of selfish genetic elements in eukaryotic evolution. Nature Reviews Genetics. 2:597-606.

Kennet, E.M. 1982. Tripanosomiasis Americana. En: Hoeprich, P.D. Tratado de Enfermedades Infecciosas. 2ª ed. Ciudad de la Habana. Editorial Científico-Técnico, 1027-1034

Koga, R., Tsuchida, T. y Fukatsu, T. 2003. Changing patterns in an obligate symbiosis: a facultative endosymbiont can compensate for loss of essential endosymbiont *Buchnera* in an aphid. Proceedings of Royal Society of London Series B. 270:2543-2550.

Krogstad, D.J. 1994. Protozoarios de la sangre y los tejidos. *En*: Schaechter, M., Eisenstein, B., y Guerra, H. Microbiología. Mecanismos de la enfermedades infecciosas. 2ª Ed Buenos Aires. Editorial Médica Panamericana. 630-649.

Leiby, D.A., Lenes, B.A., Tribbals, M.A. y Tames-Olmedo, M.T. 1999. Prospective evaluation of a patient with *Trypanosoma cruzi* infection transmitted by transfusion. *New England Journal of Medicine*. 341:1237-1239.

López, E. y De Jesus, R. 1999. Infectividad en ratón de las formas de *Trypanosoma cruzi* diferenciadas por primocultivo en medio LIT. *Med-ULA*. 5:44-47.

Lucero, R.H., Brusés. B.L. Merino, D.E. Balbachán, S.E, Fernandez, G.J. y Crenna, E.C. 2006. Enfermedad de Chagas congénito en Hospitales de la ciudad de Corrientes, Argentina. *Boletín Del Instituto de Medicina Regional*. 9:121-124.

Luquetti, A.O. 1994. Practical aspect of Chagas Disease. *Parasitology Today*. 287-288.

Martinez, C.C. 2003. Conocimiento actual sobre el la distribución de los triatominos en México. *En*: Pública INdS, editor. Iniciativa para la Vigilancia y el Control de la Enfermedad de en la República Mexicana. México. 105-124.

Mazzotti, L. 1936. Investigación sobre la existencia de la enfermedad de Chagas en el país: Demostración de los tripanosomas en los reduvídeos transmisores. *Medicina Revista Mexicana*. 16: 584-595.

Moncayo, A. 1999. Enfermedad de Chagas en el Cono Sur: progreso en la interrupción de la transmisión de la enfermedad de Chagas en los países del Cono Sur. *Medicina (Buenos Aires)*. 59:120-124.

Peterson, A. T., Sanchez-Cordero, V., Beard, C.B. y Ramsey, J.M. 2002. Ecologic niche modeling and potential reservoirs for Chagas Disease, México. *Emerging Infectious Disease journal*. 8:662-667.

Petry, K. y Eisen, H. 1989. Chagas disease: A model for the study of autoimmune diseases. *Parasitology Today*. 5:111-116

Prata, A. 1999. Evolution of the Clinical and Epidemiological Knowledge about Chagas Disease 90 Years After its Discovery. *Memoerias do Instituto Oswaldo Cruz*. 94:81-88

Ramsey, J.M. y Schofield, C.I. 2003. Control of Chagas disease vectors. *Salud Pública de México*. 45(2):123-128.

Salazar-Schettino, P.M, de Haro-Arteaga, I. y Uribarren, T. 1988. Chagas Disease in Mexico. *Parasitology Today*. 4:348-35.

Salazar-Schettino, P.M., de Haro-Arteaga, I. y Cabrera-Bravo, M. 2005. Tres especies de triatominos y su importancia como vectores de *Trypanosoma cruzi* en México. *Medicina (Buenos Aires)* 65:63-69. *En: Evangelista-Martínez, Z., Imbert-Palafox, J.L., Becerril-Flores, M.A. y Gómez-Gómez, J.V. 2010. Análisis Morfológico de Huevos de *Triatoma barberi* Usinger (Hemiptera: Reduviidae). *Neotropical Entomology*. 39:207-213.*

Scarborough, C.L., Ferrari, J. y Godfray, H.V. 2005. Aphid protected from pathogen by endosymbiont. *Science*. 310:1781.

Schmunis, G.A. 1991. *Trypanosoma cruzi*, the etiologic agent of Chagas disease: status in the blood supply in endemic and no endemic countries. *Transfusion*. 31:547-57.

Schofield, C. J. y Dias, J.C.P. 1999. The Southern Cone Initiative against Chagas Disease. *Advances in Parasitology*. 42:1-27.

Stouthamer, R., Beeuwer, J. A.J. y Hurst, G.D.D. 1999. *Wolbachia pipientis*: microbial manipulator of arthropod reproduction. *Annual Review of Microbiology*. 53:71-102.

Tomlinson, S., Vandekerckhove, F., Frevert, U. y Nussenzweig, V. 1995. The induction of *Trypanosoma cruzi* tripomastigote to amastigote transformation by low pH. *Parasitology*. 110: 547-554.

Usinger, R.L. 1944. The Triatominae of North and Central América and the Wear Indies and their Public Health Significance. U.S. Public Health Bulletin. 288:1-181.

Velasco, O., Valdespino, J.L., Gutiérrez, A., del Rio, A., Ibañez, S. y Magos, C. 1994. Enfermedades Tropicales en México. Diagnóstico, tratamiento y distribución geográfica. México: Instituto Nacional De Diagnóstico y Referencia Epidemiológica de la Secretaria de Salud. 279-291.

Vélez, H. 1992. Fundamentos de Medicina. Enfermedades Infecciosas. Editorial CIB. Medellín, Colombia. 207-213.

Wendel S. 1998. Transfusion transmitted Chagas disease. *Current Opinion in Hematology*. 5:406-411.

Werner, A. 1972. Transmisión congénita de protozoos parásitos. *Boletín de la oficina sanitaria panamericana*. 72:517-546.

Werner, A., Jercic, M.I., Heitmann, G., Jofré, L., Muñoz, C.P., Noemí, I., San Martín, A.M., Sapunar, J., Torres, M. y Zalantay, A. 2008. Enfermedad de Chagas en donantes de banco de sangre. *Revista Chilena de Infectología*. 25:285-288.

Werren, J.H. y O'Neill. 1997. The evolution of heritable symbionts. En: *Influential passengers: Inherited microorganisms and arthropod reproduction*. Oxford University Press, Oxford. 1-14.

Wilson, M.E. 1991. *A world guide to infections: Diseases, Distribution, Diagnosis*. New York: Oxford University Press Inc. 675-676.

Zárate, L.G. 1983. The biology and behavior of *Triatoma barberi* (Hemiptera-Reduviidae) in México. Completion of the cycle, adult longevity, and egg production under optimal feeding conditions. *En: Evangelista-Martínez, Z., Imbert-Palafox, J.L., Becerril-Flores, M.A. y Gómez-Gómez, J.V. 2010. Análisis Morfológico de Huevos de Triatoma barberi* Usinger (Hemiptera: Reduviidae). *Neotropical Entomology*. 39:207-213.

Zavala-Castro, J.E. 2011. Enfermedad de Chagas y otras tripanosomiasis. *En: Becerril Flores, M.A. (Ed.) Parasitología Médica*. México: McGraw Hill. 329p.