



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO
INSTITUTO DE CIENCIAS DE LA SALUD
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS Y DE LA SALUD

INFLUENCIA DE ENDOSIMBIONTES SOBRE EL DESARROLLO DE
TRIATOMA BARBERI* Y LA COLONIZACIÓN DE *TRYPANOSOMA
***CRUZI*.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS Y
DE LA SALUD

PRESENTA:

MICHAEL MELVYN DE LA CRUZ PANTOJA

BAJO LA DIRECCIÓN DE

DR. MARCO ANTONIO BECERRIL FLORES

San Agustín Tlaxiaca, Hgo.

Mayo 2013



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS DE LA SALUD

MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS Y DE LA SALUD

Of. No MCBS/2013/14

Asunto: Autorización de impresión de tesis

Lic. Michael Melvyn De la Cruz Pantoja

Candidato a Maestro en Ciencias Biomédicas y de la Salud

Por este conducto le comunico el jurado que le fue asignado a su Tesis titulada "Influencia de endosimbiontes sobre el desarrollo de *Triatoma barberi* y la colonización de *Trypanosoma cruzi*", con el cual obtendrá el **Grado de Maestro en Ciencias Biomédicas y de la Salud**; después de revisar la tesis mencionada y haber realizado las correcciones acordadas, han decidido autorizar la impresión de la misma.

A continuación se anotan las firmas de conformidad de los integrantes del jurado:

PRESIDENTE DR. MARCO ANTONIO BECERRIL FLORES

PRIMER VOCAL MTRA. GERORGINA ALMAGUER VARGAS

SECRETARIO MTRO. JOSÉ RAMÓN MONTEJANO RODRÍGUEZ

SUPLENTE DR. ANDRÉS SALAS CASAS

SUPLENTE DRA. ARELI CRUZ CASTAÑEDA

Sin otro asunto en particular, reitero a usted la seguridad de mi atenta consideración.



Atentamente

"AMOR, ORDEN Y PROGRESO"

San Agustín Tlaxiaca Hgo. a 28 de enero de 2013

M.C. ESP. JOSÉ MARÍA BUSTO VILLARREAL
DIRECTOR

M.C. ESP. MARICELA GUEVARA CABRERA
COORDINADORA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO ICSA

DR. JUAN ELIEZER ZAMARRIPA CALDERÓN
COORDINADOR DEL PROGRAMA



AGRADECIMIENTOS

“La inteligencia consiste no sólo en el conocimiento,
sino también en la destreza de aplicar los
conocimientos en la práctica.” Aristóteles.

A Dios por permitirme realizar un objetivo más.

A mis padres

**Por ser el pilar fundamental en todo
lo que soy, en toda mi educación,
tanto académica como de la vida, por
su incondicional apoyo que se ha mantenido
a través del tiempo, todo este trabajo ha
sido posible gracias a ustedes los AMO.**

A mis hermanas

**Ale y Vero, por estar conmigo
y apoyarme incondicionalmente
siempre, las quiero mucho.**

Faty

**Definitivamente eres ese angelito
que vino a iluminar y cambiar mi vida.**

TE AMO mucho preciosa.

Sel

**Porque en cada uno de los momentos,
siempre has estado ahí apoyándome
e impulsándome a seguir adelante,
preocupándote por todo, y cumpliendo
siempre esas palabras de en la buenas y no
tan buenas, definitivamente quien mejor
que tu para conocer y recorrer esta
travesía llamada Maestría. Te Amo.**

A todos y cada uno de los revisores

De este trabajo, Dr. M. Becerril, Mtro. R. Montejano,

Mtra. G. Almaguer, Dr. A. Salas y Dra. A. Cruz.

**Y finalmente pero no por eso menos importantes a los compañeros del lab que
hicieron cada momento especial y motivador para estar en esa área de trabajo: Cesar,
Frederik, Gless, Denisse, Eri y Paty.**

I. INTRODUCCIÓN	1
II ANTECEDENTES	3
2.1 Generalidades	3
2.2 Epidemiología	6
2.3 Vías de transmisión de <i>Trypanosoma cruzi</i>	7
2.3.1 Transmisión vectorial	7
2.3.2 Transmisión por transfusión sanguínea	7
2.3.3 Transmisión transplacentaria	8
2.3.4 Transmisión accidental	9
2.4 Marco Teórico	9
2.4.1 <i>Trypanosoma cruzi</i>	9
2.4.1.1 Morfología de <i>Trypanosoma cruzi</i>	11
2.4.2 Ciclo biológico del parásito	13
2.4.3 Enfermedad de Chagas	15
2.4.4 Triatomíneos	17
2.4.4.1 Características de los Triatomíneos	18
2.4.5 <i>Triatoma barberi</i>	22
2.4.6 Simbiosis y simbioses	25
III. JUSTIFICACIÓN	27
IV. HIPÓTESIS	29
V. OBJETIVOS	29
5.1 Objetivo General	29
5.2 Objetivos Específicos	29
VI. MATERIAL Y MÉTODOS	30

6.1 Aislamiento de endosimbiontes a partir de las fases ninfales y adultos de <i>T. barberi</i> .	30
6.2 Identificación de los endosimbiontes.	32
6.3 Desarrollo de <i>T. cruzi</i> en medio de cultivo LIT.	33
6.4 Obtención de triatominos libres de endosimbiontes.	34
6.5 Interacción de <i>T. cruzi</i> -endosimbionte <i>in vivo</i> .	35
6.6 Interacción de <i>T. cruzi</i> -endosimbionte <i>in vitro</i> .	37
VII. RESULTADOS	38
7.1 Aislamiento de los endosimbiontes a partir de las fases ninfas y adultos de <i>Triatoma barberi</i>	38
7.2 Identificación de los endosimbiontes.	39
7.3 Características microscópicas y prueba de hemólisis.	41
7.4 Identificación mediante pruebas bioquímicas.	44
7.5 Obtención de triatominos libres de endosimbiontes.	46
7.5.1 Tiempo de desarrollo de <i>Triatoma barberi</i> .	46
7.6 Interacción de <i>Trypanosoma cruzi</i> - endosimbionte <i>in vivo</i> .	48
7.7 Interacción <i>Trypanosoma cruzi</i> - endosimbionte <i>in vitro</i> .	50
VIII. DISCUSIÓN	52
IX. CONCLUSIONES	556
Consideraciones éticas.	56
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Revisión de la filogenia de organismos eucariontes.	10
Figura 2. Fases morfológicas de <i>T. cruzi</i> e identificación de los organelos que los componen.	11

Figura 3. Dibujos de las formas de desarrollo de <i>T. cruzi</i> encontrados en el intestino delgado y el recto.....	12
Figura 4. Ciclo de vida de <i>T. cruzi</i>	14
Figura 5. Vista dorsal de un triatomo.....	19
Figura 6. Estructura cefálica de los triatomos.....	19
Figura 7. Vista dorsal general de un triatomo.....	20
Figura 8. Estadios morfológicos por los que pasa un triatomo	21
Figura 9. Distribución geográfica de las especies de triatomos reportadas en México.	22
Figura 10. Principales especies de triatomos domiciliarias y peridomiciliarias distribuidas en México.	23
Figura 11. Distribución geográfica de <i>T. barberi</i> en el estado de Hidalgo.....	24
Figura 12. Esquema de transmisión de simbiontes entre poblaciones de triatomos.....	26
Figura 13. Mantenimiento de la colonia de <i>T. barberi</i>	30
Figura 14. Aislamiento de endosimbiontes de <i>T. barberi</i>	31
Figura 15 Metodología seguida para la obtención de simbiontes del intestino de triatomos.....	32
Figura 16. Cepa de parásitos mantenida en medio LIT.....	33
Figura 17. A) Obtención de triatomos estériles.....	35
Figura 18. Obtención de triatomos con <i>T. cruzi</i>	36
Figura 19. Prueba de hemólisis.....	43

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Número de aislados de endosimbiontes de cada una de las fases ninfales.	38
Tabla 2. Descripción morfológica de los endosimbiontes aislados a partir del intestino de <i>T. barberi</i>	39
Tabla 3. Características microscópicas y prueba de hemólisis.	41
Tabla 4. Identificación por medio de pruebas bioquímicas de los endosimbiontes aislados.	44
Tabla 5. Tiempo de desarrollo de cada fase de triatomíneos con y sin endosimbiontes.	46
Tabla 6. Porcentaje de desarrollo de triatomíneos estériles y no estériles.	47
Tabla 7. Volumen promedio de sangre y No. de parásitos ingeridos por triatomíneos estériles y no estériles.	48
Tabla 8. Infección de triatomíneos con <i>T. cruzi</i> en presencia (NE) o ausencia (E) de endosimbiontes.	499
Tabla 9. Cinética de cuantificación de Tripanosomas en presencia o ausencia de cada endosimbionte aislados	50

ABREVIATURAS

Est: Estadio.

mL: Mililitros.

LIT: Liver Infusion Tryptose.

A. N: Agar Nutritivo.

μL: Microlitros.

N: Norte.

S: Sur.

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

WHO: World Health Organization.

Mm: Milímetro.

μm: Micrómetro.

NE: No estériles.

E: Estériles.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

SNC: Sistema Nervio Central.

RESUMEN

Una de las estrategias del control de la enfermedad de Chagas, está relacionada con la interacción parásito-vector. Dado que los triatomíneos son vectores transmisores del parásito *T. cruzi*, y en su intestino existen bacterias endosimbiontes, se planteó la siguiente hipótesis: La colonización de *T. cruzi* y el desarrollo de los triatomíneos son afectados por la presencia de endosimbiontes en el intestino de *T. barberi*. Para comprobar esta hipótesis se aislaron 17 endosimbiontes del intestino de *T. barberi* que incluyeron las cinco fases ninfales y el estado adulto de un total de 36 ejemplares.

A los endosimbiontes aislados se les realizaron pruebas bioquímicas para su identificación, así como pruebas de hemólisis con la finalidad de saber si algunos de los endosimbiontes eran positivos o negativos a dicha prueba, TbN 5.2 y TbH04 resultaron ser hemolíticos. Otro de los ensayos realizados en este trabajo, consistió en obtener triatomíneos libres de endosimbiontes, para lo cual, se eligieron huevos de *T. barberi*, que fueron sometidos a condiciones totales de esterilidad para evitar que al eclosionar adquirieran por coprofagia los endosimbiontes, los resultados obtenidos, mostraron que los endosimbiontes del intestino de los triatomíneos al no estar dentro de la microbiota no favorecen el desarrollo del triatómino.

Finalmente los ensayos *in vivo*, muestran que los triatomíneos estériles ingieren un volumen de sangre menor al de las no estériles, esto también tiene repercusión en el número de parásitos ingeridos siendo menor en las estériles que en las no estériles. Los ensayos *in vitro* demostraron que el endosimbionte no es indispensable para el desarrollo de *T. cruzi* pero sí lo es para el triatómino.

ABSTRACT

A control strategy of Chagas disease is associated with the interaction parasite-vector. Because the triatomines are transmitter vectors of the *T.cruzi* parasite and in the intestine are endosymbionts bacterium, the next hypothesis was proposed: *T.cruzi* colonization and the triatomines development are affected by the presence of endosymbionts in *T. Barberi* intestine. To analyze this hypothesis. 17 endosymbionts were isolated from *T. Barberi* intestine that included 5 nymph phases and 36 specimens in adult stage. Biochemical test as well hemolysis assays were performed to isolates endosymbionts for identification and the purpose to know if some endosymbionts were positive or negative in this test, TbN 5.2 and TbH04 results haemolytics. Another assay performed in this study was obtain endosymbionts of sylvatic triatomines, for which were selected *T.barberi* eggs, that were submitted to total sterile conditions to avoid when it hatch the endosymbionts acquisition by coprophagia. Results obtained showed that when endosymbionts of the triatomines intestine weren't out of the micro biota doesn't benefit the development of triatomines. Finally in the *in vivo* tests, shows that sterile triatomines ingests a lower volume of blood unlike no sterile, also it have repercussion in the number of ingests parasites, being lower in sterile than no sterile. The assay *in vitro* demonstrated the endosymbionts are not indispensable for the development of *T. Cruzi* but are necessary for the triatomines

I. INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas constituye un problema de salud pública en Latinoamérica, se ha reportado desde el sur de los Estados Unidos hasta el sur de Chile y Argentina; está incluida dentro de las enfermedades parasitarias más importantes. De acuerdo con la OMS, en 1991 existían de 16 a 18 millones de personas afectadas y cerca de 100 millones en riesgo de ser infectadas (1-3). Esta enfermedad ocupa, dentro de las parasitosis transmitidas por artrópodos, el segundo lugar en importancia en Latinoamérica después del paludismo (4-7).

La enfermedad de Chagas es una enfermedad zoonótica compleja, que involucra múltiples vectores de la familia Hemiptera: *Reduviidae* y hospederos reservorios lo cual genera diversos ciclos de transmisión según las diferentes regiones geográficas (4, 5). *Trypanosoma cruzi* es un protista de la clase Zoomastigophora, familia Trypanosomatidae.

Uno de los objetivos del Comité de Entomología Molecular de la Organización Mundial de la Salud en el campo de las enfermedades transmitidas por insectos vectores como la malaria, la tripanosomiasis o el dengue, es la comprensión básica y/o molecular de la interacción vector-parásito, desde el punto de vista de la bioquímica, la inmunología, la genética y la biología molecular (8).

Con base en lo anterior, resalta la importancia del estudio de los triatominos, como el tercer elemento de la triada hospedero-parásito-vector que se debe considerar, para contribuir al conocimiento profundo de esta interacción con miras al control de la transmisión del parásito, ya que sin transmisor el agente causal de la enfermedad de Chagas no infectaría.

Como una medida de control de la transmisión de *T. cruzi* es importante investigar los factores que influyen en la interacción parásito-transmisor, dentro de estos, los relacionados con el microambiente del triatomino son importantes pues de ello podría depender el establecimiento y colonización del parásito. A este respecto se sabe que en diversos insectos existe la presencia de endosimbiontes los cuales pueden positiva o negativamente influir en el desarrollo de los artrópodos y por ende en los parásitos que transmitan si es el

caso. Por lo que en el presente proyecto se investigó el efecto de la presencia de endosimbiontes sobre el desarrollo de triatomíneos, particularmente la especie *Triatoma barberi* y sobre la colonización de *T. cruzi*.

II. ANTECEDENTES

2.1 Generalidades

Las enfermedades transmitidas por insectos vectores representan un impacto socioeconómico alto por año a nivel mundial (9). La enfermedad de Chagas es un padecimiento que ocupa, dentro las parasitosis transmitidas por artrópodos, el segundo lugar en importancia en Latinoamérica después del paludismo, es exclusivamente del continente americano, y es una enfermedad zoonótica compleja, que involucra múltiples vectores de la familia Hemiptera: (Reduviidae) así como hospederos y reservorios lo cual genera ciclos de transmisión diversos según las diferentes regiones geográficas (5).

La enfermedad de Chagas es causada por un parásito hemoflagelado denominado *Trypanosoma cruzi* el cual pertenece al grupo estercoraria (parásitos que se desarrollan en el intestino del insecto). Este parásito no es inoculado por la picadura del insecto, sino que al ser depositado junto con los desechos (heces) sobre la piel, penetran a torrente sanguíneo a través del piquete del insecto, excoriaciones o a través de las mucosas de ojos, boca y nariz. La transmisión de *T. cruzi* también es posible por medio de transfusiones de sangre de personas infectadas, por infección congénita, por lactancia materna o por accidentes de laboratorio (10-13).

La enfermedad de Chagas es un fenómeno permanente en casi el 25% de la población en Latinoamérica, existe una amplia variedad en las tasas de prevalencia, vías de transmisión, características de los parásitos, patología clínica y reservorios entre una región endémica y otra. A pesar de los adelantos en los estudios epidemiológicos de la enfermedad, es difícil determinar con exactitud su incidencia y prevalencia. La enfermedad se ha registrado desde la latitud 42° N (Norte de California) a la latitud 46° S (Sur de Argentina y Chile); sin embargo, la distribución de los vectores silvestres y reservorios es mayor a la enfermedad humana (14-16).

La prevalencia total de la infección por *T. cruzi* pudo estimarse de manera confiable en 1980, cuando se demostraron 18 millones de casos en 21 países endémicos con 100 millones de personas en riesgo de infección. De acuerdo con datos obtenidos en el año de 1993 del banco mundial, se estableció que la enfermedad de Chagas en Latinoamérica ocupa el primer lugar de enfermedades tropicales y cuarto lugar en enfermedades transmisibles, lo que representa una pérdida económica para países endémicos de 6.5 millones de dólares por año (17).

La Tripanosomiasis está ampliamente distribuida en América Latina en países como: Argentina, Bolivia, Brasil, Chile, Paraguay, Uruguay, Colombia, Ecuador, Perú, Venezuela, El Salvador, Guatemala, Honduras y Nicaragua (18, 19). Con respecto a México, podemos encontrar que se distribuyen un mínimo de 32 especies de triatomíneos pertenecientes a siete géneros denominados: *T. longipennis*, *T. dimidiata*, *T. barberi*, *T. phyllosoma*, *T. pallidipennis*, *T. picturata* y *Rhodnius prolixus* distribuidos en todos los estados (20).

La tripanosomiasis americana, fue descrita por Luis Mazzoti por primera vez en México en 1949. Es endémica en varios estados del territorio nacional especialmente estados como Chiapas, Oaxaca, Veracruz, Guerrero y Jalisco. Se estima que en nuestro país la seroprevalencia es de 1,6 % (21). Según estudios hechos en los últimos años se encuentra un mayor porcentaje de infección en las especies *T. pallidipennis*, *T. picturata*, y *T. longipennis* en los estados de Nayarit, Morelos y Michoacán principalmente (22).

Con respecto a los triatomíneos una de las tantas interrogantes que surge es ¿Cuál es o cuáles son los factores que permiten el establecimiento o colonización de *T. cruzi* dentro del intestino de los triatomíneos? Si llegamos a conocer la respuesta a esta interrogante, se podrá diseñar una estrategia de control que permita interrumpir el ciclo de transmisión de este parásito. En este sentido se cree que la microbiota presente en el intestino medio de los insectos vectores puede cumplir con funciones importantes y determinantes para la supervivencia del parásito *T. cruzi* y su desarrollo en el huésped como lo es el insecto vector y por lo tanto contribuir a la modulación de competencia para muchas enfermedades importantes (23, 24). Se ha demostrado particularmente en termitas y cucarachas contienen

en su intestino microorganismos que actúan como simbioses e inclusive se reporta que pueden contribuir a la dieta del mismo insecto (24).

Es importante y resulta de gran interés el conocer si estos simbioses producen sustancias que influyan positiva o negativamente en que los parásitos puedan ser transmitidos al insecto vector, a este respecto, diversas moléculas que interfieren en el desarrollo dentro del transmisor han sido identificadas. (25, 26). De este modo se han establecido técnicas que pueden transformar genéticamente a los vectores, ocasionando que ellos produzcan moléculas que interfieren con el desarrollo del parásito; es así como se han estudiado los transmisores de parásitos de importancia médica como es el caso de los triatomíneos, con la finalidad de buscar mecanismos que impidan 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 como: *Trypanosoma rangeli* y *Blastocryptidia triatomae* (27).

Investigadores han aislado simbioses de diferentes triatomíneos a través de distintas técnicas. Beard y colaboradores (2001), diseñaron una estrategia con la finalidad de conocer mejor a las bacterias presentes en los triatomíneos. La técnica consiste en extraer las bacterias simbioses del intestino del triatomíneo, e introducir en ellas genes que codifiquen para moléculas que puedan eliminar o impedir el establecimiento del *T. cruzi* y finalmente inocular el intestino con las bacterias modificadas para que realicen la función esperada. (28, 29).

2.2 Epidemiología

El hombre y más de 150 especies de animales domésticos y salvajes como cánidos, felinos, roedores, marsupiales, quirópteros, etc. actúan como reservorios del parásito a partir de los cuales se infecta el vector; y de ser primitivamente una zoonosis causada por *T. cruzi*, que inicialmente se transmitía principalmente entre pequeños mamíferos salvajes, pasó a los animales domésticos y a los seres humanos a través de triatominos, principalmente los géneros *Rhodnius*, *Triatoma* y *Panstrongylus*; vectores ampliamente distribuidos en regiones tropicales y subtropicales en el Continente Americano desde el sur de los Estados Unidos de América hasta el sur de Chile y Argentina. De esta manera, ocurren ciclos domiciliarios, en el cual la participación humana es fundamental, además de ciclos silvestres en los cuales hay exclusión total del hombre en la cadena epidemiológica (30-32).

Los triatominos colocan hasta 300 huevos durante su ciclo vital que tiene una duración de aproximadamente 400 días dependiendo de la especie de la que se trate y se desarrollan a través de 5 estadios ninfales (I; II; III; IV y V) desde el huevo hasta alcanzar el estado adulto. Son insectos hematófagos obligados y chupan sangre desde el estadio I, contagiándose con *T. cruzi* desde un animal o humano infectado y una vez en el insecto, el *T. cruzi* permanece en su intestino de por vida (30-32).

2.3 Vías de transmisión de *Trypanosoma cruzi*

2.3.1 Transmisión vectorial

La principal vía de transmisión es la transmisión vectorial, que se estima en más del 80% de los casos conocidos, en áreas tradicionalmente endémicas y en nuevas áreas, explicando la mayoría de las 200,000 nuevas infecciones que ocurren anualmente en América Latina. La transmisión vectorial se realiza indirectamente, por el contacto de la materia fecal con parásitos, ya sea con el orificio de la piel producido por la picadura del triatomino para succionar sangre, o por el depósito de heces sobre mucosas del huésped. Otra vía de transmisión vectorial posible es la transmisión oral descrita desde la década de 1960, en casos aislados y en forma de brotes (30, 32, 33).

Sin embargo, existen otras vías como la transfusión sanguínea, transmisión congénita, trasplante de órganos y la relacionada con accidentes de laboratorio u ocupacionales en trabajadores de la salud.

2.3.2 Transmisión por transfusión sanguínea

Entre 1934 y 1936, Mazza advirtió sobre las posibilidades de la transmisión de *T. cruzi* por transfusión sanguínea (34).

La infección por *T. cruzi* es potencialmente transmisible por transfusión sanguínea por lo cual debe ser estudiada en zonas donde existan donantes infectados. Actualmente, la transmisión por transfusión sanguínea es la segunda causa de infección por *T. cruzi* después de la transmisión vectorial en diversas regiones de América (35, 36).

La confirmación por técnicas de biología molecular PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) para ADN de *T. cruzi* de la parasitemia casi constante en los infectados chagásicos, fundamenta la necesidad de que los bancos de sangre informen a sus donantes sobre su infección, para que tomen las medidas de control y terapia pertinentes, así como para evitar una nueva donación. Esta conducta beneficiaría al sistema de salud, tanto al donante chagásico como al receptor de órganos o tejidos. El donante podría tratarse oportunamente evitando futuras complicaciones y disminuiría el gasto de recursos en bancos, que deben eliminar bolsas de sangre positivas al tamizaje y por último permitiría disminuir el riesgo de transmisión en zonas en que no se efectúa este procedimiento (35, 36).

2.3.3 Transmisión transplacentaria

El riesgo de infección congénita reportada por WHO es del 1%, lo que indica que 8,000 niños al año son infectados congénitamente en Latinoamérica, 40% del total son de Brasil (37).

Carlos Chagas menciona la transmisión congénita en humanos en 1911, tema estudiado mas tarde en animales por Nathan Larrier y Souza Campos. En 1949, esta forma de transmisión fue definitivamente señalada en humanos en Venezuela por L. Dao. En los años 70 y 80, grupos argentinos estudiaron los factores de riesgo y definieron que los casos más frecuentes de la transmisión materno-infantil ocurren de manera más o menos silenciosa y asintomática, resultando aparentemente normales y con baja parasitemia (34).

A partir de los años 80, la comunidad científica acentúa los estudios sobre la transmisión materno-infantil de la enfermedad de Chagas humana, priorizando los modelos prospectivos de riesgo y manejo; en los años 90 estas líneas se consolidan en varios países como Argentina, Bolivia, Brasil, Chile y Paraguay. En los talleres de Uberaba, Brasil, el tema fue discutido en 1996 y 1998, concluyendo que el riesgo es variable entre 0,5 y \pm 6,0% de transmisión a partir de la madre infectada, con variaciones regionales y siempre involucrando alteraciones placentarias (34).

2.3.4 Transmisión accidental

La 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 que no acata las medidas de seguridad en el laboratorio. Por ejemplo: manejo de triatominos, cultivos, animales de experimentación infectados, manejo de sangre de pacientes etc., es por eso que esta enfermedad debe ser considerada una de las enfermedades parasitarias de transmisión en el laboratorio más importante. Con un riesgo mayor con respecto a las enfermedades infecciosas, incluyendo las infecciones virales y bacterianas (38).

2.4 Marco Teórico

2.4.1 *Trypanosoma cruzi*

T. cruzi es un parásito flagelado del orden *Kinetoplastida*, familia *Trypanosomidae*, (Figura 1), que se caracteriza por la presencia de un flagelo y una sola mitocondria donde se sitúa el cinetoplasto, que es un organelo especializado que contiene ADN (14). Actualmente la clasificación taxonómica está establecida de la siguiente forma (39-41)

Reino- Protozoa
Subreino- Eozoa
Infrareino- Excavata
Phyllum- Euglenozoa
Clase- Kinetoplastea
Subclase- Metakinetoplastina
Orden- Trypanosomatida
Familia- Trypanosomatidae
Género- *Trypanosoma*
Especie- *Cruzi*

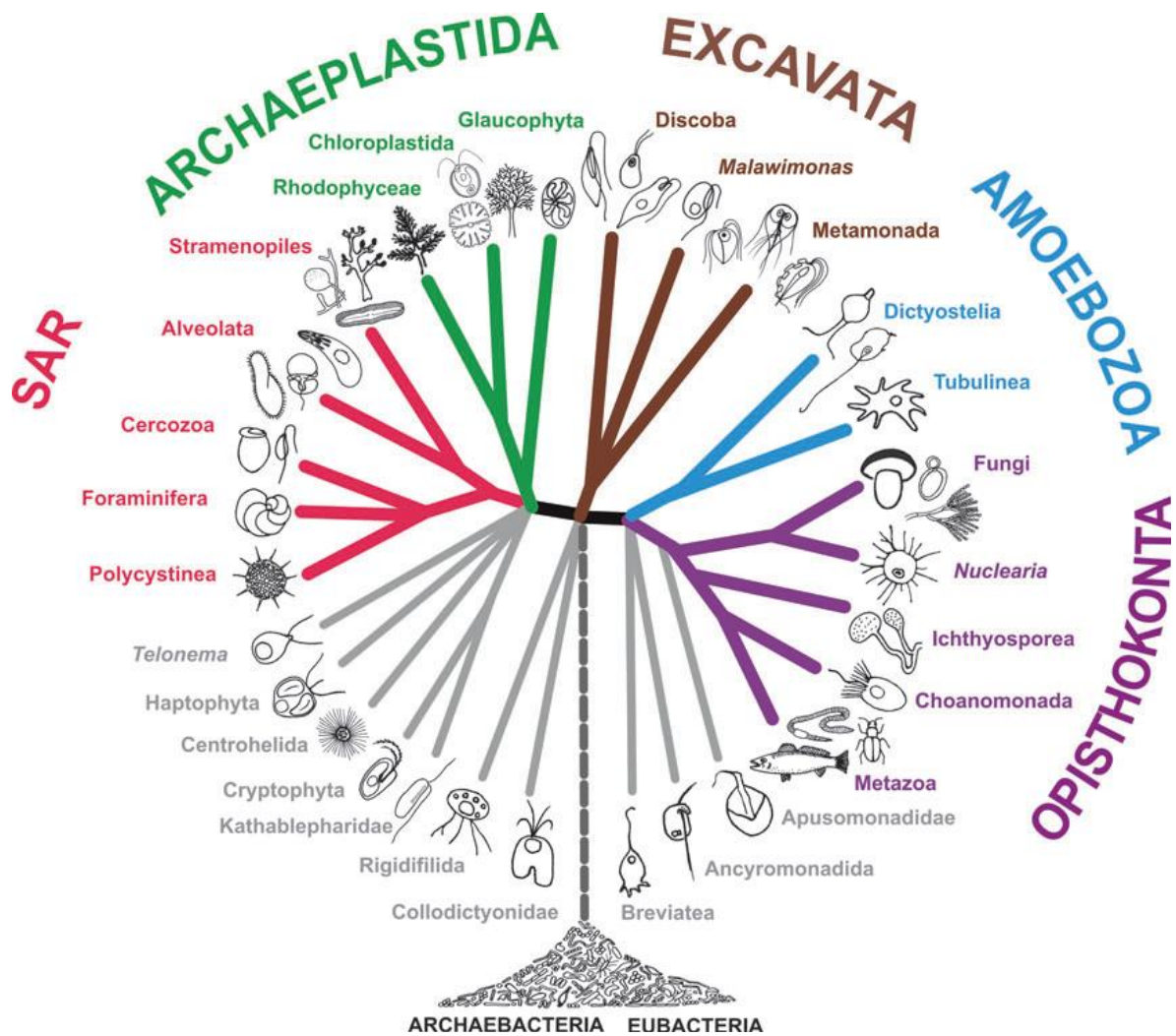


Figura 1 Revisión de la filogenia de organismos eucariontes tomado de 40.

2.4.1.1 Morfología de *Trypanosoma cruzi*

T. cruzi se multiplica y se diferencia en el tracto digestivo de los insectos triatominos, y es el agente etiológico causante de la enfermedad de Chagas. La infección es transmitida a través de los triatominos que se alimentan de sangre y quedan infectadas al alimentarse de un animal portador de la infección, ingiriendo así al parásito en su estadio de tripomastigotes. Este parásito presenta principalmente 3 fases: tripomastigotes, epimastigote y amastigote, que se pueden identificar por la posición del cinetoplasto con respecto al núcleo y la forma redondeada del amastigote, (Figura 2). Cabe hacer mención que más de 10 fases también se han identificado, sin embargo son fases inestables, (Figura 3), (42-45).

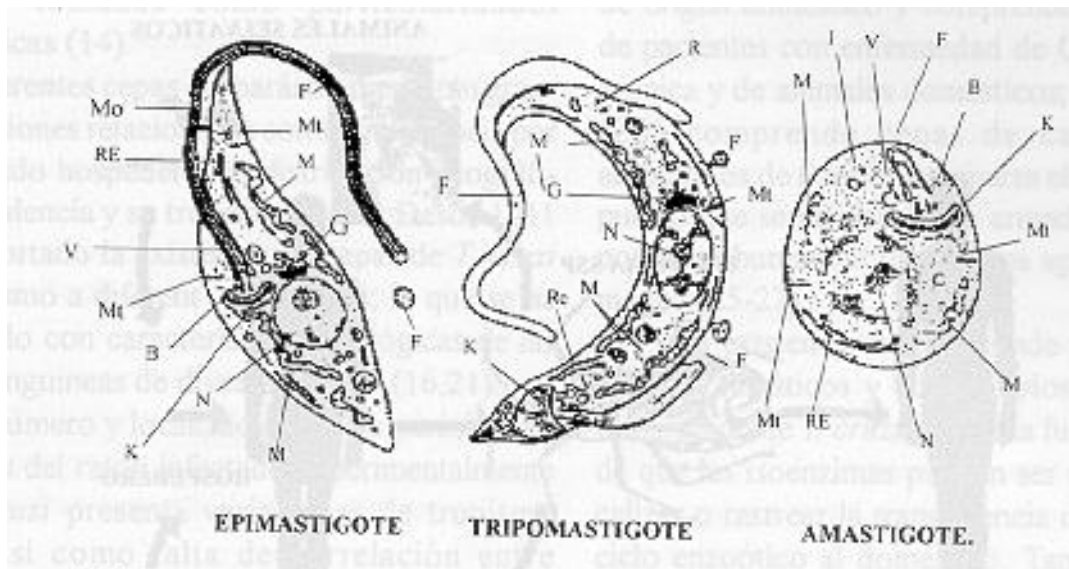


Figura 2 Fases morfológicas de *T. cruzi* e identificación de los organelos que los componen. B (Blefaroplasto), F (Flagelo), M (Mitocondria), G (Aparato de Golgi), V (Vacuola), Mo (Membrana ondulante), I (Inclusión limeica), K (Cinetoplasto), R (Ribosomas), N (Núcleo), RE (Retículo Endoplasmico), Mt (Microtúbulos), (46)

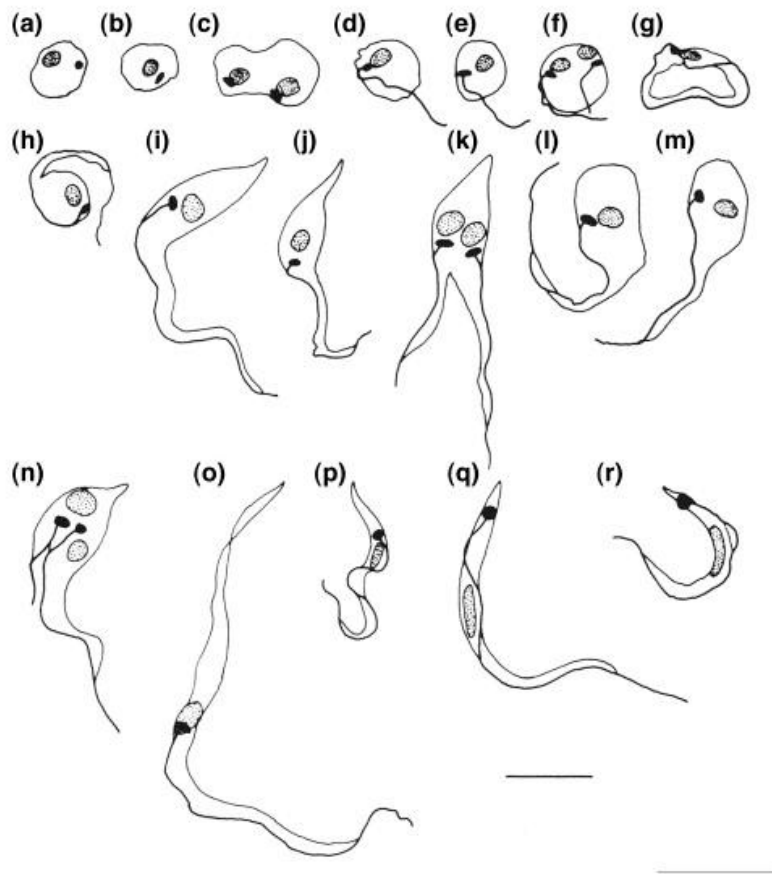


Figura 3 Dibujos de las formas de desarrollo de *T. cruzi* encontrados en el intestino delgado y el recto de *Triatoma infestans*. Amastigotes (a-c) y Esferomastigotes (d-f) con cinetoplasto redondo (a, d) y con cinetoplasto horizontal (b, e), etapas de división (c, f); Fases intermedias de Esferomastigotes 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). Escala 10 μ m, tomado de 43.

2.4.2 Ciclo biológico del parásito

Se inicia cuando un triatomino se alimenta de la sangre de un mamífero infectado que contiene tripomastigotes circulantes; éstos pasan al intestino del triatomino, se transforman en epimastigotes, se multiplican por fisión binaria longitudinal y a pocos días se encuentran como tripomastigotes metacíclicos en la porción distal del intestino del insecto. Cuando el vector infectado se alimenta, puede ingerir varias veces su peso corporal en sangre y defecar sobre la piel o mucosas del mamífero; de esta manera deposita junto con su excremento tripomastigotes metacíclicos infectantes. Cuando el insecto arrastra con sus patas la materia fecal, se introducen los tripomastigotes metacíclicos por la laceración inducida por la probóscide del insecto al alimentarse, también es posible que el mismo hospedero se infecte a sí mismo al llevar las deyecciones a una solución de continuidad en la piel, hacia alguna mucosa o a la conjuntiva ocular (47, 48).

Los tripomastigotes metacíclicos, una vez dentro del mamífero y después de pasar la barrera de la piel, mucosas o conjuntiva ocular, se introducen a las células del tejido celular cercano al sitio de penetración, en donde se transforman en amastigotes. Ahí se multiplican por fisión binaria y alcanzan la circulación sanguínea y es ahí cuando su elevado número causa la muerte y destrucción de la célula infectada, también se ha demostrado su diferenciación intracelular a la forma de tripomastigote, y se ha sugerido su salida de la célula sin causarle daño inmediato (47).

Tras entrar al torrente sanguíneo, los amastigotes pueden infectar nuevas células o transformarse rápidamente en tripomastigotes sanguíneos y diseminarse por vía hematógica en todo el organismo, donde puede invadir casi cualquier célula. El ciclo biológico se completa cuando un triatomino se alimenta de un mamífero infectado y adquiere el parásito (47, 49, 50).

El ciclo de vida del *Trypanosoma* en el insecto involucra varios estados morfológicos que dependen del micro ambiente intestinal (Figura 4). Presenta formas: Amastigotes, Esferomastigotes, Epimastigote, Tripomastigote (51). Amastigotes: son esféricos u

ovalados de 2-4 μm de diámetro. Epimastigote: Son alargados de 20 μm de longitud, tienen un flagelo libre. Tripomastigotes: Su longitud es de 20 μm ., tiene un flagelo y una membrana ondulante a lo largo de su cuerpo.

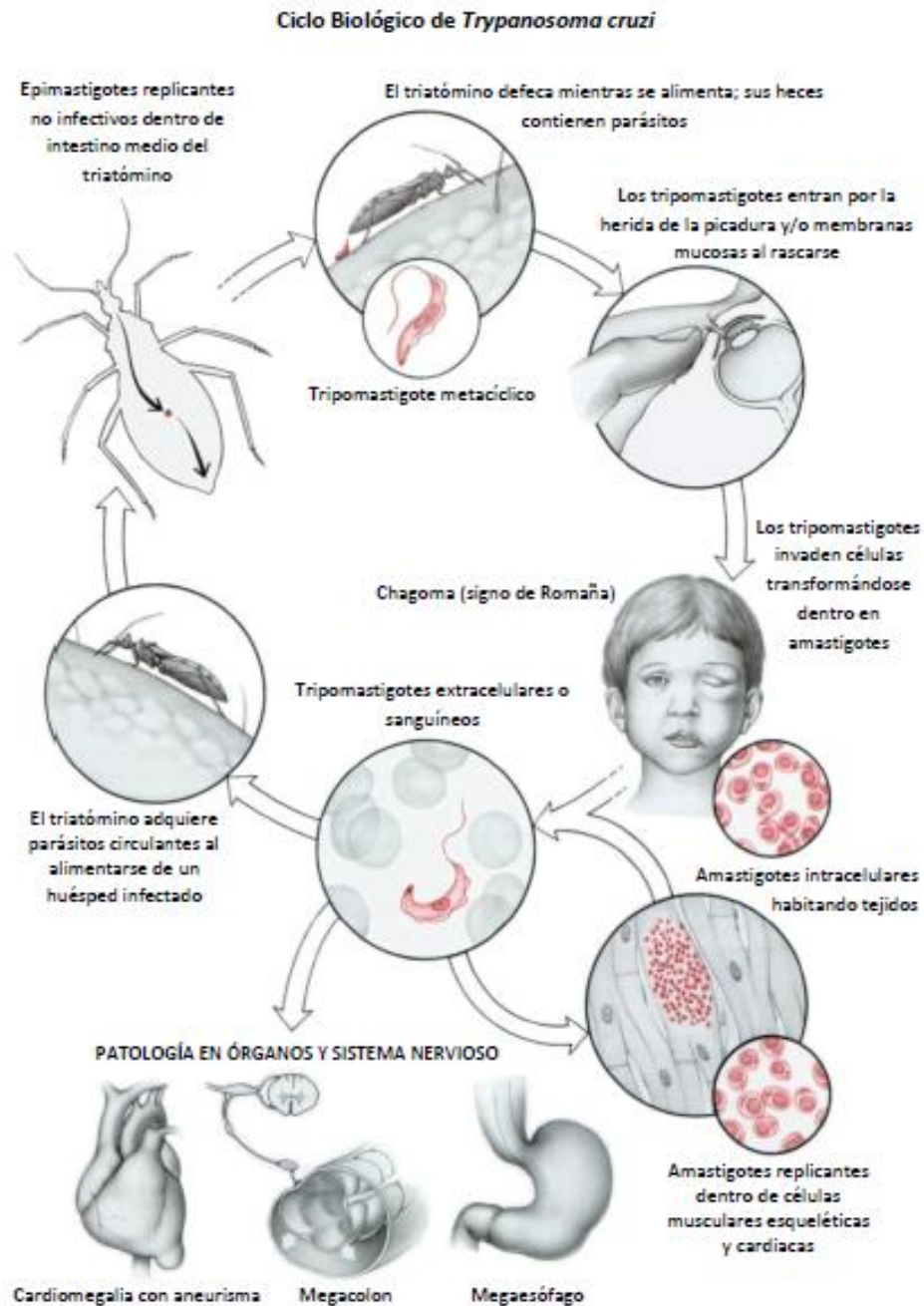


Figura 4 Ciclo de vida de *T. cruzi*. Tomado de 52.

2.4.3 Enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas fue descrita por Carlos Ribeiro Justiniano Das Chagas (1879-1934) en 1909. Es ocasionada por *T. cruzi*, un protozooario que se trasmite al ser humano por insectos hematófagos; a su vez estos vectores se infectan al alimentarse de humanos o mamíferos infectados y permanecen así durante toda su vida (50, 53-55).

En el hombre, la infección por *T. cruzi* tiene un período de incubación de cuatro a 10 días, generalmente sin síntomas. La enfermedad de Chagas se divide en tres fases:

Fase aguda: Este período se presenta en forma más severa sobre todo en niños menores de seis años, en los cuales puede causar la muerte debido a las alteraciones del SNC (Sistema Nervioso Central), como meningoencefalitis, letal en el 50% de los casos, y trastornos cardíacos como miocarditis. Por lo general, el período de incubación es de 3 días y se pueden encontrar parásitos en circulación sanguínea en un lapso de 14 a 28 días posterior a la infección. Durante este lapso los parásitos se replican en células epiteliales, macrófagos y fibroblastos. Se pueden presentar algunos signos, como son el *Chagoma de inoculación*, caracterizado por la presencia de un proceso inflamatorio agudo localizado en el sitio de infección, y que produce una induración dolorosa y eritomatosa o un edema unilateral bpalpebral con adenitis retroauricular que se conoce como *signo de Romana*, y que aparece cuando la infección tiene lugar por la conjuntiva ocular. Ambos signos son, autolimitados y desaparecen con lentitud al cabo de 30 a 60 días. La fase aguda puede durar hasta 60 días y se caracteriza por malestar general, fiebre continua o intermitente, linfadenitis generalizada, dolores musculares, epistaxis, escalofrío, hepatoesplenomegalia y esplenomegalia, además de que el individuo describe astenia y adinamia, ocasionando cansancio progresivo, así mismo pueden encontrarse alteraciones electrocardiográficas, en especial arritmias y taquicardias, e incluso miocarditis, que pueden ser fatales (47).

Fase subclínica (indeterminada): Es una fase silenciosa que puede extenderse hasta 30 años antes de presentar el daño característico de la fase crónica, en este periodo pueden manifestarse alteraciones electrocardiográficas aisladas como arritmias y taquicardias, que en algunos casos puede llegar a ocurrir muerte súbita sin causa aparente si no se establece un diagnóstico oportuno de la enfermedad. La presencia de parásitos circulantes es ocasional y para identificarlos es necesario utilizar métodos muy sensibles, como el hemocultivo y el xenodiagnóstico o, en fechas recientes la técnica de PCR de ADN (47, 56)

Fase crónica: En este periodo existen alteraciones en corazón y músculo liso, sobre todo esófago y colon. Se ha estimado que el 30% de las personas en la fase indeterminada desarrolla la fase crónica, que incluye cardiopatía crónica (27%) y alteraciones crónicas digestivas y neurológicas (6 y 3 % respectivamente). La afección cardíaca en esta fase, es la alteración encontrada con más frecuencia en los sujetos afectados. El crecimiento ventricular es común, aunque también se puede observar un crecimiento auricular (47, 57-59).

2.4.4 Triatominos

El triatomino es la principal forma de transmisión de la enfermedad de Chagas en el continente existen alrededor de 124 especies hematófagas, de las cuales, 107 son portadoras del protozooario infectante y la clasificación taxonómica es la siguiente (60, 61)

Reino – Animalia
Subphyllum - Mandibulata
Phyllum - Arthropoda
Clase - Insecta
Orden - Hemiptera
Familia - Reduviidae
Subfamilia - Triatominae
Géneros - *Triatoma*
Dipetalogaster
Rhodnius
Panstrongylus
Eratyrus
Belminus
Paratriatoma

También se conocen como chinches besuconas o chinches de la muerte, entre otras denominaciones. Son insectos que pertenecen al orden Hemiptera, familia *Reduviidae* y subfamilia Triatominae, algunos triatomas pueden alimentarse de vertebrados y algunos otros de invertebrados, especialmente en sus etapas juveniles de desarrollo conocidas como ninfas o estados ninfales. Los triatomas están adaptados a muchos hábitats estables, como el humano, en el cual viven y se alimentan y animales domésticos (42).

2.4.4.1 Características de los Triatominos

Los aspectos morfológicos que caracterizan a la subfamilia Triatominae: Son insectos que tienen su cuerpo dividido en tres secciones o regiones que son: cabeza, tórax y abdomen, (Figura 5). La extremidad anterior de los insectos está representada por la cabeza, ésta puede ser cilíndrica, subcilíndrica, sub ovoide o de forma cónica de acuerdo al taxón, se identifica por la presencia de un rostro o pico recto ubicado por debajo de la cabeza, que consiste en un labio segmentado que aloja las partes bucales que son finas y delgadas denominadas estiletes y constituyen dos mandíbulas y dos maxilas. Poseen antenas de cuatro segmentos en ambos lados de la cabeza, en la región anterior de los ojos; en el segundo segmento ostentan vellosidades que son finos y largos, los cuales se insertan en depresiones redondas, llamados tricobotrios, cuya distribución parece ser característica en las diversas especies, (Figura 6), (2-62). La relación entre la cabeza y el resto del cuerpo es de mayor importancia taxonómica. El tórax está dividido en tres segmentos que son el pro, meso y metatórax, la región dorsal es conocida como notum, la región lateral como pleura y el área ventral como esternón. Algunas características que presenta el abdomen es que puede ser convexo o plano.

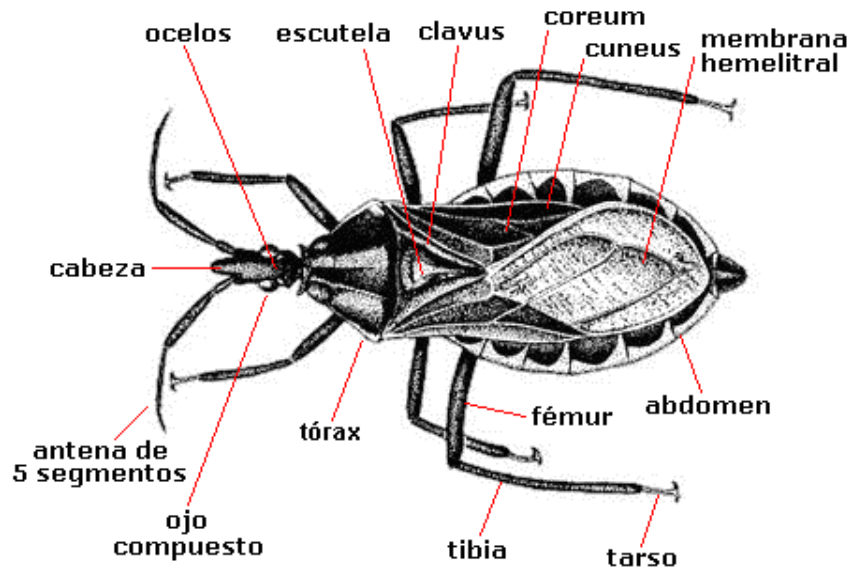


Figura 5 Vista dorsal de un triatominio que muestra de una manera general cada una de las partes que forman el cuerpo de este insecto principalmente las tres secciones en las que se divide que son cabeza, tórax y abdomen tomado de 63.

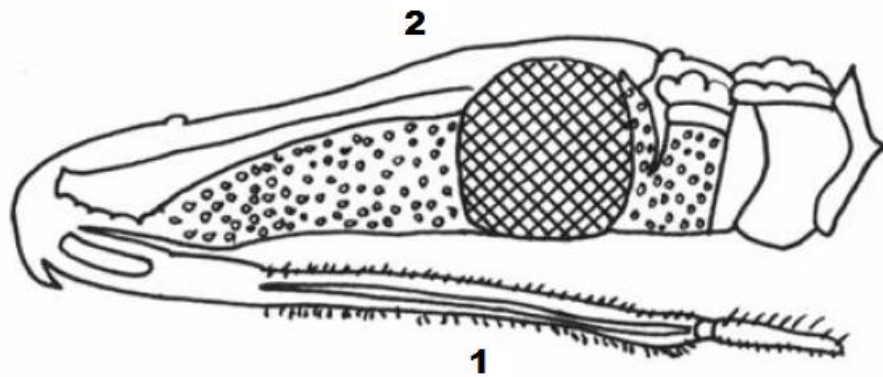


Figura 6. Estructura Cefálica de los triatominos. Vista lateral de la estructura cefálica general de los triatominos; en donde se puede observar el labio segmentado que aloja las partes bucales que son finas y delgadas (estiletes) y constituyen dos mandíbulas y dos maxilas (1), y sus antenas (2-62).

El pronoto posee un lóbulo anterior y otro posterior, que puede poseer espinas o tubérculos de importancia taxonómica, el mesonoto está formado por un escutelo. El abdomen en los adultos tiene siete segmentos visibles, el primer segmento está escondido y los últimos tres son parte de las placas genitales de ambos sexos (62). Figura 7.

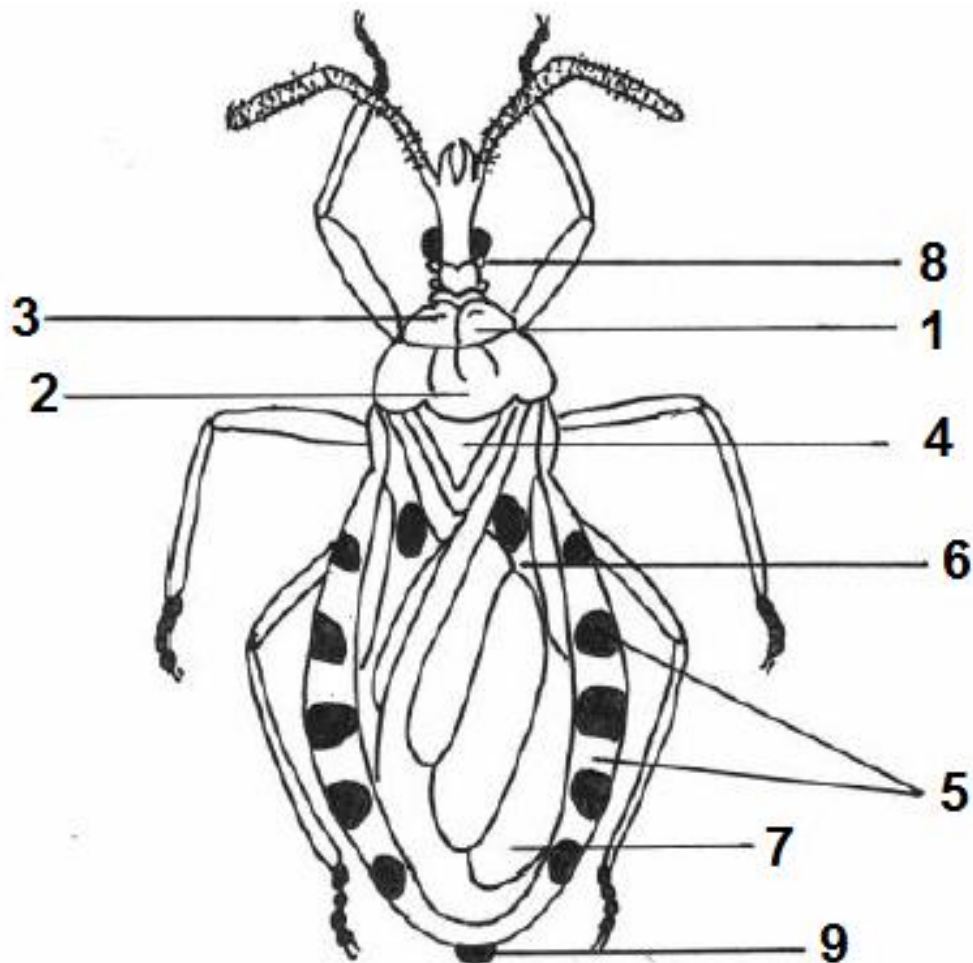


Figura 7. Vista dorsal general de un triatomino en donde se pueden observar estructuras como: Lóbulo anterior del pronoto (1), Lóbulo posterior del pronoto (2), Espinas o Tubérculos (3), Escutelo (4), Conectivo (5), Coreum (6), Membrana Hemelital (7), Ocelo (8), Ovipositor (9). (62)

Las ninfas no solo carecen de alas y placas genitales desarrolladas, sino también de ocelos, escutelo, y conectivo (Figura 8), en ellas su tórax posee tres porciones más o menos nítidas y en el abdomen se pueden observar diez segmentos, aunque los últimos son muy reducidos, las características del tórax en una vista dorsal permite reconocer cualquiera de los cinco estadios ninfales y la morfología de los últimos segmentos abdominales de las ninfas de quinto estadio permiten determinar el sexo de estos cuando llegan a la fase adulta (62).

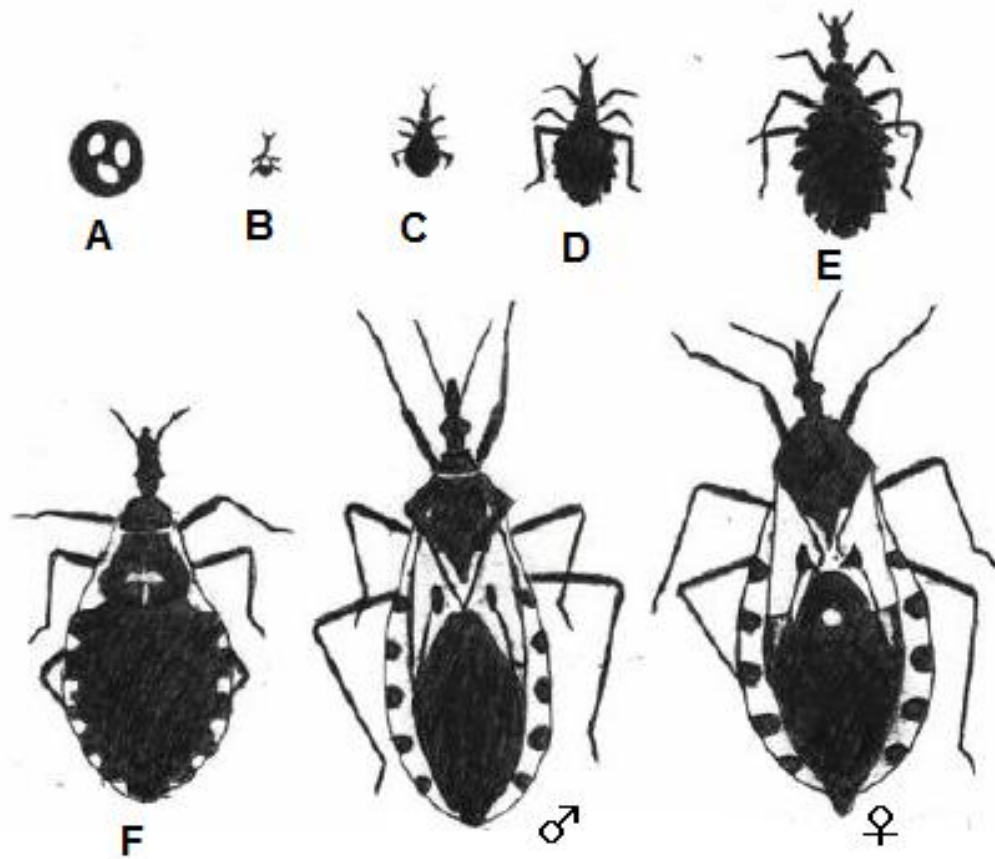


Figura 8. Estadios morfológicos por los que pasa un triatomino: A) Huevo; B, C, D, E, F) De 1° a 5° estadio, por último un Adulto Macho y un Adulto Hembra tomado de 62.

2.4.5 *Triatoma barberi*

Triatoma barberi es considerada la especie endémica más importante en México transmisora de la enfermedad de Chagas por las siguientes razones: por ser de hábitos domésticos y peridomésticos (64-67), porque generalmente coexiste en la misma casa con otras especies domésticas como *T. dimidiata* y *T. pallidipennis* y por presentar amplia distribución geográfica que abarca 14 estados principalmente en la región central del país (68), Figura 9.

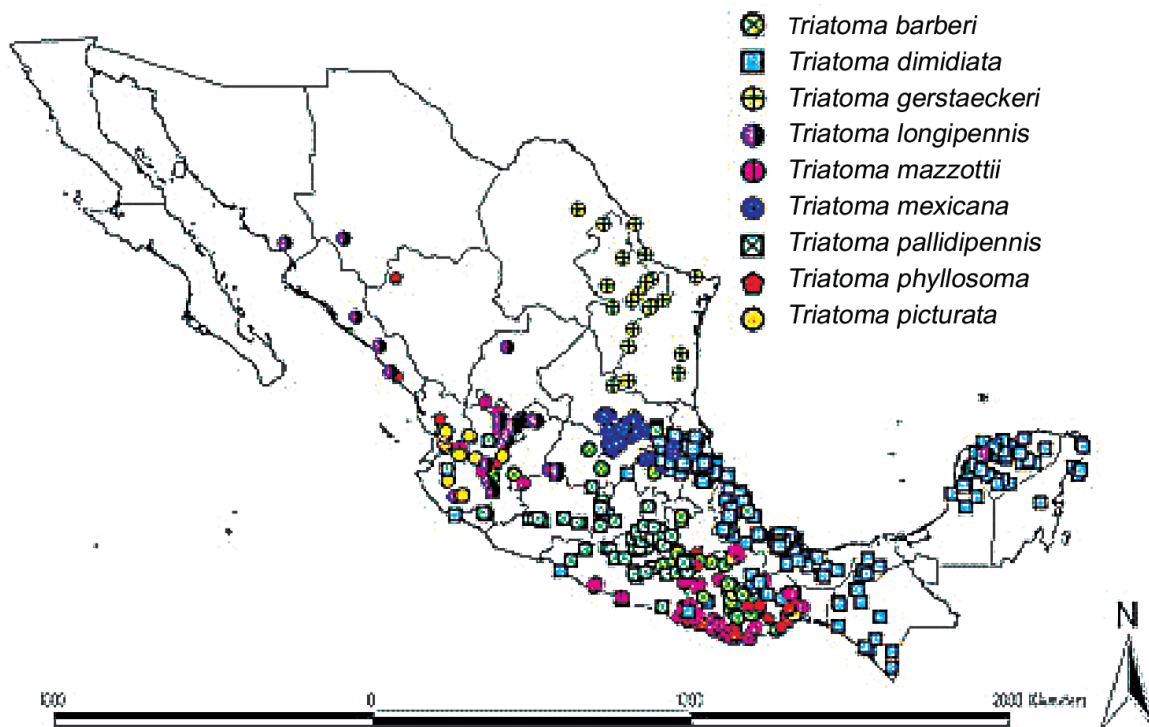


Figura 9 Distribución geográfica de las especies de triatominos reportadas en México en donde se observa que las especies de triatominos se ubican la mayor parte en el sureste del país, en el caso de *T. barberi* la especie de interés para este estudio la podemos encontrar en estados del centro de México tomado de 69.

En México, 19 de las 30 especies de triatominos presentes, se reportan como vectores de transmisión, cuyo orden de importancia está establecido en especies domiciliarias, peridomiciliarias y silvestres distribuidos ampliamente en todo el territorio nacional. Los

más abundantes y principales especies son: *Rhodius prolixus*, *T. barberi*, *T. dimidiata*, *T. pallidipennis*, *T. phyllosoma*, *T. longipennis*, *T. proctata*, *T. bassolsae*, *T. mexicana* y *T. gerstaeckeri*, (Figura 10), (13, 22, 52).

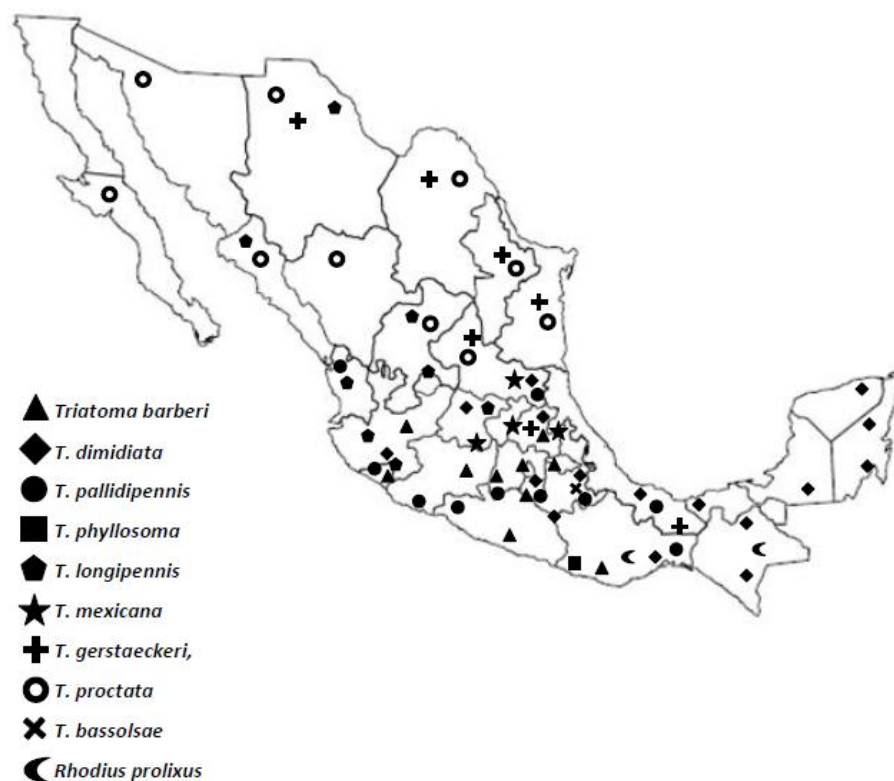


Figura 10. Principales especies de triatominos domiciliarias y peridomiciliarias distribuidas en México en donde se muestra que la especie a estudiar *T. barberi* se ubica en los estados de Jalisco, Michoacán, Guerrero, México, Oaxaca, Tlaxcala, Morelos, Distrito Federal e Hidalgo, tomado de 52.

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* en deyecciones y se obtuvieron los registros geográficos de su colecta (Téllez-Rendón, *et al.* 2002). Posteriormente dicha información

fue correlacionada con los datos de distribución de casos humanos. Los triatominos encontrados en el estado son: *T. dimidiata*, *T. gerstaeckeri*, *T. mexicana* y *T. barberi*, y se distribuyen principalmente en Huejutla, Molango e Ixmiquilpan. La positividad de infección de los insectos estudiados a *T. cruzi* fue de 12.5%. El mayor porcentaje de positividad por especie lo presentó *T. dimidiata* con 57.9%. Además es la especie más frecuente y ampliamente distribuida en el estado, no obstante que *T. barberi* es la asociada al domicilio. En cambio *T. dimidiata* es una especie que está en proceso de domiciliación, como en otros sitios del país y en otros países. Esta capacidad de adaptación a la vivienda humana representa un elemento de alto riesgo para adquirir la infección por *T. cruzi*, con lo cual aumentara la población en riesgo de contraer la Enfermedad de Chagas (13, 52), (Figura 11).

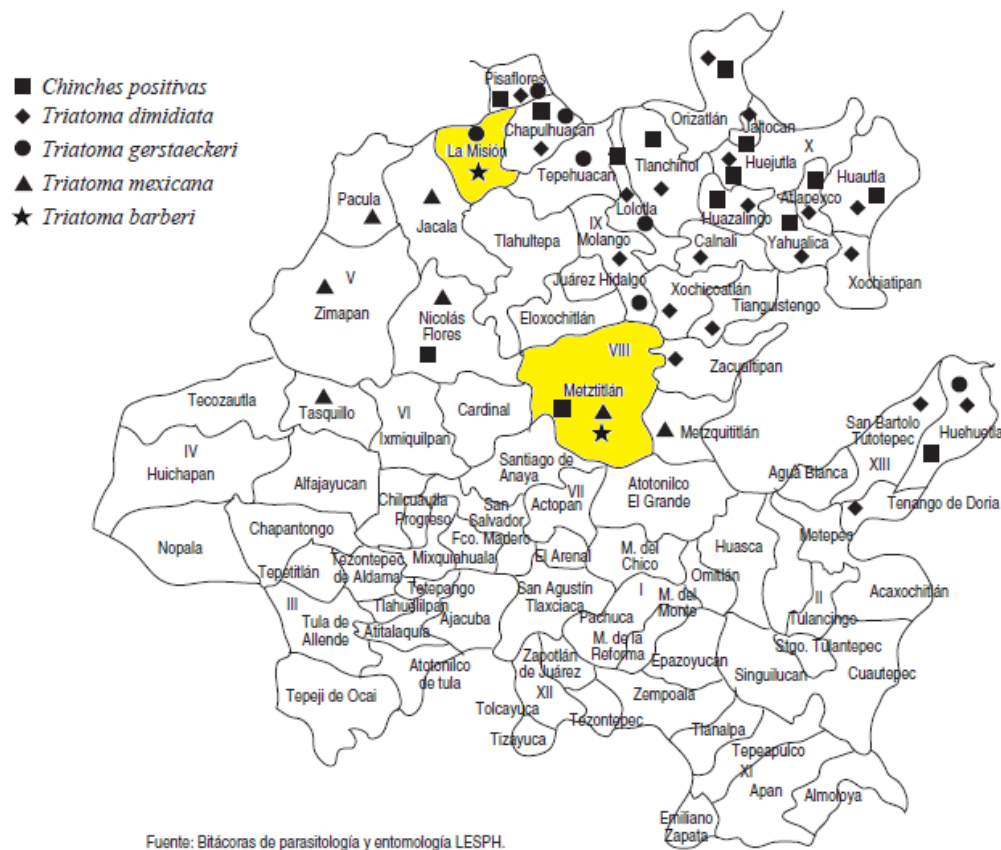


Figura 11. Distribución geográfica de *T. barberi* en el estado de Hidalgo, se observa mayor distribución en los municipios de Metztitlán y la Misión, además de encontrarse triatominos positivos en la localidad de Metztitlán.

2.4.6 Simbiosis y simbioses

Simbiosis (del griego simbios; vivir juntos): Anton de Bary en 1879 definió el término como: “La asociación permanente entre dos o más organismos específicamente distintos, principalmente en una parte de su ciclo de vida”. Este autor incluye al parasitismo como un tipo de simbiosis y considera esta simbiosis cuando ambos organismos se benefician de la asociación. Un caso especial de la simbiosis es la endosimbiosis en el cual uno de los dos organismos generalmente un procarionte se encuentra localizado dentro de otro.(4, 70)

Los triatomíneos son los vectores de la enfermedad de Chagas y son estrictamente insectos hematófagos, pues se alimentan de sangre de vertebrados a lo largo de todo su ciclo de desarrollo, por lo tanto la sangre que ingieren es su única fuente de alimento y su dieta carece de ciertas vitaminas y nutrientes. Por ejemplo en consecuencia estos insectos albergan poblaciones de bacterias simbioses dentro de su tracto intestinal, los cuales proporcionan los nutrientes necesarios que faltan en su dieta (28, 71-73).

A partir de varias especies de triatomíneos se han logrado aislar y caracterizar bacterias simbioses obtenidas del tracto digestivo de los insectos de los cuales, a partir de diversos métodos se han modificado genéticamente, y se han reintroducido a las especies hospedadoras originales produciendo de este modo insectos paratransgénicos, en los que se puede expresar productos génicos antitrypanosomal en el intestino del insecto, lo que da como resultado que los insectos sean capaces de transmitir la enfermedad de Chagas (26, 74-76), también a partir de estos modelos experimentales se ha podido observar que los simbioses se transmiten en la naturaleza entre poblaciones de insectos por coprofagia, (Figura 12) (28) (75).

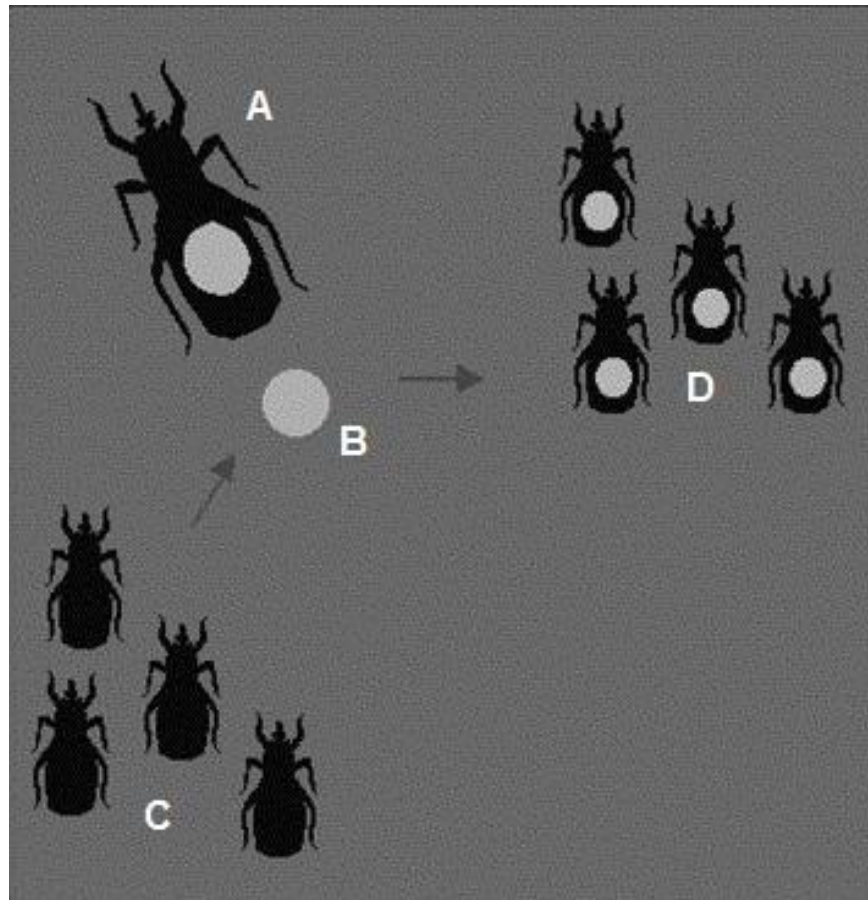


Figura 12. Esquema de transmisión de simbioses entre poblaciones de triatomíneos: A) Triatómino adulto. B) Heces fecales depositadas por triatóminos adultos. C) Los insectos obtienen a los simbioses por medio de coprofagia. D) Insectos con simbioses, tomado de 74.

III. JUSTIFICACIÓN

La enfermedad de Chagas constituye uno de los problemas más importantes de salud en Latinoamérica. El estudio y conocimiento de la biología de los vectores que pueden transmitir el *T. cruzi* en una población, puede constituir un importante avance epidemiológico y puede representar una de las principales estrategias para el control de la enfermedad.

Esta parasitosis tiene un fuerte impacto tanto social como económico y esto repercute en el desarrollo del país. Aunque no se ha realizado estimación sobre el ausentismo o la pérdida de productividad laboral debido a la enfermedad de Chagas, el rendimiento manual o mecánico de un individuo en fase crónica se ve comprometido. Se ha calculado que las pérdidas de productividad (promedio de años laborales perdidos) en Brasil están en alrededor de 22.75 % por 1000 años para hombres y 13.63 % por 1000 años para mujeres (77, 78). Los gastos médicos que generan las personas atendidas con medicamentos y consultas o son hospitalizadas son muy elevados. Un año de tratamiento con amodiorona, usada para controlar arritmias cardíacas tiene un costo de 150 dólares en Estados Unidos; los vasodilatadores y diuréticos tienen un costo similar (77-78). En el caso de consultas médicas y hospitalización de pacientes en fase crónica el costo es de 350 a 1630 dólares por año según su gravedad. En afección intestinal, una cirugía puede costar hasta 2,000 dólares y el costo de una implantación de un marcapasos puede ser de hasta 6,000 dólares en EU. Hay que tomar en cuenta las pérdidas económicas causadas por muertes precoces, así como también las pérdidas indirectas de productividad y los subsidios gubernamentales pagados a las personas discapacitadas. En Chile se calculó que el costo anual nacional por las pérdidas económicas debidas a la enfermedad de Chagas es de 37 mil dólares por año en ese país, considerando 10,000 casos. Por lo tanto el costo anual provocado por la enfermedad de Chagas asciende a 2,000 millones de dólares para todo el continente Americano (77-78).

Es bien sabido que los insectos han existido desde antes de la aparición del ser humano en la Tierra por lo que erradicarlos es una tarea casi imposible, lo mejor es aprender a convivir con ellos sin embargo se tienen que emplear estrategias para evitar que se infecten con *T. cruzi*, una posibilidad sería eliminar endosimbiontes que se encuentran en su intestino y que posiblemente permiten la colonización de *T. cruzi*. Por lo que el entendimiento de los factores que influyen en la colonización y transmisión de *T. cruzi* permitiría mejorar estrategias de control.

Por ejemplo, el que los endosimbiontes fueran factor importante para el desarrollo del transmisor puede utilizarse para hacer estrategias de eliminación del endosimbionte o viceversa.

Si esto logra ocurrir, los triatomíneos se pueden liberar al ambiente de manera que ya no pudieran ser infectados por el parásito lo cual mejoraría la calidad de vida de la población, ya no se emplearían insecticidas; en segundo lugar se evitaría el uso de plaguicidas evitando el deterioro ambiental y la intoxicación en animales y ser humano.

El poder conocer si los vectores permiten la colonización de *T. cruzi*, es un indicador del riesgo en el que se encuentra el hospedero al ser infectado.

IV. HIPÓTESIS

La colonización de *T. cruzi* y el desarrollo de los triatomíneos es afectada por la presencia de endosimbiontes en el intestino de *T. barberi*.

V. OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

Evaluar el efecto de endosimbiontes sobre la colonización de *T. cruzi* y el desarrollo de *T. barberi*.

5.2 Objetivos Específicos

- Identificar la presencia de endosimbiontes aislados en las diferentes fases de *T. barberi* mediante el empleo de pruebas bioquímicas.
- Determinar la influencia de endosimbiontes en el desarrollo de triatomíneos.
- Determinar el efecto de los endosimbiontes sobre la colonización de *T. cruzi* en el intestino de *T. barberi*.

VI. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Aislamiento de endosimbiontes a partir de las fases ninfales y adultos de T. barberi

Se realizó el aislamiento de endosimbiontes bacterianos a partir de cinco ejemplares de cada una de las cinco fases ninfales y el estado adulto, tanto hembras como machos de *T. barberi*, mantenidas en el laboratorio dentro de recipientes de plástico que contienen cartones plegadizos y cubiertos con una malla para facilitar su alimentación a 28°C, 40-60% humedad, y con un ciclo de noche-día para que tengan las condiciones adecuadas de sobrevivencia, (Figura 13).



Figura 13. Mantenimiento de la colonia de *T. barberi* con períodos luz-oscuridad, una humedad de 40-60%, temperatura de 28° C y la alimentación se realizó una vez por semana, con ratones.

Primeramente se seleccionaron aleatoriamente cinco ejemplares de la colonia de *T. barberi*. Se observó la estructura anatómica y una vez identificado el intestino se realizó una punción a la altura del intestino medio y posteriormente con una jeringa de 1 mL se inyectó 0.1 mL de solución salina estéril, después de dos o tres enjuagues se colectó el contenido intestinal, el cual se sembró en medio agar nutritivo. Se incubaron en placas de petri a 28° C durante 24-72 horas. Una vez observadas colonias bacterianas, se practicó la tinción de Gram (Arciniega et al, 2003) a cada colonia distinta (al menos dos colonias con características morfológicas similares.) Figura 14.

Una vez obtenido el crecimiento bacteriano se realizó una resiembra de las mismas, esto con la finalidad de obtener la pureza de los microorganismos bajo las mismas condiciones de incubación.

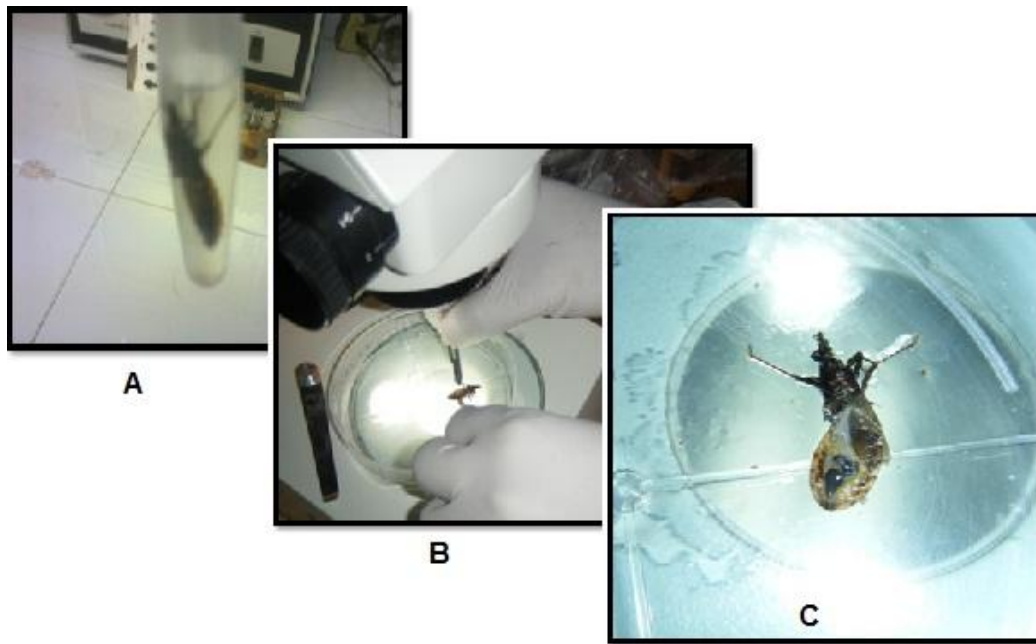


Figura 14 Aislamiento de endosimbiontes de *T. barberi* A) Se sumergió en etanol al 70% para su asepsia, B) Corte ventral de *T. barberi* para aislamiento de endosimbiontes, C) Vista ventral de *T. barberi* con intestino expuesto para el aislamiento de endosimbiontes.

6.2 Identificación de los endosimbiontes

Cada uno de los endosimbiontes aislados a partir del intestino de los triatominos se sembró en medio de cultivo AN. Una vez que se realizó este procedimiento de aislamiento de cada uno de los triatominos utilizados en sus cinco fases ninfales y etapas de adulto, la identificación de las bacterias se realizó mediante morfología macro y microscópica así como también por medio de prueba de hemólisis y pruebas bioquímicas; (Figura 15) para esto último cada endosimbionte se envió a un laboratorio especializado para su identificación. Se compararon los resultados de todas las colonias obtenidas para su identificación y se reportó el nombre de los distintos microorganismos que actúan como endosimbiontes de *T. barberi*.

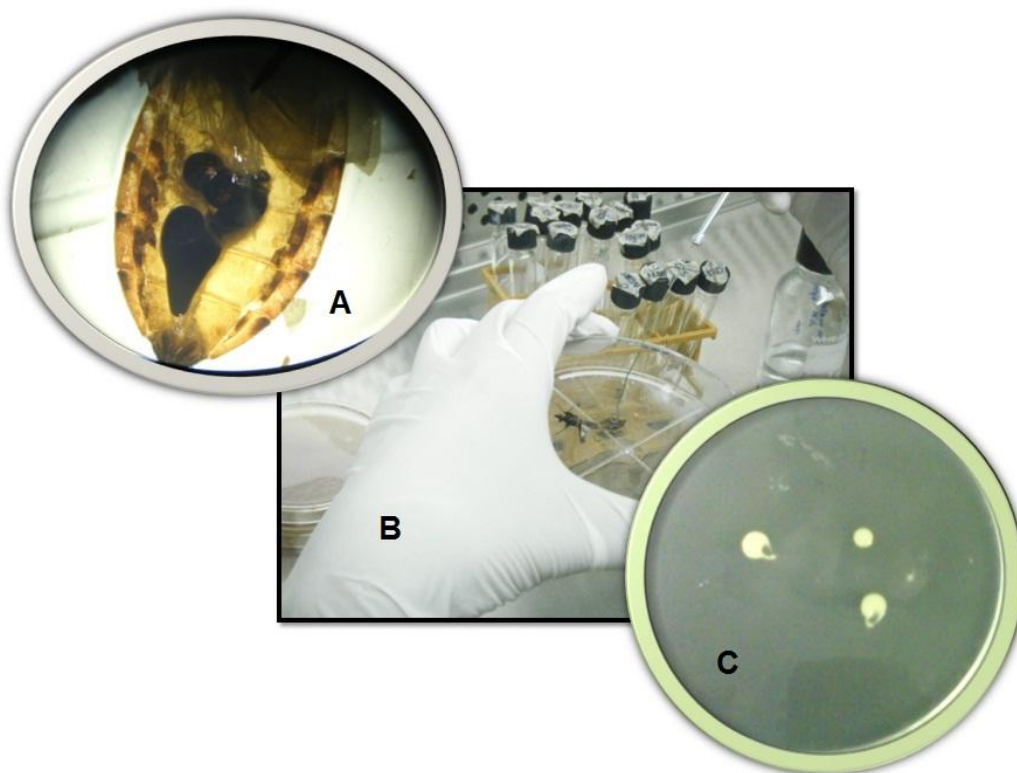


Figura 15 Metodología seguida para la obtención de simbioses del intestino de triatominos, A) Identificación del intestino de *T. barberi*; B) Siembra del contenido intestinal en AN; C) Crecimiento de colonias bacterianas.

6.3 Desarrollo de *T. cruzi* en medio de cultivo LIT

Los parásitos se desarrollaron en medio de cultivo Liver Infusion Tryptose (LIT), se incubaron a 28° C durante 10 a 15 días, hasta obtener el máximo de desarrollo en su curva de crecimiento que es en aproximadamente a las dos semanas (Figura 16).

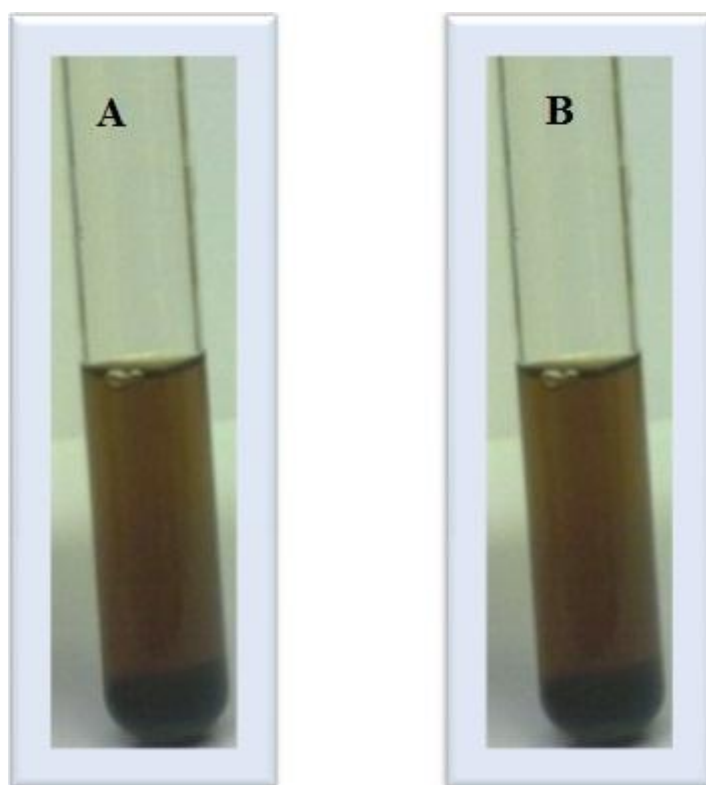


Figura 16 La cepa de parásitos se mantiene en medio LIT, una vez que el parásito alcanza su máximo de desarrollo, B) se hacen pases en el medio LIT cada 15 días para conservar la cepa.

6.4 Obtención de triatomínos libres de endosimbiontes

Para tener triatomínos libres de endosimbiontes es necesario trabajar con huevos separados de los insectos y continuar su desarrollo hasta eclosión. Para ello una vez que se separaron, se descontaminaron pasándoles un hisopo con etanol al 70% sobre su superficie e inmediatamente fueron colocados dentro de nuevos recipientes aireados con una malla de tela, se colocaron en microtubos de polipropileno de fondo cónico de 1.5 mL previamente esterilizados, esto es para evitar que después de eclosionar adquieran las bacterias contaminantes que se adaptan como nuevos endosimbiontes pues se obtienen a partir de coprofagia (74). Cabe hacer mención que toda la manipulación se hizo en un gabinete de bioseguridad tipo II/AB, para mantener condiciones de total esterilidad. Los triatomínos al igual que la colonia original fueron mantenidos en condiciones de laboratorio en una estufa a una temperatura de 27-31 °C, una humedad de 60-70% y con un ciclo de día noche que hace que los triatomínos tengan las condiciones adecuadas para su sobrevivencia.

Finalmente para mantener la colonia de los triatomínos estériles se alimentaron de una a dos veces por semana de voluntarios humanos a los cuales se les limpiaba la zona donde se colocaría el frasco previamente con etanol al 70%, estos triatomínos se mantuvieron así durante todo su desarrollo hasta alcanzar su fase máxima o hasta su muerte; cada alimentación duraba entre 20 a 25 minutos (Figura 17).

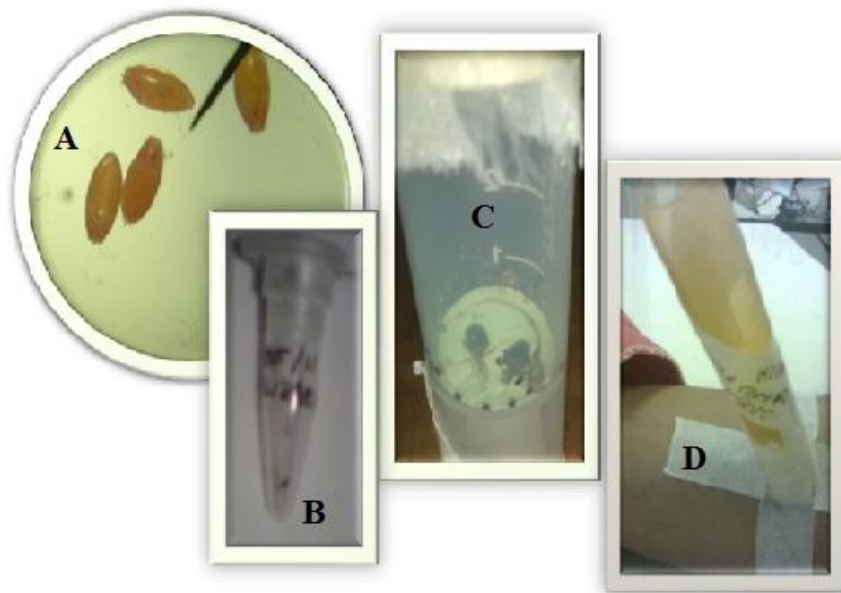


Figura 17. A) Obtención de triatomines estériles, A) Elección de huevos de *T. barberi*, B) Se colocaron en microtubos de polipropileno de fondo cónico de 1.5 mL, C) Una vez que los triatomines eclosionaron, D) Se alimentaron de 1 a 2 veces por semana.

6.5 Interacción de *T. cruzi*-endosimbionte in vivo

Se seleccionó un lote de huevos de *T. barberi* al azar y al igual que en el caso anterior estos se colocaron en microtubos de polipropileno de fondo cónico de 1.5 mL y se mantuvieron en la estufa a una temperatura de 27-31 °C, una humedad de 60-70%; una vez eclosionados se alimentaron de sangre de ratones CD-1 infectados previamente con *T. cruzi*, la alimentación con ratones infectados se llevó a cabo en tres ocasiones: al 1°, 3° y 13er día, se obtuvo el promedio del volumen de sangre ingerido y el número de parásitos ingeridos este último por medio de conteo en cámara de Neubauer. Los triatomines se pesaron antes de la alimentación y después de un periodo de una hora se volvieron a pesar para conocer la cantidad de parásitos ingeridos. Los triatomines se incubaron a 28° C durante cinco meses a los cuales cada tercer o cuarto día se presionó el abdomen provocando su defecación y

tomando 10 μ L de heces los cuales se colocaron sobre una cámara de Neubauer para contar el número de tripanosomas, (Figura 18).

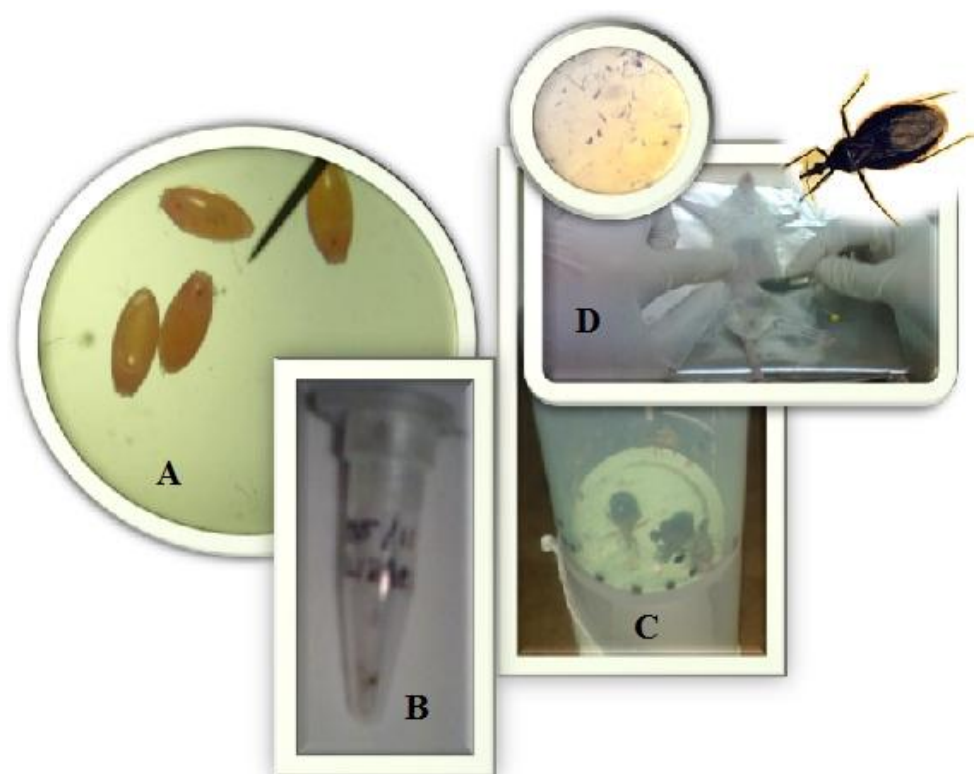


Figura 18. Obtención de triatominos con *T. cruzi*, A) Elección de huevos de *T. barberi*, B) Se colocaron en microtubos de polipropileno de fondo cónico de 1.5 mL, C) Una vez que los triatominos eclosionan, D) Se alimentaron 3 veces con ratones CD-1 infectados con el parásito *T. cruzi*.

6.6 Interacción de *T. cruzi*-endosimbionte *in vitro*

Para poder estudiar la interacción de *T. cruzi* con los endosimbiontes fue necesario cultivar en medios adecuados al parásito y al endosimbionte. Para ello primeramente los tripanosomas se sembraron en medio de cultivo LIT en condiciones estériles y se registró su crecimiento cada tercer día de la siguiente manera: mediante micropipetas se tomaron 10 μ L de cultivo los cuales se colocaron en una cámara de Neubauer para contar el número de parásitos por mililitro de cultivo. Cuando los parásitos se encontraron en fase exponencial se tomo una alícuota de entre 10 y 100 μ L la cual se diluyó para tener suspensiones de 1×10^4 , 1×10^2 , 1×10^{-2} y 1×10^{-4} parásitos por 10 mL.

Los endosimbiontes se cultivaron en caldo AN, se tomó una alícuota de 1mL y se hicieron diluciones 1/100; 1/1000; 1/10000 y 1/100000, se sembró en medio de cultivo AN y se calculo la cantidad de bacterias/mL, cabe hacer mención que el conteo de bacterias se hizo posterior a la incubación de los medios de cultivo de AN y una vez obtenida la proporción que se iba a requerir se volvió a repetir el crecimiento pero ahora en medio LIT a 28°C.

La interacción se efectuó sembrando en medio de cultivo LIT tanto los endosimbiontes como los parásitos en las proporciones antes mencionadas: cada una de las concentraciones arriba descritas del parásito contra las diferentes concentraciones del endosimbionte se incubaron a 28°C durante 1 semana. Los parásitos fueron contados en cámara de Neubauer durante seis días hasta que la curva de crecimiento de *T. cruzi* llego a la fase estacionaria.

VII. RESULTADOS

*7.1 Aislamiento de los endosimbiontes a partir de las fases ninfas y adultos de *Triatoma barberi**

Con la finalidad de conocer si en el intestino de *T. barberi* había la presencia de endosimbiontes, se utilizaron 5 ejemplares de cada uno de los estadios de desarrollo incluyendo la fase adulta. De 36 ejemplares utilizados se aislaron 17 endosimbiontes, que a continuación se presentan en la siguiente tabla.

Tabla 1. Número de aislados de endosimbiontes de cada una de las fases ninfales.

Estadio	No. De ejemplares Utilizados	No. Aislados
1°.	5	5
2do.	5	0
3er.	5	1
4to.	5	3
5to.	5	3
A ♂	5	3
A ♀	6	2
Total	36	17 (47.2%)

Los resultados demuestran que de los 36 ejemplares de triatominos utilizados para aislamiento de endosimbiontes, solo en 17 de ellos se pudo aislar endosimbiontes lo que equivale al 47.2% del total de triatominos estudiados

7.2 Identificación de los endosimbiontes

Con el propósito de identificar los endosimbiontes aislados del intestino de *T. barberi* se describió la morfología macroscópica de cada uno de ellos. El resultado obtenido de 13 de ellos fue: un color blanco, borde entero, elevación convexa y un tamaño de 1mm. Los 4 endosimbiontes restantes presentaron un color amarillo, borde entero, elevación convexa y un tamaño de entre 3-5mm. Lo cual nos indica que las características morfológicas no son suficientes para la identificación de los endosimbiontes, por tal motivo también se realizó la identificación microscópica.

Tabla 2. Descripción morfológica de los endosimbiontes aislados a partir del intestino de *T. barberi*.

Estadio	No.	Nomenclatura	Descripción morfológica (color, borde, elevación, tamaño)
1ero.	1	TbN1.1	Blanco, Entero, Convexa, 1mm
	2	TbN1.2	Blanco, Entero, Convexa, 1mm
	3	TbN1.3	Blanco, Entero, Convexa, 1mm
	4	TbN1.4	Blanco, Entero, Convexa, 1mm
	5	TbN1.5	Blanco, Entero, Convexa, 1mm
3ero.	6	TbN 3.5	Blanco, Entero, Convexa, 1mm
4to.	7	TbN4.3	Blanco, Entero, Convexa, 1mm
	8	TbN4.4	Blanco, Entero, Convexa, 1mm

	9	TbN4.5	Amarillo, Entero, Convexa, 1mm
5to.	10	TbN5.1	Blanco, Entero, Convexa, 1mm
	11	TbN5.2	Blanco, Entero, Convexa, 1mm
	12	TbN5.3	Amarillo, Entero, Convexa, 2mm
Adultos ♂	13	TbM02	Amarillo, Entero, Convexa, 3mm
	14	TbM04	Blanco, Entero, Convexa, 1mm
	15	TbM05	Blanco, Entero, Convexa, 1mm
Adultos ♀	16	TbH04	Blanco, Entero, Convexa, 3mm
	17	TbH05	Amarillo, Entero, Convexa, 5mm

7.3 Características microscópicas y prueba de hemolisis

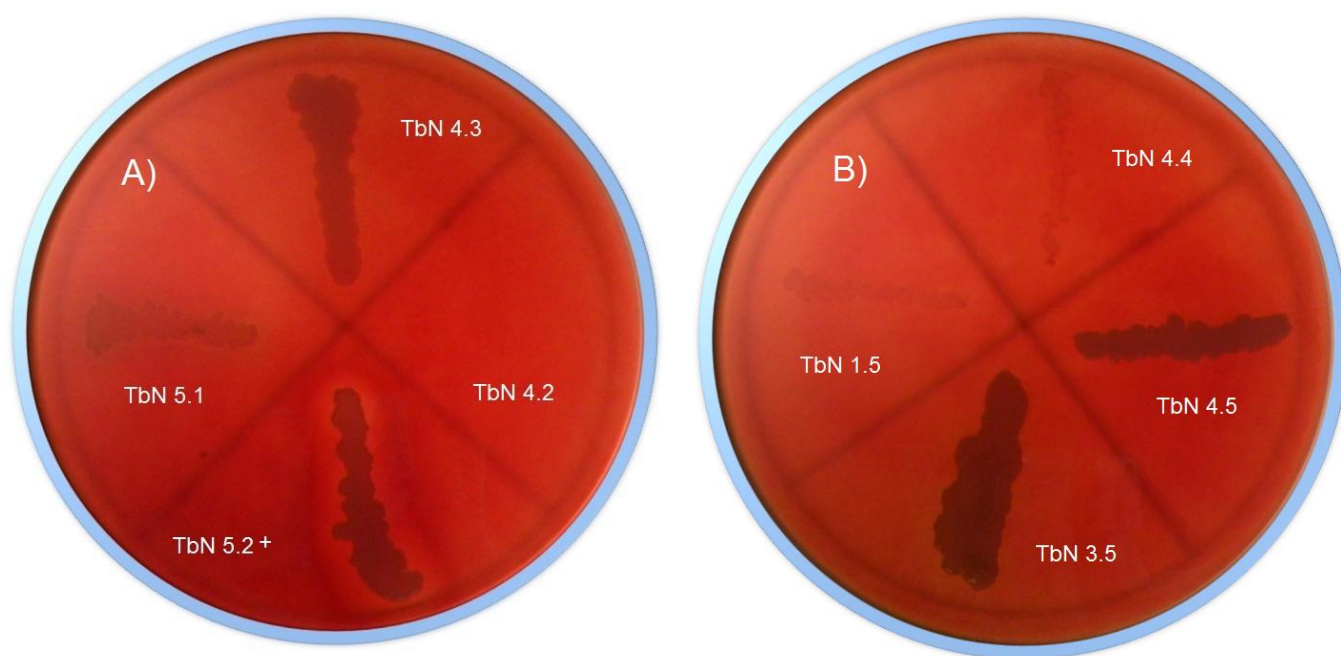
El resultado anterior indica las características morfológicas de cada uno de los endosimbiontes aislados, sin embargo no muestran de manera específica la especie a la que pertenecen, es por ello que se realizó la identificación microscópica para completar la identificación de los endosimbiontes aislados del intestino de *T. barberi*.

Tabla 3. Características microscópicas y prueba de hemólisis.

Estadio	Tinción de GRAM	Prueba de Hemolisis
1° (TbN1.1)	Bacilos G + curvos	-
1° (TbN1.2)	Bacilos G+ curvos	-
1° (TbN1.3)	Bacilos G+ curvos	-
1° (TbN1.4)	Bacilos G+ curvos	-
1° (TbN1.5)	Bacilos G+ curvos	-
3° (TbN3.5)	Cocos G+	-
4° (TbN4.2)	Cocos G+	-
4° (TbN4.3)	Cocos G-	-
4° (TbN4.4)	Bacilos cortos G-	-
4° (TbN4.5)	Cocos G+	-
5° (TbN5.1)	Cocos G+	-
5° (TbN5.2)	Cocos G+	+

5° (TbN5.3)	Cocos G+	-
A ♂ (TbM02)	Cocos G-	-
A ♂ (TbMA)	Cocos G-	-
A ♂ (TbMB)	Bacilos G+	-
A ♀ (TbH04)	Cocos G+	+
A ♀ (TbH05)	Cocos G+	-

La prueba de hemólisis fue realizada en medio de cultivo agar sangre y se hizo a los 17 endosimbiontes aislados y solo dos resultaron positivos, TbN5.2 y TbH04, (Figura 19).



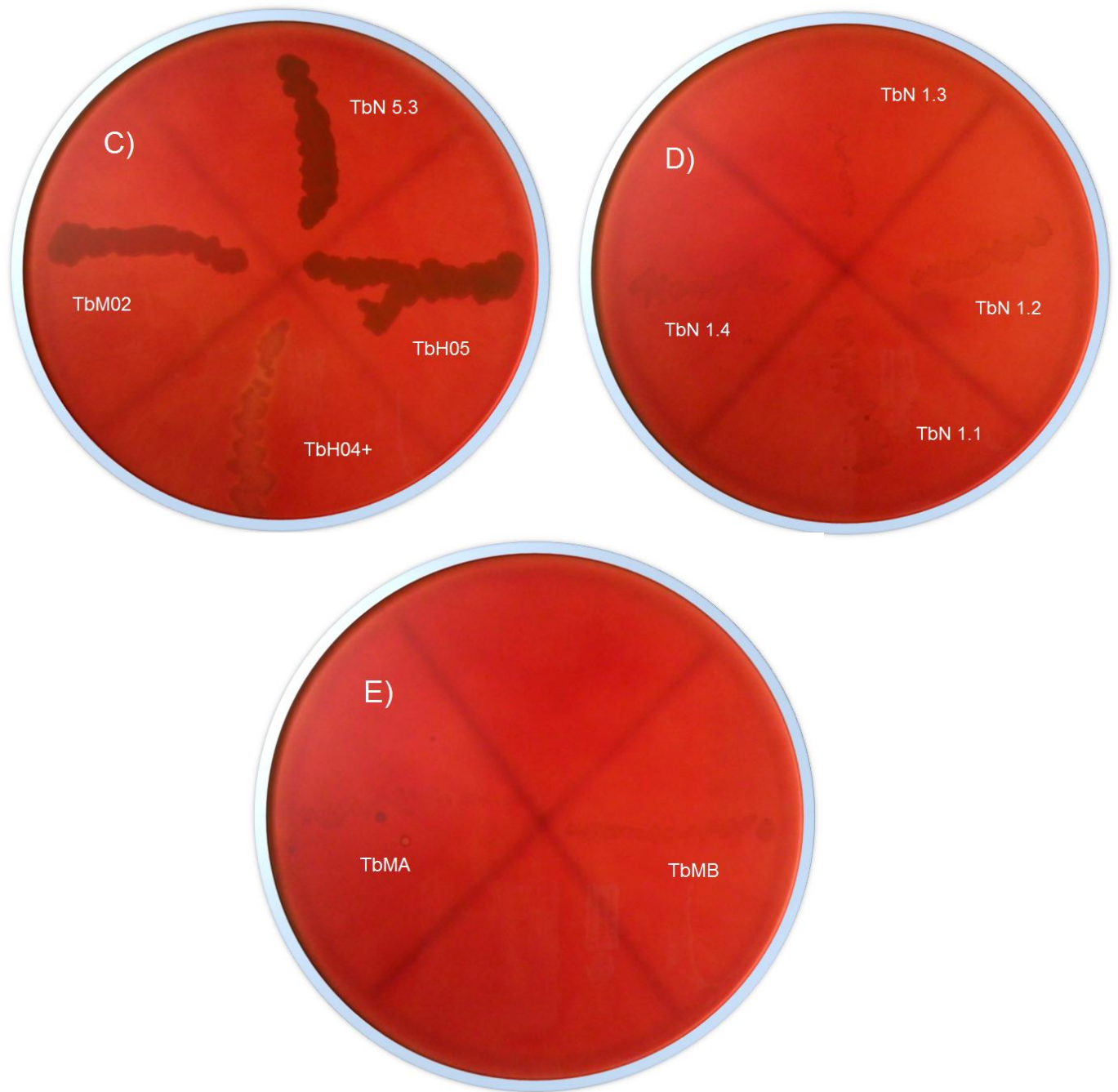


Figura 19. Prueba de hemolisis. A) se puede observar que TbN 5. 2, B) los cuatro endosimbiontes de esta placa resultaron negativos. C) TbH04 es el segundo endosimbionte que resulto positivo a la hemolisis. D,E) Los seis endosimbiontes restantes resultaron también negativos a esta prueba.

7.4 Identificación mediante pruebas bioquímicas

Con el objetivo de identificar de manera específica cada uno de los endosimbiontes aislados del intestino de *T. barberi*, a cada uno de ellos se les realizaron pruebas bioquímicas en un laboratorio especializado para su identificación.

Tabla 4. Identificación por medio de pruebas bioquímicas de los endosimbiontes aislados.

Estadio	Nombre de las bacterias aisladas
1° (TbN1.1)	<i>Acinetobacter iwoffii</i>
1° (TbN1.2)	<i>Chryseobacterium (F.) meningosepticum</i>
1° (TbN1.3)	<i>Staphylococcus auricularis</i>
1° (TbN1.4)	<i>Streptococcus mitis/oralis</i>
1° (TbN1.5)	<i>Staphylococcus aureus</i>
2°	*
2°	*
2°	*
2°	*
2°	*
3°	*
3°	*
3°	*
3°	*
3° (TbN3.5)	<i>Acinetobacter iwoffii</i>
4°	*
4°	*
4° (TbN4.3)	<i>Acinetobacter iwoffii</i>
4° (TbN4.4)	ND
4° (TbN4.5)	<i>Corynebacterium sp</i>
5° (TbN5.1)	<i>Lactobacillus sp</i>
5° (TbN5.2)	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>
5° (TbN5.3)	<i>Mycrococcus y especies relacionadas</i>
5°	*
5°	*
A ♂	*
A ♂ (TbM02)	<i>Acinobacter iwoffii</i>
A ♂	*
A ♂ (TbMA)	<i>Streptococcus sanguis</i>
A ♂ (TbMB)	<i>Streptococcus intermedius</i>
A ♀	*

A ♀	*
A ♀	*
A ♀ (TbH04)	<i>Streptococcus equinus</i>
A ♀ (TbH05)	<i>Micrococcus</i> y especies relacionadas
A ♀	*

ND: No determinada; * No hubo crecimiento debido a que no se aislaron. En la tabla no. 4 Se muestra que cuatro de los 17 endosimbiontes aislados corresponden a *Acinobacter iwoffi* (23.5%); igualmente cuatro pertenecen al género *Streptococcus* y tres al de *Staphylococcus*.

7. 5 Obtención de triatominos libres de endosimbiontes

7.5.1 Tiempo de desarrollo de *Triatoma barberi*

Con el fin de saber, si la presencia de endosimbiontes afecta directamente en el desarrollo del triatomo a partir del momento de su eclosión, se midió el tiempo que tardaban en llegar a la etapa adulta los triatomos estériles y no estériles. Se utilizaron 20 triatomos estériles y 29 no estériles, el porcentaje de huevos eclosionados fue del 100% para ambos grupos sin embargo, en el grupo que contenía a los triatomos estériles el tiempo que tardaron para cambiar de estadio fue mayor a los triatomos no estériles, además una vez que cambiaron al tercer estadio, no hubo ningún otro cambio aparente en los endosimbiontes estériles, caso contrario en los no estériles que el 100% llegó hasta el quinto estadio y en menor tiempo (Tabla 5).

Tabla 5. Tiempo de desarrollo de cada fase de triatomos con y sin endosimbiontes.

	Estériles	No estériles
Tiempo de desarrollo promedio de cada una de las fases de triatomos en días		
1° a 2°	47 días	35 días
2° a 3°	129 días	40 días
3° a 4°	*	42 días
4° a 5°	*	50 días

*: Etapas del desarrollo que ya no se presentaron debido a que ya no pudieron mudar.

Los triatominos desarrollados libres de endosimbiontes retrasan su tiempo para cambiar entre cada fase y también se puede observar que no alcanzan más allá del tercer estadio; incluso cuando pasan de primer a segundo estadio tardan un tiempo similar al de los triatominos no estériles es decir en presencia de endosimbiontes, pero cuando pasan del segundo al tercer estadio el tiempo se retrasa casi tres veces (129 días). En cambio los triatominos con endosimbiontes tardan entre 35 y 50 días entre una y otra fase de desarrollo.

El porcentaje de desarrollo de los estadios de los triatominos se muestra en la tabla no. 6 del total de triatominos estériles, el 60% cambio de primer a segundo estadio, el 25% de los triatominos cambió de segundo al tercer estadio, a partir de ese momento ninguno de los triatominos estériles volvió a cambiar de estadio. En cuanto a los triatominos no estériles el 100% paso de primer a segundo estadio, el 100% paso de segundo al tercer estadio, el 24 % de tercer al cuarto estadio y por último el 3% de cuarto a quinto estadio, existiendo un mayor porcentaje de cambio de estadio en los triatominos que no se encontraban en condiciones de esterilidad.

Tabla 6. Porcentaje de desarrollo de triatominos estériles y no estériles.

No. De triatominos	Esteriles		No esteriles	
% eclosión	20/20	100%	29/29	100%
% de <i>T. barberi</i> en los estadios				
1° a 2°	12/20	60%	29 /29	100%
2° a 3°	5/20	25%	29/29	100%
3° a 4°	-----		7/29	24%
4° a 5°	-----		3/29	10%

7.6 Interacción de *Trypanosoma cruzi*- endosimbionte in vivo

Con la intención de conocer cuál es la interacción entre el triatomo, los endosimbiontes y el *T. cruzi* se realizó una prueba en la que se monitoreaba la ingesta de sangre del triatomo en condiciones de esterilidad y no esterilidad, así como el porcentaje de infección al final de la prueba. En las tablas 7 y 8 se observa que los triatomos estériles ingirieron una menor cantidad de sangre, por lo tanto también una menor cantidad de parásitos, que los triatomos no estériles. En cuanto al porcentaje de infección los triatomos estériles tuvieron un 0% de infección, mientras que los no estériles un 8.33%.

Tabla 7. Volumen promedio de sangre y No. de parásitos ingeridos por triatomos estériles y no estériles.

	Estériles	No Estériles
Vol \bar{x}. Sangre ingerida	0.348 μ l/triatomo	3.67 μ l/triatomo
No. Parásitos ingeridos	80.04 tripomastigotes	844.1 tripomastigotes
Vol. \bar{x} . Sangre 3er. Día	0.352 μ l/triatomo	9.90 μ l/triatomo
Vol\bar{x} Sangre 13vo. Día	0.696 μ l/triatomo	24.75 μ l/triatomo
% de Triatomos infectados	0/5	1/12 8.33%

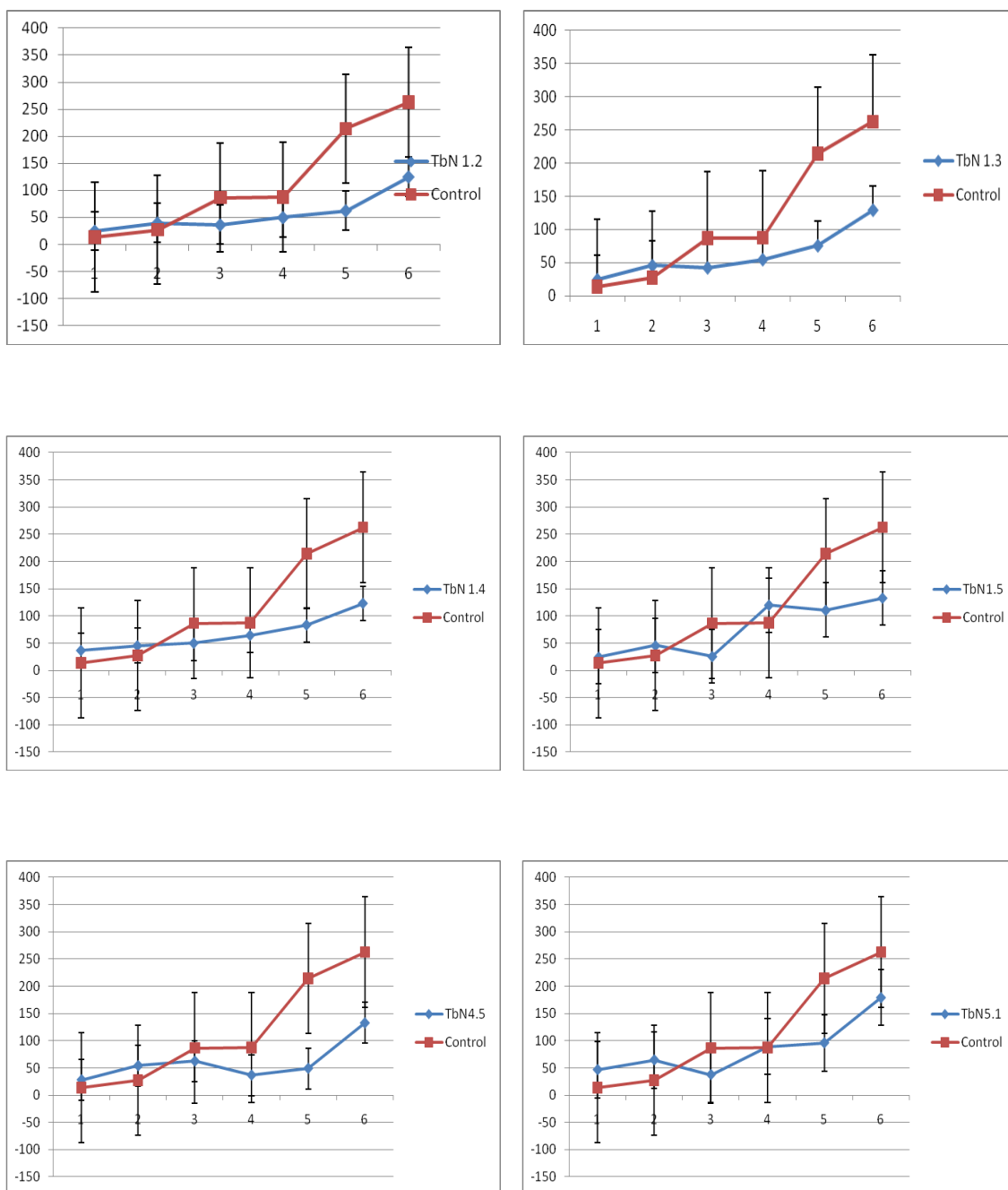
Tabla 8. Infección de triatominos con *T. cruzi* en presencia (NE) o ausencia (E) de endosimbiontes.

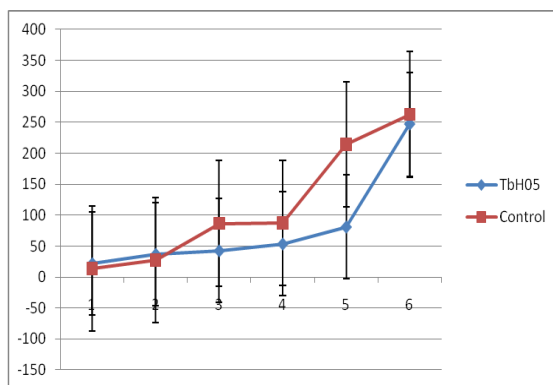
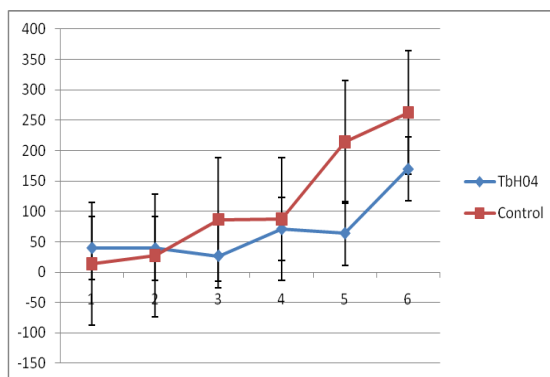
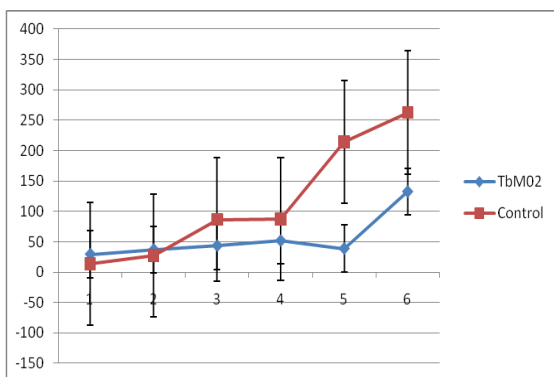
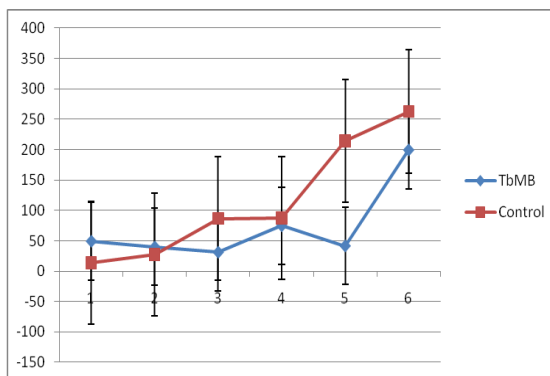
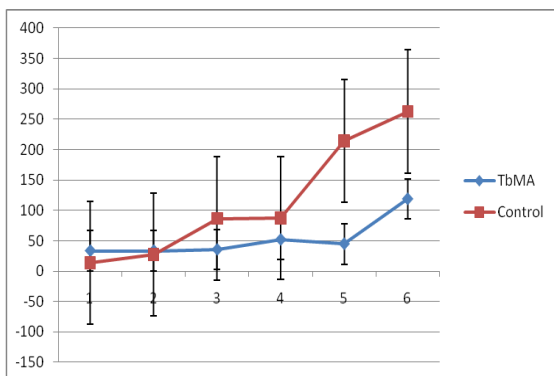
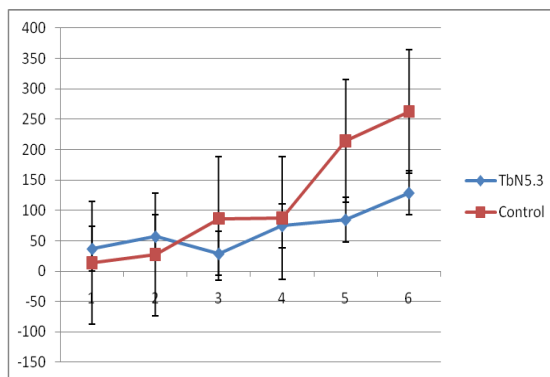
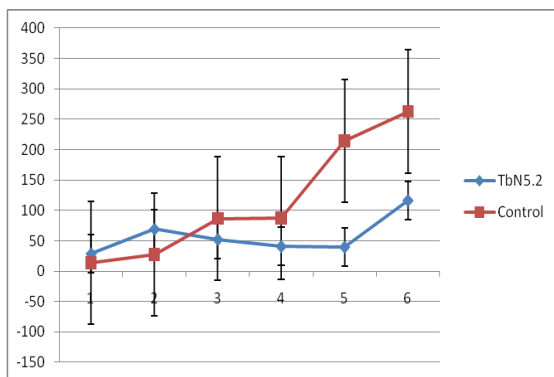
Fase	Estéril (E) %		No estéril (NE) %	
2	0/5	0%	2/24	8.33%
3	*		19/24	79.16%
4	*		3/24	12.5%
5	*		**	
Macho	*		**	
Hembra	*		**	

NE- Con endosimbiontes; E- Sin endosimbiontes. * No se obtuvo infección de parásitos en ninguna fase de desarrollo. ** Etapas del desarrollo que ya no se presentaron debido a que ya no pudieron mudar.

7.7 Interacción *Trypanosoma cruzi*- endosimbionte *in vitro*

Tabla 9. Cinética de cuantificación de *Trypanosomas* en presencia o ausencia de cada endosimbionte aislados (No. de tripanosomas X10⁴/mL de cultivo)





Control: cultivo de T. cruzi en ausencia de endosimbiontes.

VIII. DISCUSIÓN

Se sabe que *T. cruzi* tiene la capacidad de adaptarse al ambiente del intestino de los triatominos, así que a partir del intestino de *T. barberi* se realizó el aislamiento de 17 endosimbiontes de un total de 36 triatominos, que incluyeron las cinco fases ninfales y el estado adulto; las especies de endosimbiontes varían dependiendo del tipo de triatomo. Según Ishikawa muchas especies de insectos contienen bacterias intracelulares (conocidas como endosimbiontes) que son transmitidas por generaciones. Huerta-Núñez también reporta el aislamiento de endosimbiontes de *T. pallidipennis* y *T. longipennis* a partir de glándulas salivales y ovarios en caso de tratarse de hembras. En estudios microscópicos de tejidos de insectos F. Blockmann observó diversas bacterias que sólo con recientes enfoques moleculares han podido ser analizadas. Muchas de estas bacterias son benéficas para los insectos y se considera que se encuentran en vías de convertirse en organelos celulares.

Para el presente trabajo de investigación se obtuvieron los endosimbiontes puros y se realizó la identificación bioquímica en un laboratorio especializado, los resultados que arrojó la investigación fue de un total de 16 bacterias; entre las cuales podemos encontrar algunas bacterias del género *Acinetobacter iwoffi*, Sramova reporta que esta bacteria ha sido aislada frecuentemente a partir de artrópodos (79, 80), y Muratoglu al igual reporta haberla aislado de un escarabajo, esto concuerda con los resultados obtenidos a partir de insectos. (81). Otra de la bacterias que fue identificada fue *Chryseobacterium (F.) meningosepticum*, Osei- Poku aisla bacterias del género *Chryseobacterium* a partir del mosquito de la fiebre amarilla *Aedes Aegypti* (82), es importante mencionar que ambos insectos son hematófagos por lo que se podría suponer que comparten algún tipo de microbiota intestinal.

Un resultado interesante fue el hecho de haber identificado a simbiosis como *Staphylococcus haemolyticus*, *Acinetobacter iwoffi*, *Mycrococcus* y especies relacionadas y *Staphylococcus aureus*, las cuales son bacterias que fueron aisladas del intestino de *T. barberi*. Chaverri reporta haber aislado e identificado estas mismas bacterias del intestino

de un murciélago hematófago (*Desmodus rotundus*) (80, 83), si bien el murciélago no es un insecto, si es estrictamente hematófago lo cual podría tener relación con los resultados obtenidos en la presente investigación, siendo los triatominos exclusivamente hematófagos. Lo anterior también podría señalar que la microbiota de los triatominos fue adquirida por la picadura sobre murciélagos, reforzando que la especie *T. barberi* con la que se cuenta fue obtenida por primera vez en el campo.

Otras bacterias que fueron identificadas como *Streptococcus oralis*, *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus equinus*, *Streptococcus intermedius*, *Staphylococcus haemolyticus*, y *Staphylococcus aureus*, no han sido reportadas actualmente en aislamientos de triatominos o de insectos sin embargo algunas de ellas provienen del ser humano lo cual permitiría entender que se adquirieron al chupar sangre de personas.

Es importante estudiar la relación que tienen estos endosimbiontes con el triatomo para saber si causan algún efecto benéfico o perjudicial sobre el mismo, así como saber si forman parte importante de su desarrollo o nutrición, otro punto importante para conocer más a fondo esta relación es el conocer de donde se obtienen estos endosimbiontes, de acuerdo a Durvasula , Beard y Dash, en el caso de *Rhodnius prolixus* los endosimbiontes se adquieren por coprofagia (84, 85) lo que concuerda con los resultados obtenidos en esta investigación debido que al mantener los huevos de triatomo estériles antes de eclosionar y mantenerlos de esta manera, al realizar la disección del intestino, no fue posible aislar endosimbiontes, caso contrario en los triatominos que no fueron esterilizados ni mantenidos en condiciones estériles, se puede sugerir que los triatominos que no fueron esterilizados, adquirieron los endosimbiontes en el momento de eclosionar o bien, al estar en contacto con las heces del medio en el que se desarrollaron. Después de eclosionar los triatominos que se mantuvieron estériles no tuvieron un desarrollo normal, únicamente el 25% del grupo se desarrollo hasta tercer estadio, y permaneció en este mismo hasta su muerte, mientras que el grupo de triatominos no estériles en el mismo estadio se desarrollo en un 100%, estos resultados corroboran lo reportado por Huerta-Núñez, quien sugiere que los endosimbiontes juegan un papel importante en el desarrollo del triatomo y que los triatominos libres de endosimbiontes no logran llevar a cabo su desarrollo normal (86).

En la actualidad no existen investigaciones que relacionen directamente al *T. cruzi* con los endosimbiontes aislados del intestino de *T. barberi*, para comprender esta relación en la presente investigación se realizaron experimentos *in vivo* e *in vitro*. En el ensayo *in vivo* las diferencias entre los triatomino estériles y no estériles fueron evidentes; en los no estériles el volumen promedio de sangre fue mayor al de las estériles, así como el número de parásitos ingeridos, en este caso fue menor para las estériles, el promedio de infección en la estériles fue de 0% (0/5) y de 8.33% (1/12) para las no estériles, esto sugiere que los endosimbiontes pueden jugar un papel importante tanto en la nutrición del triatomino como en el grado de infección por *T. cruzi*. Esto lo refuerza el experimento que se realizó *in vitro* donde se incubaron cada uno de los endosimbiontes con *T. cruzi*, en donde no se observó ninguna diferencia significativa en el conteo parasitario lo que sugiere que los endosimbiontes al ser una microbiota intestinal normal en el triatomino, no afectan el desarrollo del parásito en forma negativa.

Al examinar la interacción *T. cruzi* con endosimbiontes *in vitro* se observó que el crecimiento del parásito se ve afectado por la presencia de endosimbiontes probablemente por una cuestión de espacio o para evitar que el triatomino tenga sobre población de *T. cruzi* por lo que no es indispensable su presencia para la colonización de *T. cruzi*.

IX. CONCLUSIONES

- En el intestino de *T. barberi* se encuentran endosimbiontes de tipo bacteriano indispensables para completar su desarrollo.
- La mayor parte de los endosimbiontes aislados son microorganismos Gram positivos
- Estos endosimbiontes se adquieren por coprofagia, una vez que se mantienen en forma estéril no podrán adquirirlos lo que se ve repercutido en el desarrollo de los triatominos.
- El endosimbionte afecta el desarrollo del triatomino, su ausencia impide su desarrollo hasta la fase adulta, así como la ingesta de sangre.
- La presencia de endosimbiontes no es indispensable para el desarrollo de *T. cruzi* pero sí lo es para el triatomino.

Consideraciones éticas

Dado que se trabajó con materiales biológicos, particularmente ratones y triatominos la manipulación de los mismos se realizó de acuerdo a las recomendaciones de la comisión de bioética del ICSa después de que el protocolo fue revisado por la misma. La eliminación de ambos organismos se hizo en bolsas amarillas para productos RPBI que se depositó en el cuarto frío del ICSa. Los medios de cultivo antes de su eliminación se esterilizaron en autoclave y posteriormente se eliminaron, si eran sólidos en bolsas rojas de RPBI para su posterior almacenamiento en cuarto frío y si fue líquido en recipientes se almacenaron para que posteriormente se trasladaran mediante vehículos especiales para su eliminación. Todos los experimentos con material biológico siguieron las recomendaciones de acuerdo a la ley general de Salud en materia de investigación mediante experimentación con materiales biológicos siendo un proyecto de bajo riesgo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Martínez-Ibarra JA, Barcenás-Ortega NM, Noguera-Torres B, Alejandre-Aguilar R, Lino Rodríguez M, Magallon-Gastelum E, et al. Role of two *Triatoma* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) species in the transmission of *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) to man in the west coast of Mexico. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2001;96(2):141-4. Epub 2001/04/04.
2. Salomon CJ. First century of Chagas' disease: an overview on novel approaches to nifurtimox and benznidazole delivery systems. *J Pharm Sci*. 2012;101(3):888-94.
3. Jiménez-Coello M, Acosta-Viana KY, Guzmán-Marín E, Gómez-Ríos A, Ortega-Pacheco A. Epidemiological Survey of *Trypanosoma cruzi* Infection in Domestic Owned Cats from the Tropical Southeast of Mexico. *Zoonoses Public Health*. 2012;2:102-9.
4. Dotson EM, Plikaytis B, Shinnick TM, Durvasula RV, Beard CB. Transformation of *Rhodococcus rhodnii*, a symbiont of the Chagas disease vector *Rhodnius prolixus*, with integrative elements of the L1 mycobacteriophage. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*. 2003;3(2):103-9. Epub 2003/06/18.
5. Schofield CJ. Biosystematics and evolution of the Triatominae. *Cadernos de saúde publica / Ministerio da Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública*. 2000;16 Suppl 2:89-92. Epub 2000/12/19.
6. López-Ordóñez T PF, Tun-Ku E, Ferrandis I, Ramsey J. M. Contribuciones de la genética y la proteómica al estudio de la enfermedad de Chagas. *Salud Pública de México*. 2009;51(3):13.
7. Hill CA, Kafatos FC, Stansfield SK, Collins FH. Arthropod-borne diseases: vector control in the genomics era. *Nat Rev Microbiol*. 2005;3(3):262-8.
8. Salud OMdl. New Research for innovative vector control. Meeting: Vector control. 2008; Available from: <http://www.who.int>.
9. Bank W. World Development Report Investing in Health. Press OU, editor: New York; 1993.

10. Javier L-AF. Quimioterapia de las infecciones producidas por *Trypanosoma cruzi*. salud pública de méxico. 1997;39(5):8.
11. Moncayo A GF, Stein C. CARGA MUNDIAL DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS EN 2000. Universidad de los Andes, Bogotá, Colombia. Epidemiología y carga de morbilidad, Organización Mundial de la Salud, Ginebra., 2002.
12. Souza P. E. A RMOC, Rocha-Vieira E, Menezes C. A. S, Chaves A. C. L, Gollob K. J, Dutra W.O. Monocytes from Patients with Indeterminate and Cardiac Forms of Chagas' Disease Display Distinct Phenotypic and Functional Characteristics Associated with Morbidity. INFECTION AND IMMUNITY. 2004;72(9):8.
13. BECERRIL-FLORES M.A R-FE, IMBERT-PALAFOX J.L, GÓMEZ-GÓMEZ J.V, FIGUEROA-GUTIÉRREZ A.H. Human Infection and Risk of Transmission of Chagas Disease in Hidalgo State, México. The American Society of Tropical Medicine and Hygiene. 2007;76(2):5.
14. Maldonado-Rodriguez A. Identificación Molecular de *Trypanosoma cruzi* en triatomíneos de tres ecotopos del estado de Colima Colima Universidad de Colima 2000.
15. CHAGAS AdLceMdCE-. ENFERMEDAD DE CHAGAS - MAZZA. Argentina: www.alcha.org.ar; 2000.
16. Salvador F, Molina I, Sulleiro E, Burgos J, Curran A, Eynde EV, et al. Tropical Diseases Screening in Immigrant Patients with Human Immunodeficiency Virus Infection in Spain. Am J Trop Med Hyg. 2013;18:18.
17. Townsend Peterson A S-CV, Ben Beard C, Ramsey aJM. Ecologic Niche Modeling and Potential Reservoirs for Chagas Disease, Mexico. Emerging Infectious Diseases. 2002;8(7):6.
18. Guzman-Bracho C. Epidemiology of Chagas disease in Mexico: an update. Trends in parasitology. 2001;17(8):372-6. Epub 2001/11/01.
19. Werner. B GIH, Lara M. I. J, Morales L. J, Casas del Valle P. M, Hauck I. N, Venegas A. M. SM, Peric J. S, Hidalgo M. T, Alfaro I. Z. PREVENCIÓN Y CONTROL DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS. Guías Clínicas de la Enfermedad de Chagas. Subsecretaría de Salud Pública División Prevención y Control de Enfermedades Depto Enfermedades Transmisibles Unidad de Enfermedades Emergentes y Reemergentes. 2006.
20. E. D. Update on Chagas' disease in Mexico. salud pública de méxico. 1999;41(4):6.

21. Espinoza-Gomez F, Maldonado-Rodriguez A, Coll-Cardenas R, Hernandez-Suarez CM, Fernandez-Salas I. Presence of triatominae (Hemiptera, Reduviidae) and risk of transmission of Chagas disease in Colima, Mexico. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2002;97(1):25-30. Epub 2002/05/07.
22. Vidal-Acosta V I-BS, Martínez-Campos C. Infección natural de chinches Triatominae con *Trypanosoma cruzi* asociadas a la vivienda humana en México. *salud pública de méxico*. 2000;42(6):8.
23. Azambuja PG, E. S. Ratcliffe, N. A. Gut microbiota and parasite transmission by insect vectors. *Trends in parasitology*. 2005;21(12):568-72. Epub 2005-10-18.
24. Dillon RJD, V. M. The gut bacteria of insects: nonpathogenic interactions. *Annual review of entomology*. 2004;49:71-92. Epub 2003/12/04.
25. Riehle MA J-LM. Using bacteria to express and display antiparasite molecules in mosquitoes: current and future strategies *Insect Biochem Mol Biol*. 2005;35:8.
26. Beard CB, Durvasula RV, Richards FF. Bacterial symbiosis in arthropods and the control of disease transmission. *Emerg Infect Dis*. 1998;4(4):581-91.
27. Eichler S SG. Development of symbionts in triatomine bugs and the effects of infections with trypanosomatids. *Exp Parasitol*. 2002;100(10):17.
28. Beard CBDEPPESC-RCDR. Bacterial symbiosis and paratransgenic control of vector-borne Chagas disease *Int J Parasitol*. 2001;31:6.
29. Beard CBC-RCDR. Bacterial symbionts of the triatomine and their potential use in control of Chagas disease transmission. *Annual review of entomology*. 202;47 18.
30. Garrido F CJ, Rivas L, Montiel L. 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; 2007.
31. Segura EL E-MA. Epidemiología de la enfermedad de Chagas en el estado de Veracruz *salud pública de méxico*. 2005;47(3):201-8.
32. Benchimol Barbosa PR. The oral transmission of Chagas' disease: an acute form of infection responsible for regional outbreaks. *International journal of cardiology*. 2006;112(1):132-3. Epub 2006/04/08.
33. JL M. Síntesis de la Guía de Diagnóstico y Tratamiento de Pacientes con ENFERMEDAD DE CHAGAS. Buenos Aires, Argentina 2006.

34. JC P. Evolución del conocimiento epidemiológico y situación epidemiológica actual 1er Congreso Virtual de Cardiología; Brasil Fundacion Oswaldo Cruz 2000.
35. Werner A. B HGI, Jercic M.I, Jofré M. L, Muñoz C.P, Noemí H. I, San Martín A.M, Sapunar P. J, Torres H. M Zulantay A. I. Parte III. Enfermedad de Chagas en donantes de banco de sangre. Rev Chil Infect. 2008;25(4):3.
36. Baruch W.A GIH, Jercic M.I, Morales L.J, Muñoz P, Hauk I.N, San Martín A.M, Sapunar J.P, Torres M.H, Zulantay I.A Guías Clínicas de la Enfermedad de Chagas2006:[48 p.].
37. Andrade A.L ZF, Martelli C.M. An Epidemiological Approach to Study Congenital Chagas' Disease Método Epidemiológico na Investigação da Infecção Congênita pelo Trypanosoma cruzi. Cad Saúde Públ. 1994;10(2):6.
38. J.C P-D. Doença de Chagas no Século XXI. In: (FIOCRUZ) CdPRR, editor.1997.
39. Cavalier-Smith T. Only six kingdoms of life. Proceedings Biological sciences / The Royal Society. 2004;271(1545):1251-62. Epub 2004/08/13.
40. Adl SM, Simpson AG, Lane CE, Lukes J, Bass D, Bowser SS, et al. The revised classification of eukaryotes. The Journal of eukaryotic microbiology. 2012;59(5):429-93. Epub 2012/10/02.
41. Cavalier-Smith T. Kingdoms Protozoa and Chromista and the eozoan root of the eukaryotic tree. Biology letters. 2010;6(3):342-5. Epub 2009/12/25.
42. García ES GM, Azambuja P. Biological Factors Involving Trypanosoma cruzi Life Cycle in the Invertebrate Vector, Rhodnius prolixus. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. 1999;94:3213.
43. Kollien A SG. The Development of Trypanosoma cruzi in Triatominae. Parasitology Today. 2000;16(9):6.
44. Fieck A, Hurwitz I, Kang AS, Durvasula R. Trypanosoma cruzi: synergistic cytotoxicity of multiple amphipathic anti-microbial peptides to T. cruzi and potential bacterial hosts. Exp Parasitol. 2010;125(4):342-7.
45. Roellig DM, Savage MY, Fujita AW, Barnabe C, Tibayrenc M, Steurer FJ, et al. Genetic Variation and Exchange in Trypanosoma cruzi Isolates from the United States. PLoS One. 2013;8(2):14.

46. Guzmán-Marín E Z-CJE, Acosta-Viana K.Y. Rosado-Barrera M.E. Importancia de la caracterización de cepas de *Trypanosoma cruzi*. *Rev Biomed*. 1999;10:7.
47. RC. B-FMR. In: Hill MG, editor. *Parasitología Médica de las moléculas a la enfermedad*. Mexico2004. p. 300.
48. López E. N yDJR. Infectividad en ratón de las formas de *Trypanosoma cruzi* diferenciadas por primocultivo en medio LIT. *Facultad de Ciencias Universidad de Los Andes Mérida Venezuela*. 1999;5(14):4.
49. V. HLyB. Immune Response to South American Trypanosomiasis and its Relationship to Chagas' Disease. *British Medical Bulletin* 1985;41(2):5.
50. García ESAP. Development and Interactions of *Trypanosoma cruzi* whithing the Insect vector *Parasitology today* Río de Janeiro. 1991;7(9):3.
51. Kollien AHS, G. A. The development of *Trypanosoma cruzi* in triatominae. *Parasitol Today*. 2000;16(9):381-7. Epub 2000/08/22.
52. C. M-C. Conocimiento Actual sobre el la Distribución de los Triatóminos en México. . In: Pública INdS, editor. *Iniciativa para la Vigilancia y el Control de la Enfermedad de en la República Mexicana México* 2003.
53. Murcia L, Carrilero B, Saura D, Iborra MA, Segovia M. [Diagnosis and treatment of Chagas disease]. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2013;1:26-34.
54. Stahl P, Ruppert V, Meyer T, Schmidt J, Campos MA, Gazzinelli RT, et al. Trypomastigotes and amastigotes of *Trypanosoma cruzi* induce apoptosis and STAT3 activation in cardiomyocytes in vitro. *Apoptosis*. 2013;24:24.
55. Bestetti RB, Cardinalli-Neto A. Dissecting slander and crying for justice: Carlos Chagas and the Nobel Prize of 1921. *International journal of cardiology*. 2013;11(13):00088-0.
56. Andrade ZA, Andrade SG, Sadigursky M, Wenthold RJ, Jr., Hilbert SL, Ferrans VJ. The indeterminate phase of Chagas' disease: ultrastructural characterization of cardiac changes in the canine model. *Am J Trop Med Hyg*. 1997;57(3):328-36.
57. Nolano M, Provitera V, Manganelli F, Pagano A, Perretti A, Santoro L. Small fiber neuropathy in the chronic phase of Chagas disease: a case report. *Clin Auton Res*. 2013;9:9.
58. Amaral da Silva Souza MV, Santos Soares CC, Rega de Oliveira J, Rosa de Oliveira C, Hargreaves Fialho P, Cunha DM, et al. Heart rate variability: Analysis of time-domain

indices in patients with chronic Chagas disease before and after an exercise program. *Rev Port Cardiol.* 2013;23(12):00318-6.

59. Abuhab A, Trindade E, Aulicino GB, Fujii S, Bocchi EA, Bacal F. Chagas' cardiomyopathy: The economic burden of an expensive and neglected disease. *International journal of cardiology.* 2013;2(13):00322-7.

60. Borror D.J DDM. *An Introduction to the Study of Insects.* Holt RaW, editor. New York1979.

61. Castillo D WM. Aspectos del Comportamiento de los Triatominos (Hemiptera: Reduviidae), Vectores de la Enfermedad de Chagas. . *Biomédica* 2000;20(001):5.

62. R Z. *El Triatoma dimidiata* (Latreille, 1811) y su relación con la enfermedad de Chagas. Editorial Universidad Estatal a Distancia. 1981:10.

63. Lent H WP. Revision of the triatominae (HEMIPTERA, REDUVIIDAE), and their significance as vector of Chagas' disease. *American museum of Natural History.* 1979;163(3):136.

64. Zarate LG. The biology and behavior of *Triatoma barberi* (Hemiptera: Reduviidae) in Mexico. III. Completion of the life cycle, adult longevity, and egg production under optimal feeding conditions. *Journal of medical entomology.* 1983;20(5):485-97. Epub 1983/10/05.

65. Zarate LG, Morales Lopez G, Cabrera Ozuna M, Garcia Santiago G, Zarate RJ. The biology and behavior of *Triatoma barberi* (Hemiptera: Reduviidae) in Mexico. IV. Feeding and defecation patterns. *Journal of medical entomology.* 1984;21(5):548-60. Epub 1984/09/28.

66. Zarate LG, Tempelis CH. The biology and behavior of *Triatoma barberi* (Hemiptera: Reduviidae) in Mexico. II. Influence of a single versus a double feeding on the time that blood meal antigens remain serologically detectable. *Journal of medical entomology.* 1981;18(2):99-106. Epub 1981/04/01.

67. Zarate LG, Zarate RJ, Tempelis CH, Goldsmith RS. The biology and behavior of *Triatoma barberi* (Hemiptera: Reduviidae) in Mexico. I. Blood meal sources and infection with *Trypanosoma cruzi*. *Journal of medical entomology.* 1980;17(2):103-16. Epub 1980/03/31.

68. EVANGELISTA-MARTÍNEZ. Z I-PJL, BECERRIL-FLORES M-A, GÓMEZ-GÓMEZ J.V. Análisis Morfológico de Huevos de *Triatoma barberi* Usinger (Hemiptera: Reduviidae). *Neotropical Entomology*. 2010;39(2):6.
69. Alejandro Cruz-Reyes A P-LJM. Chagas disease in Mexico: an analysis of geographical distribution during the past 76 years - A Review. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*. 2006;101(4):9.
70. Gil R, Latorre A, Moya A. Bacterial endosymbionts of insects: insights from comparative genomics. *Environmental microbiology*. 2004;6(11):1109-22. Epub 2004/10/14.
71. 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(2):195-200.
72. Matthews S, Rao VS, Durvasula RV. Modeling horizontal gene transfer (HGT) in the gut of the Chagas disease vector *Rhodnius prolixus*. *Parasit Vectors*. 2011;4(77):1756-3305.
73. Durvasula RV, Gumbs A, Panackal A, Kruglov O, Aksoy S, Merrifield RB, et al. Prevention of insect-borne disease: an approach using transgenic symbiotic bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(7):3274-8.
74. Beard CBD, E. M. Pennington, P. M. Eichler, S. Cordon-Rosales, C. Durvasula, R. V. Bacterial symbiosis and paratransgenic control of vector-borne Chagas disease. *International journal for parasitology*. 2001;31(5-6):621-7. Epub 2001/05/04.
75. Beard CB C-RC, Durvasula RV. Bacterial symbionts of the triatominae and their potential use in control of Chagas disease transmission. *Annual review of entomology*. 2002;47.:123-41.
76. Durvasula RV, Gumbs A, Panackal A, Kruglov O, Taneja J, Kang AS, et al. Expression of a functional antibody fragment in the gut of *Rhodnius prolixus* via transgenic bacterial symbiont *Rhodococcus rhodnii*. *Med Vet Entomol*. 1999;13(2):115-9.
77. M DLC-PM. ANÁLISIS ELECTROFORÉTICO DE PROTEÍNAS DE LA RESPUESTA INMUNE DE *Meccus longipennis* (HEMIPTERA: REDUVIIDAE) CONTRA *Trypanosoma cruzi*. México: UAEH; 2008.

78. MA B-F. Patrones Biológicos, Antigénicos y Moleculares de Clonas Derivadas de Cepas Mexicanas de *Trypanosoma cruzi*. México: UNAM; 2008.
79. Sramova H, Daniel M, Absolonova V, Dedicova D, Jedlickova Z, Lhotova H, et al. Epidemiological role of arthropods detectable in health facilities. *J Hosp Infect*. 1992;20(4):281-92.
80. W. L. *Acinetobacter lwoffii* and *anitratus*. *Rev Chil Infect*. 2007;24(1):4.
81. Muratoglu HS, Kazim., Demirbag, Z. Determination and pathogenicity of the bacterial flora associated with the spruce bark beetle, *Ips typographus* (L.) (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae). *Turkish Journal of Biology*; 2011; 35 (1):9.
82. Osei-Poku J, Mbogo CM, Palmer WJ, Jiggins FM. Deep sequencing reveals extensive variation in the gut microbiota of wild mosquitoes from Kenya. *Mol Ecol*. 2012;21(20):5138-50.
83. G C. Flora bacteriana aeróbica del tracto digestivo del vampiro común, *Desmodus rotundus* (Chiroptera: Phyllostomidae). *Rev Biol Trop*. 2006;54(3):7.
84. Dillon RJ, Dillon, V.M. . The gut bacteria of insects: nonpathogenic interactions. *Annual review of entomology*. 2004;49:21.
85. Beard CB, Dotson, E.M., Pennington, P.M., Eichler, S., Cordon-Rosales, C., Durvasula, R.V. Bacterial symbiosis and paratransgenic control of vector-borne Chagas disease. *International journal for parasitology*. 2001;31:7.
86. Huerta-Núñez L, Martínez, J., Alcocer, R.L., Ramsey, J.M., Martínez-Romero, E. Diversidad de bacterias endosimbiontes de insectos de la subfamilia triatominae. *Rev Lat Micr*. 2006;48(2):14.