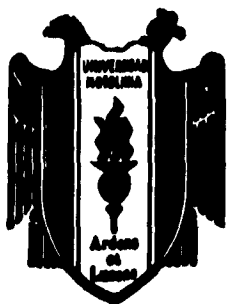


302827
31
2y



UNIVERSIDAD MOTOLINIA A. C.

**ESCUELA DE QUIMICA
CON ESTUDIOS INCORPORADOS A LA U.N.A.M.**

**DESARROLLO Y DIFERENCIACION DE NUEVE
AISLADOS DE *TRYPANOSOMA CRUZI* EN MEDIOS
DE CULTIVO Y TRIATOMINOS**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A
JACQUELINE ROJO PULIDO

MEXICO, D. F.

1998

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

A DIOS

por la oportunidad de vivir
por permitirme llegar a mi meta

A MIS PADRES, LUIS Y ANDREA JUDITH

porque con su ejemplo, amor y confianza
he logrado este anhelo que planeamos juntos

**A tí papá, por que me has enseñado
que hay que ser perseverantes para
lograr lo que uno desea**

**A tí mamá, por compartir conmigo
desvelos y apoyarme siempre en
los momentos difíciles**

G R A C I A S

LOS QUIERO MUCHO

A MIS HERMANOS, LUIS, MIGUEL ANGEL Y ANDREA
por contar con cada uno de ustedes y apoyarme
día a día no importando las distancias

A MIS ABUELITOS, por los consejos que un día me dieron

A MIS MEJORES AMIGOS, ANDREA Y JAIME
por su amistad incondicional y por su comprensión
que me han dado

A tí MONICA, por la amistad que me has brindado y
por los momentos que hemos compartido juntas

A mi UNIVERSIDAD, por todas las enseñanzas brindadas
para mi desarrollo profesional

MI AGRADECIMIENTO A:

M. en C. Ricardo Alejandro Aguilar y Dr. Benjamín Noguera Torres, por su tiempo, dedicación, consejos y apoyo incondicional que me brindaron durante la realización de este trabajo.

Q.F.B. Migual Angel Mazariego Arana por su valiosa amistad, dedicación, comprensión y apoyo dado.

A todas las personas del Departamento de Parasitología que colaboraron de alguna manera en la realización de este trabajo.

A todos mis AMIGOS

G R A C I A S

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Entomología del Departamento de Parasitología de la ENCB bajo la asesoría del M. en C. Ricardo Alejandro Aguilar. Como parte del proyecto "Caracterización de cepas y clones de Trypanosoma cruzi tratadas con endonucleasas de restricción" con número de registro 942446, que forma parte del programa "Estudio de los transmisores y del agente etiológico de la Enfermedad de Chagas", financiado por DEPI - IPN.

INDICE

CAPITULO I

INTRODUCCION

1.1 Planteamiento del problema	1
1.2 Objetivos	2

CAPITULO II

ANTECEDENTES

2.1 Generalidades de la enfermedad de Chagas	3
2.1.1 Mecanismos de transmisión	4
2.1.2 Manifestaciones clínicas	5
2.2 Cultivo de <i>Trypanosoma cruzi</i>	7
2.3 Susceptibilidad de los triatominos a la infección con <i>Trypanosoma cruzi</i>	8

CAPITULO III

PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Diagrama de flujo	10
3.2 Material de laboratorio, medios de cultivo, reactivos y equipo	11
3.2.1 Material biológico	11
3.2.2 Material de laboratorio	12
3.2.3 Reactivos	13
3.2.4 Preparación de medios de cultivo	13
3.2.5 Equipo	15

3.3 Metodología	15
3.3.1 Cuenta de parásitos	15
3.3.2 Susceptibilidad de triatominos a la infección	16
CAPITULO IV	
RESULTADOS Y DISCUSION	
4.1 RESULTADOS	18
4.2 DISCUSION	35
4.2.1 Cinética de crecimiento en medios de cultivo	35
4.2.2 Susceptibilidad de triatominos a la infección	37
CAPITULO V	
CONCLUSIONES	41
BIBLIOGRAFIA	42

CAPITULO I

INTRODUCCION

1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La identificación de cepas de *Trypanosoma cruzi* está basada en el comportamiento que presentan en ratones inoculados y su desarrollo en medio de cultivo (caracterización biológica), pero también se basan en las isoenzimas y análisis de zimodemos o en los perfiles de DNA de cinetoplasto (kDNA) por endonucleasas de restricción y el análisis de esquizodemos (caracterización bioquímica) (Morel et al., 1980; Carreno et al., 1987; Avila et al., 1990; Mimori et al., 1992).

La caracterización biológica de las cepas *Trypanosoma cruzi* es de suma importancia ya que de esta manera se puede explicar las diferencias de la patología que se presentan en diferentes áreas. Se puede usar para la identificación y caracterización de *Trypanosoma cruzi* los criterios indirectos tales como el crecimiento y morfología en medio de agar sangre, desarrollo en triatomíneos con la producción de tripomastigotes metacíclicos en el intestino delgado, la infectividad de animales de laboratorio, multiplicación de amastigotes intracelularmente y datos biométricos (Deneris & Marshall, 1982).

Para efectuar el estudio de las cepas de *T. cruzi* es necesario mantenerlo en cultivo, para ello hay que emplear los diferentes

medios difásicos descritos hasta encontrar el más adecuado para su desarrollo, los medios más utilizados son los siguientes: gelosa sangre, medio N.N.N., medio de Tobie, medio de Senejki, S.N.B.-9, medio de Chang, medio de Kelser y medio de Weinman (Cortés, 1970).

1.2 OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Conocer el comportamiento biológico de nueve aislados de *T. cruzi* en medios de cultivo acelulares y en el transmisor.

OBJETIVOS PARTICULARES

a) Observar la cinética de crecimiento de *Trypanosoma cruzi* en el medio de cultivo difásico de gelosa sangre - solución salina.

b) Determinar si la susceptibilidad de una especie de triatomino se modifica según la cepa de *Trypanosoma cruzi* utilizada.

CAPITULO II

ANTECEDENTES

2.1 GENERALIDADES DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS

La enfermedad de Chagas es una zoonosis parasitaria causada por *Trypanosoma cruzi*, protozooario flagelado perteneciente al orden de los cinetoplástidos, que es transmitido al hombre y otros mamíferos por insectos hematófagos pertenecientes a la subfamilia Triatominae (Hemiptera, Reduviidae). Aunque se han encontrado transmisores infectados desde el paralelo 42 norte en los Estados Unidos hasta el 43 sur en Argentina, se considera que el área de dispersión como problema humano, se inicia en el norte a nivel de México y llega por el sur hasta el río Negro en Argentina, es decir, entre el paralelo 25 en el norte hasta el 38 en el sur (Brenner, 1977; OPS, 1984; Romaña, 1963).

La tripanosomiasis americana ataca básicamente a poblaciones de bajo ingreso económico, estando claramente asociada a ciertas formas de organización de espacio físico, las relaciones del hombre con ese espacio y, especialmente, las relaciones sociales establecidas (Días, 1990).

Trypanosoma cruzi es un parásito heteroxeno eurixeno; en la naturaleza podemos encontrarlo en dos tipos de huéspedes: el invertebrado, que son los insectos transmisores y el vertebrado

en donde podemos distinguir animales silvestres, animales domésticos y el hombre. La transmisión de *T. cruzi* por el triatomino al hombre es la de mayor importancia epidemiológica, el triatomino que es hematófago obligado y de hábitos nocturnos se alimenta cuando las personas duermen. La ingestión de sangre, por efecto mecánico, produce la deyección del insecto en sitios cercanos al de la picadura y cuando la persona se rasca al sentir prurito arrastra las heces que contienen tripanosomas al sitio de picadura, hacia mucosas o se autoinocula al provocarse escoriaciones en la piel con el rascado, facilitando de esta manera la entrada del parásito (Días, 1990).

El agente causal es un protozoario flagelado perteneciente al Phylum Sarcomastigophora, Superclase Mastigophora, Clase Zoomastigophora, Orden Kinetoplastida, Suborden Trypanosomatina, Familia Trypanosomatidae, Subfamilia Trypanosomatinae, Género *Trypanosoma*, Subgénero *Schizotrypanum* y Especie *cruzi* (Kreier, 1977; Schmidt & Roberts, 1989; Zeledon, 1987).

2.1.1 MECANISMOS DE TRANSMISION

Trypanosoma cruzi es transmitido en condiciones naturales por artrópodos estrictamente hematófagos. El triatomino adquiere la infección al alimentarse de mamíferos que presentan parasitemia. En el interior del insecto, el tripanosoma se reproducirá

intensamente, especialmente en la luz del tubo digestivo y del aparato excretor (tubos de Malpighi) (Días, 1990).

Estos transmisores mantienen en su tracto digestivo a tripomastigotes metacíclicos, etapas infectantes; las cuales son eliminadas a través de las heces e infectan al hombre por contaminación de lesiones en piel o membranas intactas de mucosas (Lapierre, 1972 (a); Lapierre, 1972 (b)).

Otros mecanismos importantes para la transmisión del parásito es a través de transfusiones sanguíneas, forma transplacentaria, vía oral, trasplante de órganos y accidentes de laboratorio (Bittencourt, 1988; Brener, 1977; Días, 1985; Días, 1987; Días, 1990; Lorca, 1983; News Notes, 1989; Oliveira et al., 1988; Zuna, et al., 1985).

2.1.2 MANIFESTACIONES CLINICAS

Estas pueden variar de acuerdo a la cantidad de inóculo, la virulencia de la cepa, edad, estado nutricional y la respuesta inmunológica del huésped (Días, 1990; Romana, 1963).

El período de incubación en el hombre es de cuatro a doce días y después aparecen los signos y síntomas, sin embargo, la mayoría de las infecciones humanas son asintomáticas.

En la enfermedad de Chagas pueden distinguirse tres fases:

FASE AGUDA: En la mayoría de los casos pasa inadvertida, se han descrito signos locales o de puerta de entrada de la infección y alteraciones sistemáticas. Cuando la infección se inicia en el ojo se conoce como signo de Romaña, en el 50 % de los casos; o bien chagomas de inoculación cutáneo en un 25 % de los pacientes. La fiebre es el signo más importante en esta etapa observándose en el 95 % de los casos agudos (Días, 1990; Perlawagora - Szumlewicz & Muller, 1987; Schmidt & Roberts, 1989).

FASE INDETERMINADA: Durante esta fase desaparece el cuadro clínico y sin manifestaciones detectables. Se presenta en la mayoría de los pacientes y puede evolucionar a una fase clínica definida. Se caracteriza por la seropositividad en un individuo asintomático (Días, 1990; Perlawagora - Szumlewicz & Muller, 1987; Schmidt & Roberts, 1989).

FASE CRONICA: Es la que más frecuentemente se encuentra en la práctica médica, la alteración más comúnmente encontrada es la cardiopatía chagásica crónica, además de presentar esofagopatía o megaesófago, colopatía o megacólon (Días, 1990; Perlawagora - Szumlewicz & Muller, 1987; Schmidt & Roberts, 1989).

2.2 CULTIVO DE *Trypanosoma cruzi*

Se ha logrado el cultivo de *Trypanosoma cruzi* en una gran variedad de medios de cultivo, este parásito puede crecer en medios fáciles de elaborar, actualmente existen varios medios de cultivo:

MEDIOS DEFINIDOS: Son aquellos cuya composición química es conocida.

MEDIOS INDEFINIDOS: Son aquellos que contienen constituyentes de los cuales algunos se han identificado, pero de otros se desconoce su naturaleza química y la proporción en la que se encuentran (Vallejo, 1989).

Un aspecto importante es saber seleccionar el medio de cultivo apropiado para obtener un buen crecimiento de *Trypanosoma cruzi*, el medio deberá proporcionar los requerimientos nutricionales, así como factores de crecimiento que necesita, pero no basta con elegir

un buen medio de cultivo, sino que hay que tomar en cuenta aquellos factores que influyen en su desarrollo metabólico y morfo genético (Vallejo, 1989).

Con el desarrollo de cultivo de parásitos, se hace posible el estudio de algunos aspectos de la relación huésped - parásito, así como el estudio del papel patógeno de muchos parásitos bajo condiciones controladas (Vallejo, 1989).

Las fases de epimastigotes son las formas que se desarrollan en estos medios de cultivo y en algunos de ellos ocurre la diferenciación a formas de tripomastigote (Vallejo, 1989).

2.3 SUSCEPTIBILIDAD DE LOS TRIATOMINOS A LA INFECCION CON *Trypanosoma cruzi*

Los transmisores y huéspedes invertebrados de la enfermedad de Chagas son insectos hematófagos obligados que realizan una transmisión ciclo - propagativa de tipo contaminativa y que pertenecen al Orden Hemiptera, Familia Reduviidae, Subfamilia Triatominae. Esta subfamilia es una de las 22 reconocidas en la Familia Reduviidae, en la cual podemos distinguir cinco tribus que se caracterizan por ser hematófagas en ambos sexos y en todas sus etapas ninfales y porque son capaces de transmitir *T. cruzi*. Son insectos hemimetábolos, que presentan cinco estadios ninfales y estadio adulto (Carcavallo, 1987; Lent & Wygodzinsky, 1979).

Según Miles, 1978 (citado por García, 1980), la relación entre *T. cruzi* y su transmisor es importante y compleja. Algunos factores, como la especie, el estadio, el volumen de sangre ingerida y las diferencias entre las cepas del parásito pueden afectar la multiplicación y diferenciación del tripanosoma en el insecto. Se piensa también que las preferencias alimentarias del huésped invertebrado pueden contribuir al desarrollo del parásito (Perlawagora - Szumlewicz & Muller, 1982).

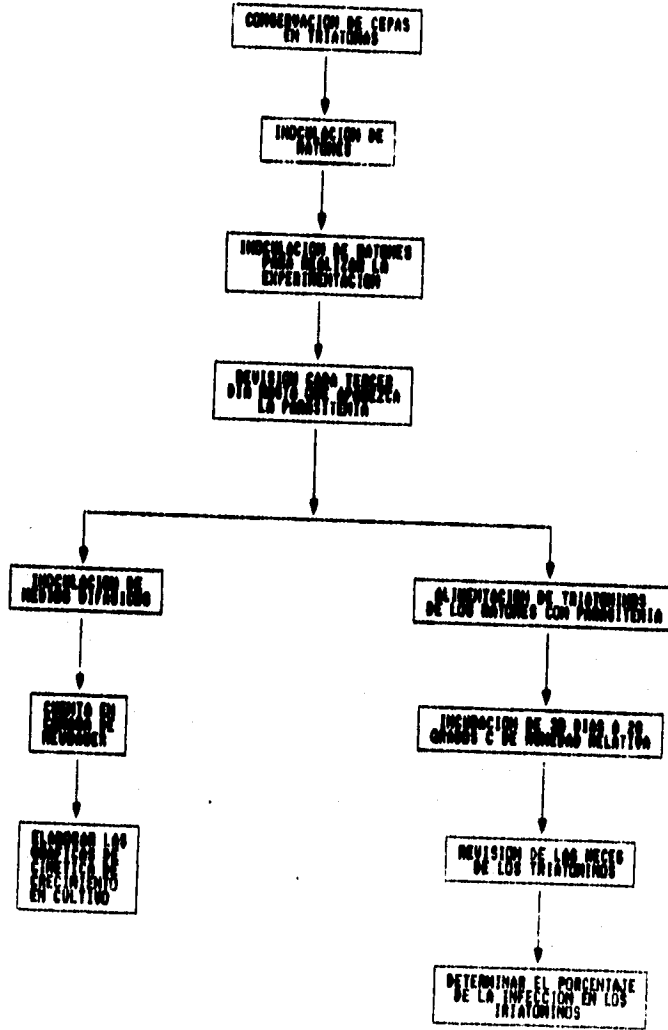
Se emplean los estadios ninfales para la realización de los estudios de susceptibilidad y de ellos el III y IV, ya que éstos ingieren una cantidad de sangre considerable, sin que resulte excesiva. El tiempo óptimo de ayuno que deben tener los insectos que se usan para la prueba ha sido establecido en 14 días como mínimo y el tiempo que deben dejarse alimentando se sugiere que sea de 20 a 30 minutos (Figueiredo et al., 1989; Forattini et al., 1976).

Es posible que la susceptibilidad a *T. cruzi* esté íntimamente asociada a factores tales como: a) características fisiológicas del tubo digestivo del insecto, que permitan el desarrollo de los tripanosomas ingeridos, aunque fueran pocos; b) cepas del protozoario, quizá con una mejor adaptación evolutiva para su hospedador invertebrado; c) edad y d) sexo de los insectos empleados (Cuba, et al., 1978; Phillips & Bertram, 1967).

CAPITULO III

PARTE EXPERIMENTAL

3.1 DIAGRAMA DE FLUJO



3.2 MATERIAL, REACTIVOS Y EQUIPO

3.2.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Las cepas utilizadas para este estudio fueron aisladas en el estado de Nayarit de diferentes fuentes:

CEPA COMPOSTELA: aislada de triatoma
CEPA V2R: aislada de reservorio silvestre
CEPA PR: aislada de reservorio doméstico
CEPA PARRA (CLONA): aislada de triatoma
CEPA PUGA: aislada de triatoma
CEPA VILLA: aislada de humano
CEPA NAYARIT: aislada de triatoma
CEPA TEPIC: aislada de triatoma
CEPA PARRA: aislada de triatoma

- Sangre desfibrinada de conejo
- Sangre desfibrinada de carnero
- Conejo Nueva Zelanda albino de 3 a 4 kg aproximadamente
- Ratones albinos cepa NIH de 20 a 22 g de peso

Para realizar las pruebas de susceptibilidad en triatominos, se utilizaron ejemplares de *Triatoma pallidipennis* cultivados en el laboratorio y libres de la infección con *T. cruzi*.

La colonia de triatominos se ha conservado a una temperatura de 28 °C y con una humedad relativa del 60 % , se han alimentado sobre conejos libres de la infección con *T. cruzi* para garantizar la no infección de los triatominos.

Se utilizaron nueve aislados de *T. cruzi* obtenidos de diferentes fuentes (triatominos, reservorios y humano) directo y que se han mantenido en el laboratorio por pases sucesivos ratón - triatomo - ratón durante un período aproximado de un año.

Los mamíferos usados para el estudio de susceptibilidad fueron ratones albinos de la cepa NIH (*Mus musculus*) 20 a 22 g de peso, fueron inoculados por vía intraperitoneal con tripomastigotes obtenidos de medios de cultivo.

3.2.2 MATERIAL DE LABORATORIO

- Matraces Erlenmeyer con tapón de rosca Pyrex (50, 100, 250 y 500 ml)
- Tubos de ensaye Pyrex de 13 x 100
- Probetas Pyrex (50, 100 y 500 ml)
- Pipeta de Thoma para cuenta de glóbulos blancos
- Cámara de Neubauer
- Tubería de hule con boquilla

- Pipetas Pasteur
- Mechero de Bunsen
- Asa bacteriológica
- Cinta testigo
- Espátula de acero inoxidable
- Algodón
- Guantes de látex
- Cubreboca

3.2.3 REACTIVOS

- Base de agar sangre (BIOXON)
- Infusión de cerebro y corazón (BIOXON)
- Cloruro de sodio (PRODUCTOS QUIMICOS MONTERREY, S.A.)
- Fenol (J. T. BAKER S.A. DE C.V.)
- Etanol absoluto (MERCK)
- Solución Stock de Giemsa
- Agua destilada

3.2.4 PREPARACION DE MEDIOS DE CULTIVO

El medio de cultivo consta de dos fases: sólida y líquida.

PREPARACION DE LA FASE SOLIDA

Esta fase se prepara con el medio de cultivo deshidratado Base de agar sangre suspendiendo 4 g en cada 100 ml de agua destilada. Se deja reposar durante 5 minutos.

Se hierve durante 1 minuto.

Se esteriliza a 121 °C durante 15 minutos.

Después de esterilizar, se añade 10 % de sangre estéril desfibrinada de conejo o carnero.

Se vacía en los tubos de ensaye y en matraces con tapón de rosca, colocándose en posición inclinada para que así solidifiquen.

PREPARACION DE LA FASE LIQUIDA

Esta fase se prepara con solución salina al 0.85 % añadiéndose Infusión de cerebro y corazón al 0.1 % .

Se esteriliza en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

El último paso es la incorporación de la fase líquida a los tubos y matraces que ya poseen la fase sólida.

PREPARACION DE CLORURO DE SODIO AL 0.85 %

Pesar en la balanza analítica 0.85 g de cloruro de sodio y disolverlo en 100 ml de agua destilada.

PREPARACION DE FENOL AL 5 %

El fenol se preparó pesando en la balanza granataria el 5 % de fenol de un volumen determinado de agua destilada en el cual se disuelve.

3.2.5 EQUIPO

- Autoclave Industrias Steele Presto Modelo 21 L
- Balanza granataria OHAUS
- Balanza analítica SARTORIUS
- Microscopio binocular CARL ZEISS. WEST GERMANY
- Incubadora PRECISION GRAVITY CONVENTION INCUBATOR
G:C:A:CORPORATION
- Refrigerador CABHERS
- Incubadora

3.3 METODOLOGIA

3.3.1 CUENTA DE PARASITOS

Cuenta en cámara de Neubauer

- 1) Tomar con pipeta Pasteur fase líquida de los medios de cultivo previamente sembrados con *T. cruzi*.
- 2) Cargar con fase líquida que contenga tripanosomas la pipeta de Thoma para la cuenta de glóbulos blancos hasta la marca de 1.0.

- 3) Aforar con cloruro de sodio al 0.85 % hasta la marca de 11.
- 4) Depositar la muestra homogeneizada en la cámara de Neubauer.
- 5) Con el objeto de determinar la cantidad de tripanosomas por milímetro cúbico, se contaron cuatro cuadros utilizados para la cuenta de glóbulos blancos de la cámara y multiplicar el número de parásitos contados por 25 (factor de dilución).

3.3.2 SUSCEPTIBILIDAD DE TRIATOMINOS A LA INFECCION

Lotes de 20 ninfas de estadio III, libres de la infección, fueron alimentados de los ratones parasitados con cada una de las cepas; con una sola alimentación y durante 30 minutos, tiempo suficiente para que lleguen a la repleción; los insectos que no se alimentaron o lo hicieron parcialmente, fueron descartados y se seleccionaron sólo los que llegaron a la repleción.

Examen de los insectos infectados: La técnica utilizada para la revisión fue la compresión abdominal, se comprimió el abdomen de cada uno de los insectos con ayuda de pinzas entomológicas y las deyecciones así colectadas se colocaron en portaobjetos, se diluyó con una gota de solución al 0.85 % para facilitar la revisión microscópica, se le colocó un cubreobjetos y se observó al microscopio primeramente con objetivo 10X y posteriormente se

observó 10 campos con objetivo 40X, se revisaron las heces de cada insecto en forma individual.

La forma de cuantificar la infección fue expresada de dos formas, la proporción de insectos infectados y la cantidad aproximada de los parásitos en las heces de los triatomíneos.

CAPITULO IV

RESULTADOS Y DISCUSION

4.1 RESULTADOS

Se realizó la inoculación en medios de cultivo difásicos agar sangre, en el que se empleó la cámara de Neubauer para realizar el conteo de tripomastigotes y realizar las gráficas de la cinética de crecimiento.

En la cepa V2R (gráfica 1) no se observa una curva bien definida ya que presenta el pico máximo en el vigésimo día con un descenso, y posteriormente en el vigésimo noveno día, se observa un incremento alto semejante al del pico máximo. A partir de éste, se observa un descenso gradual hasta el trigésimo cuarto día con un leve incremento en el trigésimo octavo día.

La cepa COMPOSTELA (gráfica 2) presenta un incremento gradual alcanzando un pico máximo en el vigésimo día, seguido de un descenso en el vigésimo cuarto día que se mantiene estable, hasta presentar un incremento ligero en el trigésimo primero descendiendo nuevamente.

La curva de la cepa PARRA 1 (gráfica 3) no se encuentra bien definida ya que se observa un incremento durante los primeros veinte días de la inoculación, alcanzando el pico máximo en el vigésimo segundo día, presentando después un descenso, el cual se incrementa a los cinco días para descender gradualmente hasta el

trigésimo sexto día se presenta un ligero incremento en el trigésimo octavo día.

El comportamiento de la cepa PR (gráfica 4) se mantiene estable durante 25 días, al cabo de ellos, hay un ligero incremento seguido del pico máximo en el trigésimo primer día, el cual desciende en el trigésimo cuarto día para posteriormente incrementarse ligeramente.

En la curva de la cepa VILLA (gráfica 5) el pico máximo se presentó en el décimo día, en el que se observa un descenso seguido de un incremento en el vigésimo primer día descendiendo a partir del vigésimo sexto día hasta casi desaparecer en el vigésimo octavo, manteniéndose estable hasta el final.

El comportamiento de la cepa NAYARIT (gráfica 6) presentó ligeros incrementos y descensos hasta el vigésimo cuarto día y el pico máximo se presenta en el vigésimo sexto día, en el que se observa una disminución gradual de la curva a partir del trigésimo día hasta el trigésimo noveno día.

En la curva de la cepa TEPIC (gráfica 7) se observa el pico máximo en el décimo noveno día, en donde se presenta una disminución gradual hasta el trigésimo primer día presentando un ligero incremento el trigésimo tercer día.

El comportamiento de la cepa PARRA (gráfica 8) presentó incrementos y descensos hasta el décimo noveno día en el que se alcanzó el pico máximo. A partir de este día se presentó un descenso hasta el vigésimo cuarto día, manteniéndose estable posteriormente hasta el trigésimo noveno día.

En la curva de la cepa PUGA (gráfica 9) se observa un incremento el cual decae y nuevamente se eleva alcanzando el pico máximo en el décimo séptimo día, donde se presenta un decremento hasta el día vigésimo cuarto, manteniéndose estable hasta el trigésimo noveno día.

En la tabla III se presenta la densidad de parásitos en las heces de los triatomíneos infectados. Debido a la heterogeneidad de los valores encontrados se clasificaron arbitrariamente en tres categorías; 1 a 5, 6 a 9 y 10 ó más flagelados por campo, denominándose baja, mediana o alta respectivamente, a la densidad parasitaria. De acuerdo a los resultados obtenidos, los nueve aislados de *Trypanosoma cruzi* corresponden a la primer categoría (1 a 5), dentro de éstas, la cepa NAYARIT fue la que obtuvo mayor número de tripanosomas por campo, siendo las cepas VILLA y PR las de menor número.

En el caso de la tercer categoría (10 ó más), la cepa VILLA fue la que presentó mayor cantidad de tripanosomas por campo.

En la tabla IV se presenta el porcentaje de susceptibilidad de *Triatoma pallidipennis* a la infección con las cepas aisladas de *Trypanosoma cruzi* del estado de Nayarit.

De acuerdo a los porcentajes de infección obtenidos, se observan que las cepas NAYARIT y PARRA son las que presentaron el porcentaje más alto (90%), en cambio, la cepa PR fue la que presentó el porcentaje de infección más bajo siendo de 40%.

**TABLA I. CINETICA DE CRECIMIENTO DE NUEVE
CEPAS DE TRYPANOSOMA CRUZI**

NUMERO DE PARASITOS/cm²

TIEMPO (DÍAS)	VILLA	NAVARIT	TEPIC	PARRA	POSA
1	0	0	0	0	0
3	502 500	75 000	0	125 000	85 000
5	1 312 500	87 500	10 000	600 000	15 000
7	2 225 000	97 500	22 500	905 000	275 000
10	5 275 000	727 500	52 500	625 000	690 000
12	1 750 000	257 500	65 000	2 350 000	340 000
14	2 625 000	235 000	147 500	2 260 000	850 000
17	1 525 000	625 000	222 500	1 275 000	1 875 000
19	1 150 000	565 000	1 155 000	2 950 000	1 375 000
21	3 750 000	250 000	800 000	2 675 000	825 000
24	3 375 000	725 000	800 000	325 000	42 500
26	1 225 000	3 250 000	175 000	117 500	102 500
28	87 500	392 500	137 500	70 000	115 000
31	62 500	372 500	52 500	152 500	77 500
33	20 000	462 500	277 500	217 500	37 500
34	20 000	460 000	245 000	160 000	35 000
37	130 000	115 000	100 000	232 500	75 000
39	147 500	42 500	90 000	265 000	67 500

TABLA II. CINETICA DE CRECIMIENTO DE NUEVE CEPAS DE TRYPANOSOMA CRUZI

NUMERO DE PARASITOS/cm²

TIEMPO (DIAS)	V₂R	COMPOSTELA	PARRA 1	PR
1	0	50 000	0	0
3	2 500	87 500	12 500	30 000
6	167 500	157 500	65 000	32 500
8	775 000	440 000	72 500	77 500
10	1 447 500	595 000	240 000	107 500
13	2 125 000	1 490 000	525 000	160 000
15	3 300 000	2 062 500	625 000	312 500
17	3 325 000	6 175 000	830 000	380 000
20	14 650 000	18 200 000	1 032 500	637 500
22	10 350 000	3 750 000	5 050 000	722 500
24	4 300 000	3 150 000	3 425 000	762 500
27	4 850 000	2 050 000	5 350 000	1 637 500
29	13 400 000	3 025 000	3 625 000	2 447 500
31	6 550 000	5 100 000	3 275 000	10 500 000
34	100 000	2 475 000	1 675 000	900 000
36	1 100 000	3 025 000	175 000	1 225 000
38	2 100 000	1 500 000	900 000	1 250 000

TABLA III. DENSIDAD DE TRIPANOSOMAS EN LAS HECEs DE LOS TRIATOMINOS

CEPa	TRIPANOSOMAS POR CAMPO		
	1 - 5	6 - 9	10 +
VILLO	4	0	3
NOYAR	9	0	0
PARRA	0	0	1
PR	4	0	0
PARRA1	5	0	0
TEPIC	7	0	0
COMPOS	7	0	1
U ₂ R	5	0	0
PUSA	5	0	0

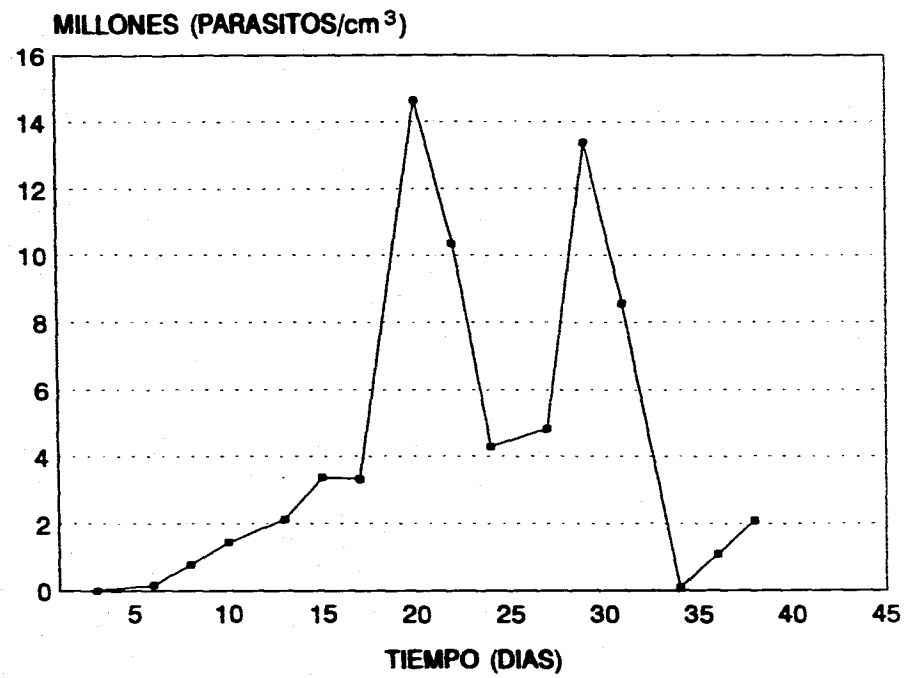
Los datos representan el promedio al contar 10 campos con el objetivo 40x.

**TABLA IV. SUSCEPTIBILIDAD DE T. PALLIDIPENNIS
A LA INFECCION CON LAS CEPAS
AISLADAS EN EL ESTADO DE NAYARIT**

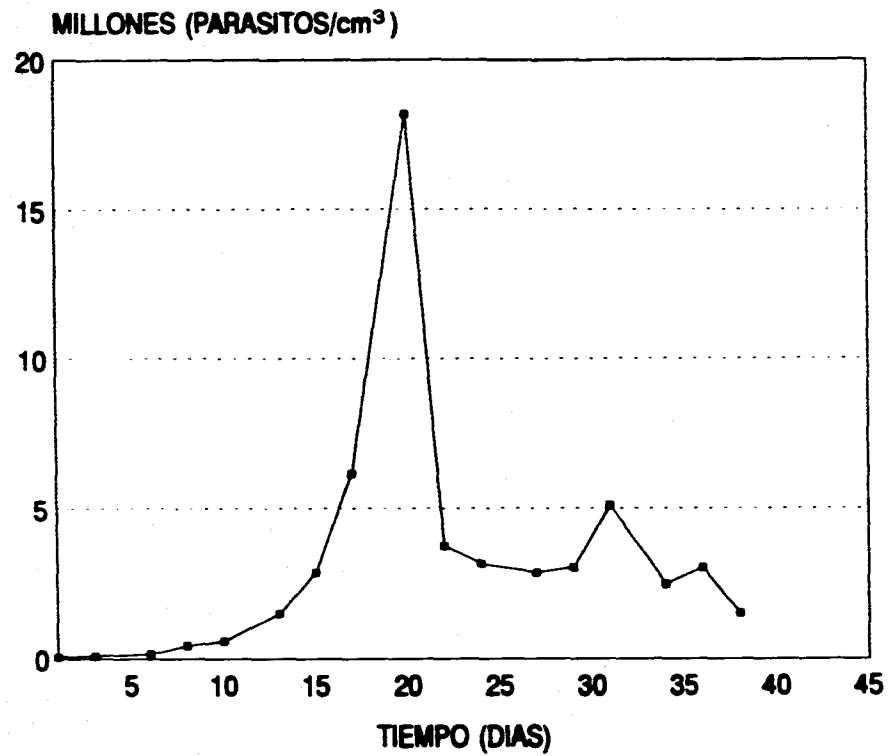
CEPA	PORCENTAJE DE INSECTOS INFECTADOS
VILLA	78 %
NAYAR	90 %
PARRA	90 %
PR	40 %
PARRA1	50 %
TEPIC	70 %
COMPOS	80 %
U₂R	50 %
PUGA	50 %

GRAFICA 1

CINETICA DE CRECIMIENTO DE LA CEPA V2R

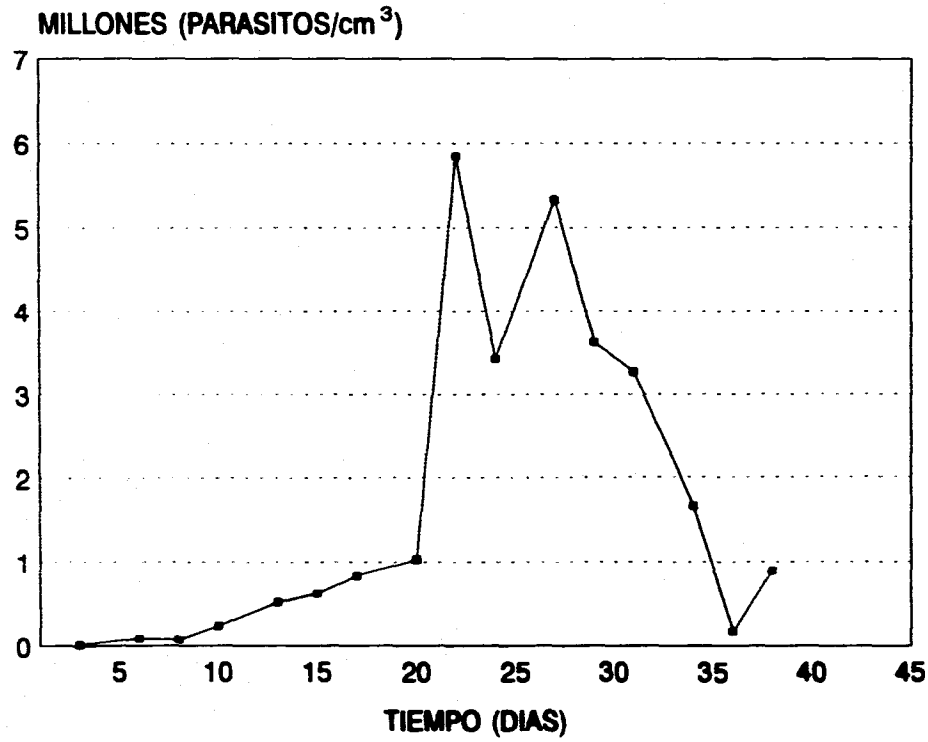


GRAFICA 2 CINETICA DE CRECIMIENTO DE LA CEPA COMPOSTELA

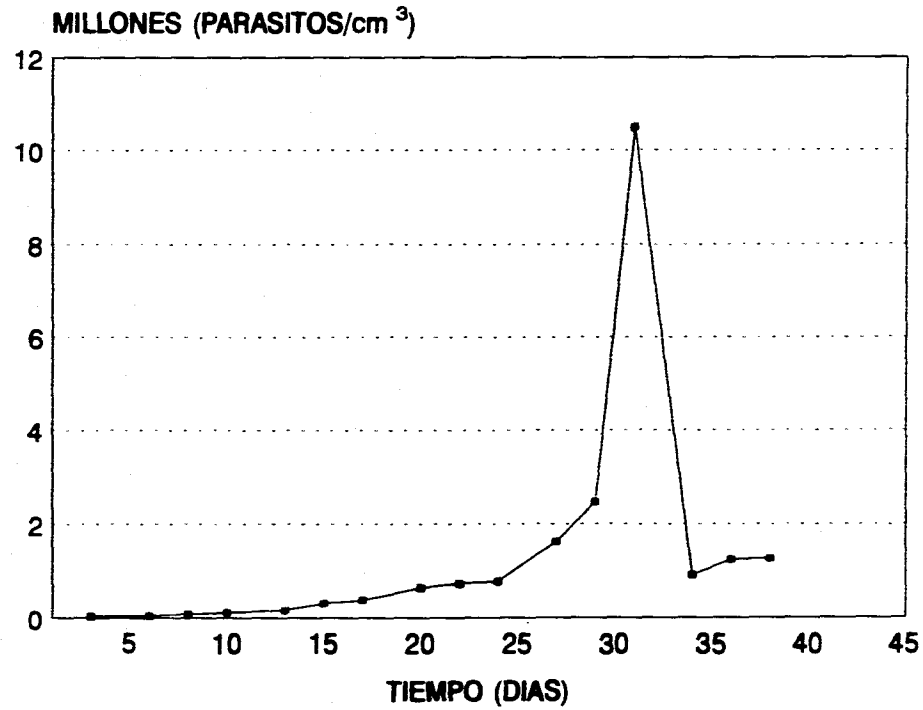


GRAFICA 3

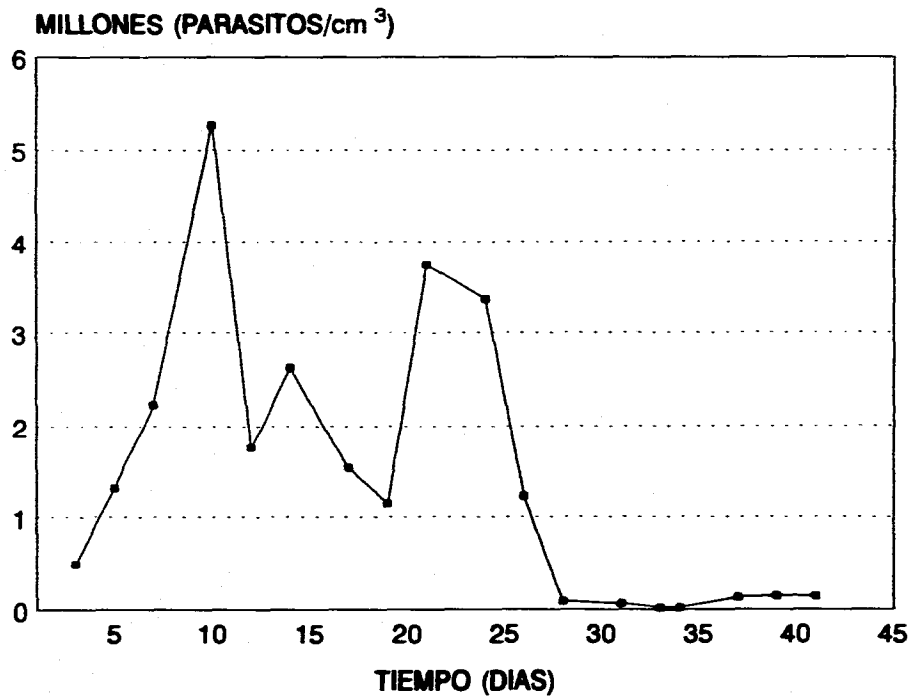
CINETICA DE CRECIMIENTO DE LA CEPA PARRA1



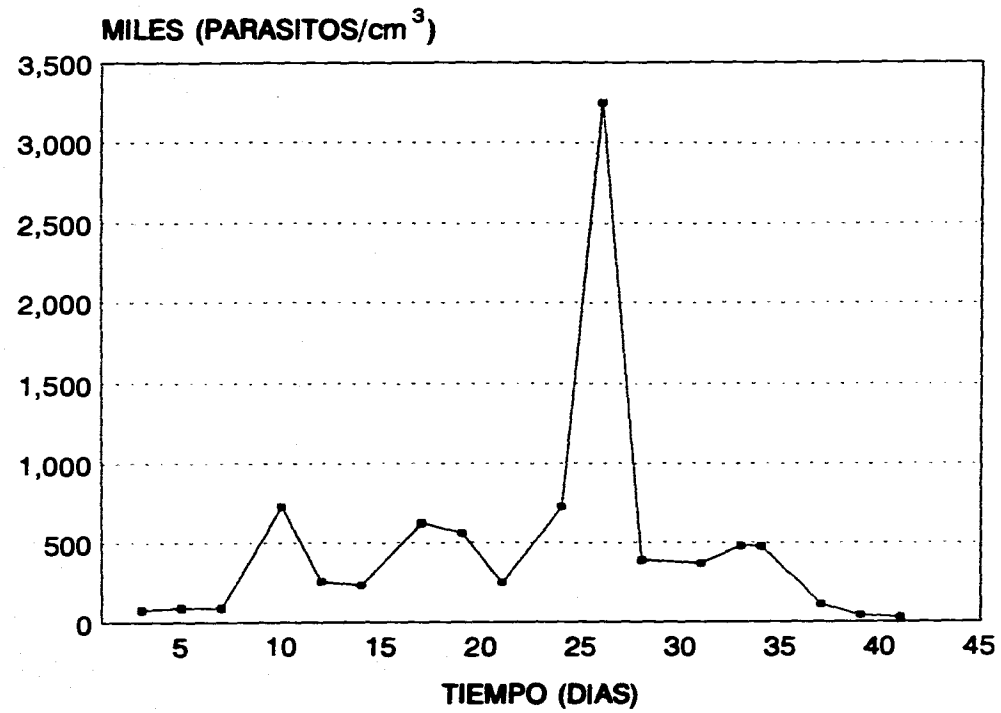
GRAFICA 4
CINETICA DE CRECIMIENTO DE LA CEPA PR



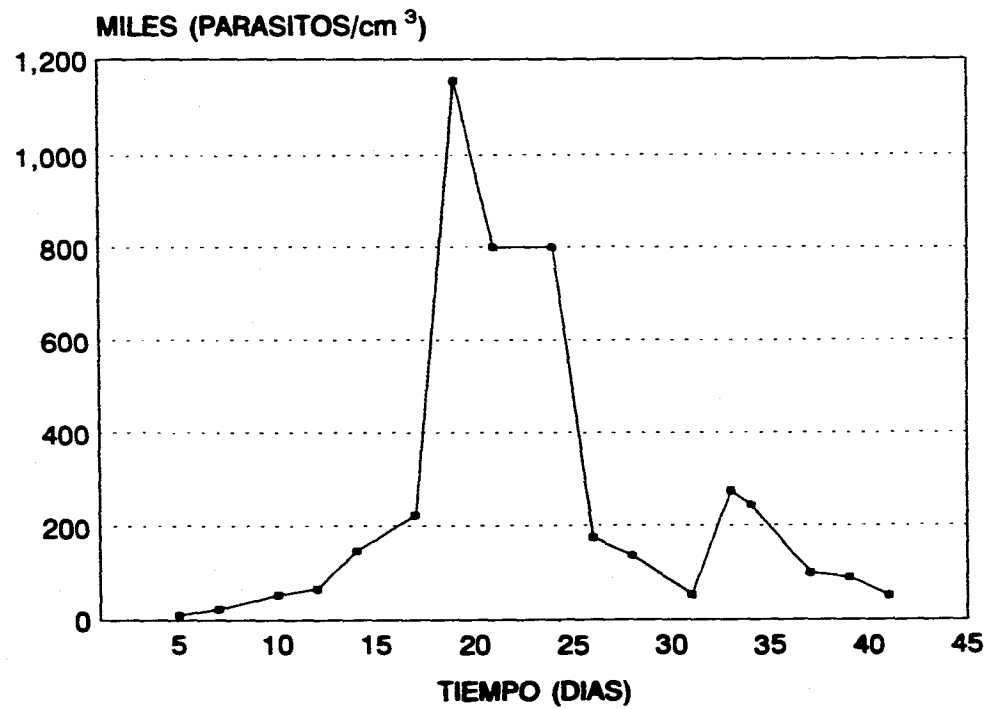
GRAFICA 5 CINETICA DE CRECIMIENTO DE LA CEPA VILLA



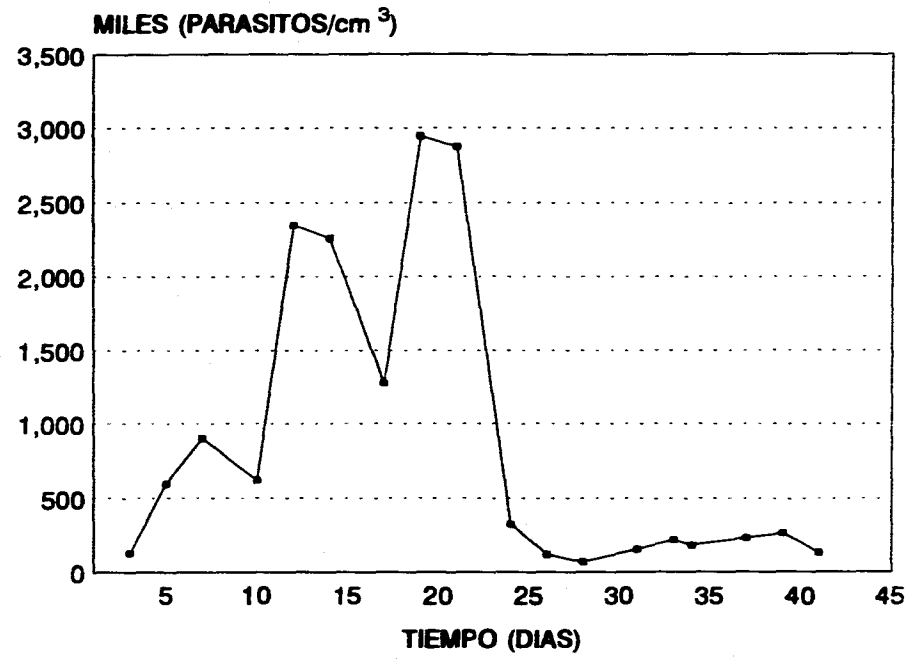
GRAFICA 6
CINETICA DE CRECIMIENTO DE LA CEPA NAYARIT



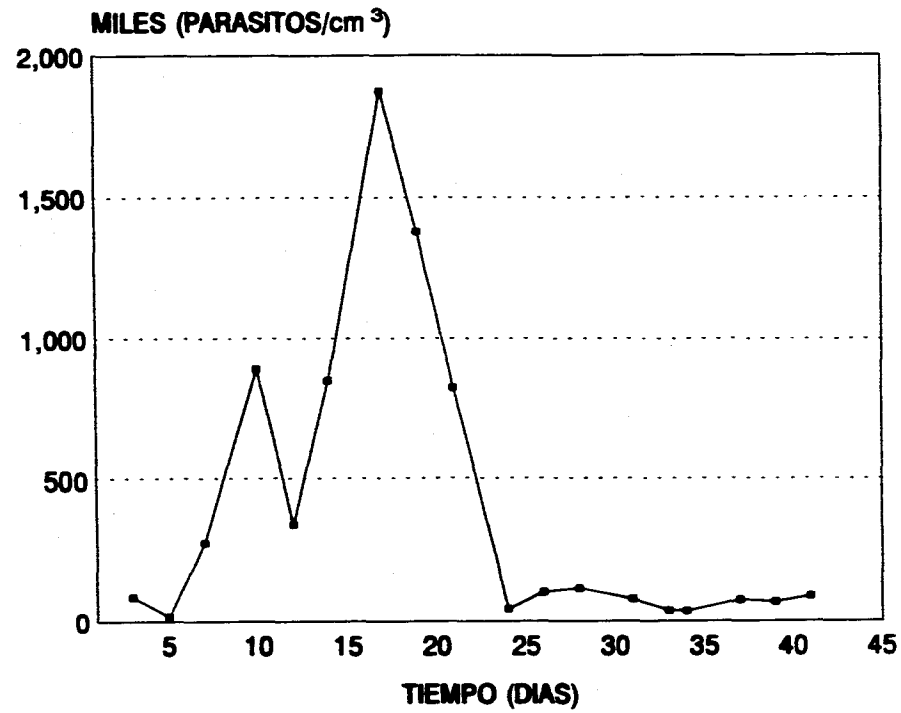
GRAFICA 7 CINETICA DE CRECIMIENTO DE LA CEPA TEPIC



GRAFICA 8 CINETICA DE CRECIMIENTO DE LA CEPA PARRA



GRAFICA 9
CINETICA DE CRECIMIENTO DE LA CEPA PUGA



4.2 DISCUSION

Uno de los aspectos más importantes en el estudio de la enfermedad de Chagas es el de utilizar cepas de *Trypanosoma cruzi* debidamente caracterizadas. En el presente trabajo se realizó parte de la caracterización biológica, determinando la cinética de crecimiento de las cepas en medios acelulares y la susceptibilidad de triatomas a la infección.

4.2.1 CINÉTICA DE CRECIMIENTO EN MEDIOS DE CULTIVO

Las cepas de *Trypanosoma cruzi* empleadas fueron mantenidas en medios de cultivo difásico agar sangre, debido a que proporciona los requerimientos nutricionales, así como de factores de crecimiento que necesita para su desarrollo metabólico y morfo genético (Vallejo, 1989).

Trabajos realizados anteriormente muestran que los medios de cultivo utilizados para el mantenimiento de cepas de *Trypanosoma cruzi* tales como: agar gelosa-sangre, medio N.N.N., medio Tobie, medio Senejki, medio S.N.B-9, medio Chang, medio Keiser proveen los requerimientos nutricionales para su desarrollo (Cortés, 1970), mostrando que el medio agar gelosa-sangre empleado en este trabajo obtuvo buenos resultados en la cinética de crecimiento.

La mayoría de las cepas estudiadas presentaron crecimiento parasitario al tercer día de inoculación, exceptuando las cepas COMPOSTELA y TEPIC que lo presentaron al primer y quinto día respectivamente.

La aparición de los picos máximos durante los días del estudio, presentados en cada una de las gráficas de cinética de crecimiento realizadas, nos muestran que existen diferencias entre las cepas. Siendo la cepa VILLA la primera en aparecer el pico máximo presentándolo al décimo día, seguido de la cepa PUGA que se presenta al décimo séptimo día; las cepas TEPIC y PARRA lo presentan al décimo noveno día; las cepas V2R y COMPOSTELA se observa su pico máximo al vigésimo día; seguido de la cepa PARRA 1 presentándolo en el vigésimo segundo día; la cepa NAYARIT presentó el pico máximo en el vigésimo sexto día, la cepa PR es la que más se tardó en aparecer el pico máximo ya que lo obtuvo al trigésimo primer día.

El orden de aparición en forma creciente de los picos máximos observadas en las gráficas de cinética de crecimiento de las cepas estudiadas fue la siguiente: VILLA, PUGA, TEPIC Y PARRA, V2R Y COMPOSTELA, PARRA 1, NAYARIT, PR.

En las tablas I y II se observa que la cepa COMPOSTELA fue la que presentó mayor cantidad de parásitos/cm³, seguido de las cepas V2R y PR. Las cepas TEPIC y PUGA fueron las que presentaron menor

cantidad de parásitos, demostrando su poca capacidad adaptativa en el medio de cultivo utilizado.

4.2.2 SUSCEPTIBILIDAD DE TRIATOMINOS A LA INFECCION CON *T. CRUZI*

Se tomaron las siguientes precauciones con el propósito de reducir las variables que pudieran modificar la susceptibilidad a la infección de las especies de triatominos:

- 1.- Se utilizaron ninfas de III estadio con ejemplares de edad semejante.
- 2.- Los insectos se mantuvieron bajo las mismas condiciones de humedad, temperatura y períodos de ayuno.

El período de incubación para llevar a cabo la revisión de las heces de los triatominos fue de 30 días, porque éste ha sido observado como el tiempo óptimo (Fistein et al., 1973; Marsden et al., 1969; Schenone et al., 1969; Székely et al., 1971), comunicaron que utilizando ninfas de V estadio de *Triatoma infestans* y alimentándolas sobre *Mus musculus* infectados con *Trypanosoma cruzi*, se infectaba un 92% de los insectos, a los 30 días, mientras que a los 90 días sólo el 25% de ellos presentaba la infección. Con ninfas de III estadio, Zeledón y col. reportaron un 64% de insectos a los 30 días y un 20% a los 90 días. Perlowagora y Muller en 1982, observaron que, después de los 30 días, la infección tendía a disminuir gradualmente, aunque durante el tiempo

de su observación siempre encontraron triatomino infectados (Perlawagora-Szumlewics et al., 1982).

Otro aspecto que es importante tener en consideración es el método de revisión de los triatomino utilizados. Se ha empleado la defecación espontánea, la compresión abdominal, la punción rectal, la disección de cada uno de los triatomino y el licuado de todos los insectos utilizados (técnica de Maekelt, citado por Cedillos et al., 1982). El método de la defecación espontánea consiste en alimentar a los insectos en un animal de experimentación que no esté infectado con *Trypanosoma cruzi*. Cuando éstos defecan espontáneamente se colectan las heces y se revisan al microscopio buscando flagelados; este procedimiento tiene el inconveniente de que la revisión se hace del conjunto de heces y no se puede identificar cuántos y cuáles triatomino se infectaron. La mayor ventaja de esta técnica es que los triatomino no son maltratados y se les puede revisar en varias ocasiones. La compresión abdominal es un buen método de revisión ya que las posibilidades de que los triatomino sufran daño son mínimas, y aquí sí se tiene la posibilidad de identificar cuántos y cuáles triatomino se han infectado. Por otro lado, es factible hacer revisiones posteriores de los triatomino que hayan resultado negativos en el primer examen. La punción rectal no es usada en la actualidad, pues es una técnica en la que hay que tener buen entrenamiento para no dañar a los triatomino y ofrece las mismas ventajas de la compresión abdominal.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

En este estudio, la técnica de revisión utilizada que se utilizó para la búsqueda de *Trypanosoma cruzi* fue de compresión abdominal por ser la más reproducible y confiable, además de permitir hacer revisiones posteriores en los triatominos.

Los porcentajes de infección mostraron diferencias entre las cepas aisladas de *Trypanosoma cruzi*, en la que se observa que las cepas NAYARIT y PARRA presentan el 90% de infección, seguido de la cepa COMPOSTELA con un 80%; las cepas VILLA y TEPIC presentan el 70%, seguidos de las cepas PARRA 1, V2R y PUGA con un 50%; la cepa PR fue la que presentó menor porcentaje de infección siendo 40%. Por lo que se deduce que la cepa que tiene mayor posibilidad de infectar al triatomino es la cepa NAYARIT y la de menor posibilidad la cepa PR.

La susceptibilidad a la infección de la especie estudiada fue expresada por los porcentajes de infección observados al buscar los tripomastigotes metacíclicos en las heces al hacer la observación directa al microscopio.

El porcentaje de infección es el parámetro más importante para establecer las diferencias en la susceptibilidad (Little et al., 1966; Mazzotti et al., 1940; Minter et al., 1977; Schenone et al., 1974)

Se utilizó *Triatoma pallidipennis* por ser la especie más susceptible a la infección para cepas aisladas en México (Alejandre et al.; a, b, 1993).

CAPITULO V

CONCLUSIONES

- 1.- Los nueve aislados de *Trypanosoma cruzi* en un medio de cultivo difásico mostraron diferencias en el tiempo de aparición del pico máximo de crecimiento y en el número de parásitos encontrados.

- 2.- No se encontró relación entre la susceptibilidad a la infección y la cinética de crecimiento de cada cepa, e excepción de la cepa PR que mostró el porcentaje más bajo de susceptibilidad y el mayor tiempo de aparición de su pico máximo de crecimiento.

- 3.- Se utilizó *Triatoma pallidipennis* por ser la especie de trietomino más susceptible a la infección por cepas aisladas en México.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- ALEJANDRE, A.R.; NOGUEDA, T.B.; CALVO, M.L.; CORTES, J.M., 1993. - Estudio comparativo de la susceptibilidad de cinco especies de triatomos (Insecta: Reduviidae) a la infección con *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Lat.-Amer Microbiol.*, 35: 201-206.
- 2.- ALEJANDRE, A.R., 1993.- Susceptibilidad de cinco especies de triatomos (Hemiptera: Reduviidae) a la infección con dos cepas de *Trypanosoma cruzi* aisladas de casos humanos. Tesis de Maestría. Depto. de Parasitología. ENCB-IPN.
- 3.- BITTENMOUNT, A.L.; et al., 1988.- Evaluation of Chagas' disease transmission through breast-feeding. *Mem.Inst.Oswaldo Cruz*, 83(1): 37-39.
- 4.- BRENER, Z., 1977.- Simposio sobre nuevos enfoques en la investigación de la Tripanosomiasis americana. *Bol. Of.Sanit.Panam.*, 83(2): 106-116.
- 5.- CARCAVALLO, U.R., 1987.- The subfamily Triatominae (Hemiptera, Reduviidae): Systematics and some ecological factors. Chapter 1 in Chagas' Disease Vectors. Volume I Taxonomic, Ecological, and Epidemiological aspects. CRC Press, Inc., Boca Raton Florida. pp 1-20.
- 6.- CEDILLOS, R.A.; et al., 1982.- Comparación de dos métodos de Laboratorio para examinar xenodiagnósticos. *Bol.Of Sanit.Panam* 92(1): 49-59.
- 7.- CORTES, J.M., 1970.- Aislamiento y estudio de un tripanosoma hallado en murciélago mexicano (*Leptonycteris:Phyllostomidae*) Tesis de Licenciatura. Depto. de Parasitología ENCB-IPN.
- 8.- CUBA, C.C.; et al., 1978.- Nuevos estudios comparativos entre *Dipetalogaster maximus* y *T. infestans* en el xenodiagnóstico de la infección chaagásica crónica humana. *Rev.Inst.Med.Trop. Sao Paulo*, 20(3): 145-151.
- 9.- DENERIS, J.; MARSHALL A.N., 1982.- Biological Characterization of strains of *Trypanosoma cruzi* Chagas isolated from a human case of Tripanosomiasis in California. Univ. of California, Berkeley.

- 10.- DIAS, J.C., 1985.- Doença de Chagas e a questão da tecnologia. *Bol. Of. Sanit. Panam.*, 99(3): 244-253.
- 11.- DIAS, J.C., 1987.- Control of Chagas disease in Brazil. *Parasitology Today*, 3(11): 336-341.
- 12.- DIAS, J.C., 1990.- Doença de Chagas clínica e terapêutica. Ministério da Saúde.
- 13.- ENCB - IPN, 1995. Manual de Parasitologia. Ed. ENCB - IPN. México, D.F.
- 14.- FIGUEIREDO, A.R.; JUNQUEIRA, A.C.V.; PEREIRA, B.J., 1989.- Comparative study of xenodiagnosis with two species (*P. megistus* and *T. infestans*) according to the nymphs instar, time of fast and blood meal. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Suppl. II Nov.; 84: 115.
- 15.- FISTEIN, B.; TALUKDER, M.A.; CHOWDHURY, M.N. & DEER, A.R., 1973.-Transmission of *Trypanosoma cruzi* by *Rhodnius prolixus* *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 67(2): 306.
- 16.- FORATTINI, O.P.; et al., 1976.- Study on the use of *Rhodnius neglectus* in xenodiagnosis in opossums (*Didelphis*). *Rev. Saude Publica Rec.*; 10(4): 335-343.
- 17.- GARCIA, E.S.; GILLIAM, F.C., 1980.- *Trypanosoma cruzi* development is independent of protein digestion in the gut of *Rhodnius prolixus*. *J. Parasitol.*, 66(6): 1052-1053.
- 18.- KREIER, J.P., 1977.- in parasitic protozoa, vol. I Taxonomy, Kinetoplastids, and flagellates of fish. Academic Press, New York. 1977.
- 19.- LAPIERRE, J., 1972.- Development and conservation of *Trypanosoma cruzi* in *Ornithodoros moubata*. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*, 47(1): 5-1.
- 20.- LAPIERRE, J., 1972.- Development of *Trypanosoma cruzi* (Tehuantepec) in *Triatoma megista*. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*, 47(1): 17-27.

- 21.- LENT, H.; WYGODZINSKY, P., 1979.- Bulletin of the American Museum of Natural History, 163(3).
- 22.- LITTLE, J.W.; TAY, J. & BIAGI, F., 1966.- A study on the susceptibility of triatomid bugs to some mexican strains of *Trypanosoma cruzi*. *J. Med. Ent.*, 3(3-4): 252-255.
- 23.- LORCA, M.; et al., 1983.- Infección por *Trypanosoma cruzi* en bancos de sangre en doce hospitales de Chile. *Bol. Of. Sanit. Panam.*, 95(4): 321-324.
- 24.- MARSDEN, P.D.; et al., 1969.- Some observations on xenodiagnosis with *Rhodnius prolixus* and *Triatoma infestans* in human infections with Bahian strains of *Trypanosoma cruzi*. *R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 63(4): 425-426.
- 25.- MAZZOTTI, L. & OSORIO, M.T., 1940.- Infección experimental por *Trypanosoma cruzi* en cuatro especies de triatomas. *Ciencia Mex.*, 113-114.
- 26.- MINTER, D.M.; MINTER-GOEDBLOED, E. & MARSHALL, T.F., 1978.- Comparative xenodiagnosis with three triatomine species of different host with natural and experimental chronic infections with *Trypanosoma (Schisotrypanum) cruzi*. *Trans.R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 72(1): 84-91.
- 27.- NEWS NOTES, 1989.- Acute Chagas' disease via blood transfusion. *TDR News*, No. 30.
- 28.- OLIVEIRA, F.M.G.P.; ARAUJO, M.M.S.; VENCIO, E.F. & LUQUETTI, A.O., 1988.- Oral route of transmission with *Trypanosoma cruzi* in mice. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz. Suppl. I* 83: 62.
- 29.- ORGANIZACION PANAMERICANA DE LA SALUD, 1984.- Situación de la enfermedad de Chagas en las Américas. *Bol. Of. Sanit. Panam.*, 96(3): 159-165.
- 30.- PERLAWAGORA-SZUMLEWICZ, A. & MÜLLER, C.A., 1982.- Studies in search of a suitable experimental insect model for xenodiagnosis of hosts with Chagas' disease 1. Comparative xenodiagnosis with nine triatomine species of animals with acute infections by *Trypanosoma cruzi*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 77(1): 37-53.

- 31.- PERLAWAGORA-SZUMLEWICZ, A. & MÜLLER, C.A., 1987.- Studies in search of a suitable experimental insect model for xenodiagnosis of hosts with Chagas' disease 2. Attempts to upgrade the efficiency and reliability of xenodiagnosis in chronic Chagas' disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 82(2): 259-272.
- 32.- PHILLIPS, N.R. & BERTRAM, D.S., 1967.- Laboratory studies of *Trypanosoma cruzi* infections. In *R. prolixus*, *T. infestans*, *T. protracta* y *T. maculata*, *J. Med. Ent.*, 4(2): 168-174.
- 33.- ROMANA, C., 1963.- Enfermedad de Chagas. López Libreros. Ed. B. Aires. 1a. Ed.
- 34.- SCHENONE, H.; ALFARO, E. & REYES, H., 1969.- Value of xenodiagnosis in acute and congenital Chagas disease. *Bol. Chil. Parasitol.*, 24(1): 105-106.
- 35.- SCHENONE, H.; ALFARO, E. & ROJAS, A., 1974.- Basis and yield of the xenodiagnosis in human Chagas infection (author's transl). *Bol. Chil. Parasitol.*, 29(1-2): 24-6.
- 36.- SCHMIDT, D. G. & ROBERTS, S.L., 1989.- Fundations of Parasitology. Mosby Company. :62-68.
- 37.- SZEKELY, R.; ROJO, M. & REYES, H., 1971.- Direct transmission of *Trypanosoma cruzi* between *Triatoma infestans* nymphs, *Bol. Chil. Parasitol.*, 26(1): 17-19.
- 38.- VALLEJO, C.M.S., 1989. Cultivo de *Trypanosoma cruzi*. Tesis de Licenciatura. Depto. de Parasitología ENCB-IPN.
- 39.- ZELEDON, R., 1987.- Life Cycle of *Trypanosoma cruzi* in the Insect Vector, Chapter 5, Volume II.
- 40.- ZUNA, H.; et al., 1985.- Estudio prospectivo de la transmisión del *Trypanosoma cruzi* por vía sanguínea, en Bolivia. *Ann. Soc. Belga Med. Trop. Suppl. I.* 65: 107-113.