

43
29.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE



EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

INFLUENCIA DEL PASE POR *Triatoma pallidipennis*
EN LA VIRULENCIA DE CEPAS MEXICANAS DE
Trypanosoma cruzi.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A :
ARTURO GARCIA ORTEGA



MEXICO, D. F.

267587

1998.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

JURADO ASIGNADO

Presidente:	Profa. Rosa María Ramírez Gama.
Vocal:	Prof. Abel Gutiérrez Ramos.
Secretario:	Prof. Marco Antonio Becerril Flores.
1er. suplente:	Profa. María Guadalupe Tsuzuki Reyes.
2do. suplente:	Prof. Misael González Ibarra.

Sitio donde se desarrolló el tema:

Laboratorio de Biología de Parásitos, Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM.

Asesor del tema:



M. en C. Marco Antonio Becerril Flores

Sustentante:



Arturo García Ortega

Este trabajo está dedicado en primer lugar a mis padres, Guillermina Socorro Ortega González y Arturo García Galaviz.

A mi hermana María Mayela García Ortega y a mi sobrina Diana Laura.

A Miriam.

A todos mis familiares, sin excepción alguna.

A todos mis amigos y amigas.

AGRADECIMIENTOS

Al M. en C. Marco Antonio Becerril Flores, quien hizo posible en gran medida la concreción exitosa de este estudio, gracias a su dirección atinada y a que siempre estuvo pendiente del desarrollo del mismo.

A la Dra. Paz María Salazar Schettino le agradezco su confianza y las facilidades otorgadas al permitir la realización de este trabajo en el laboratorio a su cargo.

A la M. en C. Gloria Rojas Wastavino, por su asesoría brindada para la elaboración de los cortes histológicos.

Al M.V.Z. José Agustín Jiménez Rodríguez, por su valiosa colaboración en el mantenimiento y manipulación de los triatóminos.

A Don Luis.

A todos mis compañeros del Laboratorio: Dra. Irene De Haro, M. en C. Maetha Bucio, M. en C. Margarita Cabrera, M. en C. Estrella Cervantes, Biól. Yolanda García, M.C. Adela Ruiz, Dalia, Lina, Luz María, Salvador, Consuelo y Evangelina.

A todo el personal académico, administrativo y laboratoristas de la Facultad de Química.

A la U.N.A.M.

ÍNDICE

	Pág.
1. INTRODUCCIÓN.	i
2. GENERALIDADES.	1
2.1. EPIDEMIOLOGÍA E IMPORTANCIA EN SALUD PÚBLICA DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS.	1
2.2. El <i>Trypanosoma cruzi</i> .	10
2.2.1. Ubicación taxonómica.	10
2.2.2. Fases morfológicas.	10
2.2.3. Ciclo biológico.	13
2.3. TRANSMISORES DE <i>Trypanosoma cruzi</i> .	16
2.3.1. Taxonomía.	16
2.3.2. Características generales de los triatóminos.	17
2.3.3. Fases de desarrollo.	18
2.3.4. Capacidad transmisora.	22
2.3.5. Distribución geográfica en México.	23
2.3.6. <i>Triatoma pallidipennis</i> (Stål, 1872).	26
2.4. VIRULENCIA DE <i>Trypanosoma cruzi</i> .	27
2.5. FACTORES QUE INFLUYEN EN LA VIRULENCIA DE <i>T. cruzi</i> .	28
3. HIPÓTESIS.	30
4. OBJETIVOS.	31
5. DISEÑO EXPERIMENTAL.	32

6. MATERIAL Y MÉTODOS.	33
6.1. CEPAS DE <i>Trypanosoma cruzi</i> .	33
6.2. INFECCIÓN DE TRIATÓMINOS CON LAS DIFERENTES CEPAS DE <i>T. cruzi</i> .	33
6.3. DENSIDAD PARASITARIA DE LAS CEPAS DE <i>T. cruzi</i> EN LAS HECEC DE LOS TRIATÓMINOS.	35
6.4. DETERMINACIÓN DE LA METACICLOGÉNESIS DE LAS CEPAS DE <i>T. cruzi</i> EN LOS TRIATÓMINOS.	36
6.5. ALIMENTACIÓN DE LOS TRIATÓMINOS.	37
6.6. INFECCIÓN DE RATONES CON DIFERENTES CEPAS DE <i>T. cruzi</i> .	37
6.7. DETERMINACIÓN DE CURVAS DE PARASITEMIA.	39
6.8. HISTOTROPISMO DE LAS CEPAS DE <i>T. cruzi</i> EN RATONES.	39
7. RESULTADOS.	42
7.1. DENSIDAD PARASITARIA.	42
7.2. METACICLOGÉNESIS DE LAS CEPAS DE <i>T. cruzi</i> EN LOS TRIATÓMINOS.	45
7.3. PORCENTAJE DE MORTALIDAD.	49
7.4. DETERMINACIÓN DE CURVAS DE PARASITEMIA.	53
7.5. DETERMINACIÓN DEL HISTOTROPISMO DE LAS CEPAS DE <i>T. cruzi</i> .	58
8. DISCUSIÓN.	62
9. CONCLUSIONES.	69
10. BIBLIOGRAFÍA.	70
11. APÉNDICE.	76

1. INTRODUCCIÓN.

La enfermedad de Chagas es una parasitosis causada por el protozoo *Trypanosoma cruzi*, que afecta al hombre y a animales de sangre caliente; la infección ocurre principalmente al nivel del miocardio, esófago y colon. El mecanismo más frecuente de transmisión del parásito al hombre es a través de las materias fecales de los triatóminos infectados con el *T. cruzi*, lo cual se debe a la capacidad de estos insectos hematófagos para colonizar la vivienda humana.

La enfermedad de Chagas, exclusiva del continente americano, constituye un grave problema de Salud Pública en Latinoamérica. En la República Mexicana se considera como área endémica del padecimiento a las dos terceras partes del territorio nacional, debido al hallazgo de triatóminos infectados por *T. cruzi* en diversas zonas del país.

Existe una gran variedad de triatóminos en México distribuidos ampliamente en todo el país, de los cuales, el género *Triatoma* es el más abundante con 25 especies. Las especies *Triatoma barberi* y *Triatoma dimidiata* son consideradas como las mejores transmisoras de *Trypanosoma cruzi*, debido a su marcada antropofilia y a sus hábitos peridomésticos y domésticos. El *Triatoma pallidipennis* es una especie cuyo potencial de transmisión de *T. cruzi* al hombre no está determinado con precisión, a pesar de que se conoce su alta susceptibilidad a la infección con *T. cruzi* y de que habita en casi todos los estados del centro del país, en donde se le ha encontrado en ambientes domésticos y peridomésticos, incluyendo viviendas y hoteles de zonas urbanas.

Uno de los principales problemas que se presentan para el diagnóstico y tratamiento de esta enfermedad, es que puede manifestarse en distintas formas, desde una infección aguda y fulminante, hasta una inaparente, crónica y asintomática. Estas diferencias en la patogenicidad del parásito en el huésped vertebrado están determinada por una gran cantidad de factores, entre los que destacan su heterogeneidad genética, la interacción del protozooario con el propio huésped y el microambiente en el que se ha desarrollado el *T.cruzi* previamente a la infección.

El presente estudio evalúa la virulencia en ratones de distintas cepas mexicanas de *Trypanosoma cruzi* después de pasar por una especie de transmisor (*Triatoma pallidipennis*), para determinar si la patogenicidad de estas cepas se ve modificada por su desarrollo en el insecto.

2. GENERALIDADES.

2.1. EPIDEMIOLOGÍA E IMPORTANCIA EN SALUD PÚBLICA DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS.

La enfermedad de Chagas deriva su nombre del investigador brasileño, el Dr. Carlos Ribeiro Justiniano Das Chagas, quien describió por primera vez al agente causal en 1909¹; conocida también como tripanosomosis americana por ser una enfermedad exclusiva de este continente, es una parasitosis causada por el protozoo flagelado *Trypanosoma cruzi*.

La infección con *Trypanosoma cruzi* es común entre los pequeños mamíferos y marsupiales nidificadores de América, los cuales actúan como reservorios del parásito. A menudo, los nidos de dichos animales están infestados con especies selváticas de insectos de la familia Reduviidae, que son los triatóminos, llamados también chinches hociconas, y cuya principal característica es su hematofagia obligada. Al ingerir sangre de un mamífero infectado, la chinche contrae al parásito, el cual se establece en su intestino, permaneciendo la infección durante toda la vida del insecto². De este modo, los triatóminos se convierten en los transmisores de *Trypanosoma cruzi*.

Trypanosoma cruzi se transmite al hombre de diversas maneras, pero principalmente a través de las materias fecales de los triatóminos infectados. Cuando un triatómino se alimenta sobre su huésped mamífero, la sangre ingerida puede provocar la defecación del

insecto; los tripanosomas presentes en el excremento penetran entonces en cualquier herida, abrasión de la piel, o a través del orificio que deja la picadura del insecto. Esta forma de transmisión es la más frecuente en la naturaleza² (tabla 1).

Otros medios de transmisión son: la transfusión sanguínea, el trasplante de órganos de donadores infectados, la transmisión congénita por vía transplacentaria desde madres infectadas, la ingestión de animales silvestres mal cocidos y las infecciones accidentales en el laboratorio³.

Vía de transmisión	Porcentaje
Transmisión por vectores	>80%
Transmisión por transfusión de sangre	16%
Transmisión congénita	2%
Otras vías (oral, trasplante de órganos, accidente de laboratorio)	<1%

Tabla 1. Estimación de las tasas de transmisión de *Trypanosoma cruzi* al hombre, expresadas en porcentajes de la incidencia total².

A la penetración de *T. cruzi* en el organismo, sigue un periodo de incubación que suele durar entre 4 y 10 días⁴, para después presentarse la fase aguda de la enfermedad de Chagas, que tiene una duración de 2 a 4 meses, durante la cual pueden observarse los siguientes síntomas: fiebre elevada intermitente, miocarditis, hepatoesplenomagalia y crecimiento de los ganglios linfáticos⁴. Si la transmisión del parásito se llevó a cabo por triatóminos, en ocasiones aparece una inflamación localizada en el sitio de entrada, denominada chagoma

de inoculación, cuyos signos y síntomas son diferentes según sea el lugar de penetración; cuando dicho punto está cerca del ojo, se produce una celulitis periostálmica rojiza, indolora, acompañada de un edema bpalpebral unilateral característico, al que se le conoce como **signo de Romaña-Mazza**³. Sin embargo, en ocasiones la fase aguda de la enfermedad cursa de manera asintomática⁵. Durante esta etapa, ocurre un 10-15% de mortalidad entre los individuos afectados, sobre todo entre la población infantil⁵.

Al término de la fase aguda, desaparece la sintomatología durante un período que dura entre 10 y 20 años, al que se le conoce como **fase de latencia o fase indeterminada**³. Se ha estimado que de todos los individuos que padecen la fase de latencia de la enfermedad, aproximadamente un 30-40% de los mismos desarrollarán la forma crónica³.

La **fase crónica** de la enfermedad de Chagas es la forma que la hace trascendente, ya que incapacita al individuo y puede ocasionarle la muerte³. Durante esta etapa, los parásitos penetran y se multiplican en el interior de las células de los órganos, mostrando una predilección por el tejido muscular, ya sea liso o estriado, así como también por el tejido nervioso (neuroectodermo), causándoles daños irreversibles que impiden su funcionamiento adecuado⁷. Las entidades clínicas más frecuentes son las miocardiopatías, provocadas por la destrucción de las células nerviosas ganglionares del corazón, que conduce a la presentación de arritmias cardíacas^{5,8}. Además, cuando los parásitos invaden los órganos del sistema digestivo, pueden presentarse las megavisceras (megaesófago, megacolon) como resultado de la desnervación que se produce por la destrucción del plexo mioentérico, causando dificultades para deglutir y un tránsito deficiente de las heces⁸. Los síntomas más comunes de la fase crónica son palpitaciones, mareos y disnea, y la muerte súbita puede ocurrir ya sea por insuficiencia cardíaca o por distorsión intestinal⁸.

La enfermedad de Chagas constituye uno de los problemas más serios de Salud Pública en América⁵. *Trypanosoma cruzi* y sus transmisores están distribuidos en todo el continente americano y algunas islas del caribe, aproximadamente entre las latitudes 42N y 46S, zona que comprende desde el sur de EUA hasta la provincia de Río Negro en el sur de Argentina². Sin embargo, la gran mayoría de los casos de infección se reportan en los países de Latinoamérica³ (mapa 1).

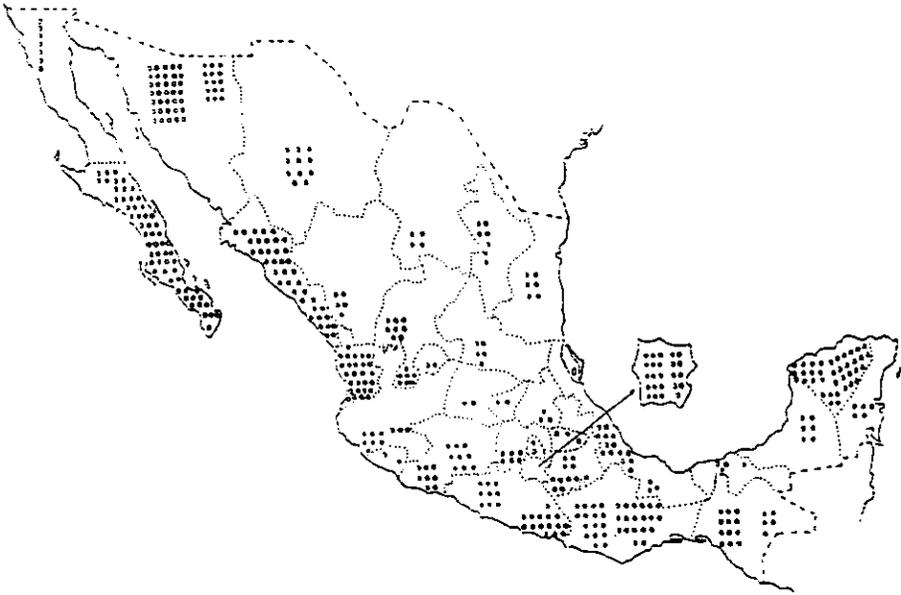


Mapa 1. Distribución de la enfermedad de Chagas en América³.

La enfermedad de Chagas afecta particularmente a individuos que habitan viviendas inadecuadas en zonas rurales y suburbanas de Latinoamérica^{2,3,5}, sin embargo, debido a que la hemotransfusión constituye el segundo mecanismo más frecuente de adquisición de la enfermedad, también puede presentarse en los grandes centros urbanos^{2,5}. Al igual que todas las parasitosis, la enfermedad de Chagas está ligada a la pobreza y desde 1970 fue declarada por la OPS (Organización Panamericana de la Salud) como enfermedad social, debido a sus profundas implicaciones socioeconómicas³.

Estimaciones recientes de la OMS indican que existen de 16 a 20 millones de personas infectadas con *T. cruzi*, y aproximadamente otras 100 millones expuestas al riesgo de infectarse⁹. Asimismo, el impacto social y económico que tiene la enfermedad de Chagas a nivel global se puede apreciar en estimaciones del Banco Mundial (1993), en donde se sitúa en tercer lugar en el mundo, dentro de las enfermedades parasitarias que provocan discapacidad⁹. En Latinoamérica, se encuentra en cuarto lugar de importancia por discapacidad, solo después de enfermedades respiratorias, diarreas y SIDA².

En México, la enfermedad de Chagas está ampliamente distribuida en forma multifocal en todo el país; el hallazgo de triatóminos infectados con *T. cruzi* desde 0 a 2400 m snm, sugiere que las dos terceras partes del territorio nacional pueden considerarse como zona endémica del padecimiento¹⁰ (mapa 2).



Mapa 2. Número de colectas de triatóminos efectuadas en cada estado de la República Mexicana hasta 1991¹². ●=Triatóminos infectados con *T. cruzi*. ○=Triatóminos no infectados.

La diversidad de triatóminos que existen en México (siete géneros y 26 especies), junto con la presencia de animales infectados naturalmente con *T. cruzi* como el perro (*Canis familiaris*), el tlacuache (*Dydelphis marsupialis*) y el ratón (*Mus musculus*), que son los reservorios del parásito encontrados con mayor frecuencia, así como las condiciones de las viviendas que se ubican en las zonas rurales, constituyen los factores que determinan la alta prevalencia de la enfermedad de Chagas en nuestro país¹⁰.

Hasta 1990, se han reportado en nuestro país 320 casos agudos sintomáticos, alrededor de 300 casos crónicos con miocardiopatía dilatada y unos 20 casos de megavísceras digestivas, todos ellos diagnosticados mediante técnicas parasitológicas como son: examen directo, cultivo en animales de laboratorio, xenodiagnóstico y estudios de biopsias y necropsias¹⁰. Los estados de la República Mexicana en donde se ha encontrado el mayor número de los casos anteriores son los de Chiapas y Jalisco con 44 casos cada uno, así como Yucatán con 33 y Zacatecas con 12¹⁰ (tabla 2).

Con respecto a la magnitud de la infección, se realizó una encuesta seroepidemiológica nacional en 1989, en donde fueron utilizadas las técnicas de HAI e IFI, con título de corte 1:32 para la dilución sérica. La encuesta incluyó muestras de 70,000 individuos de ambos sexos y todas las edades, en población rural y urbana de todo el país; los resultados indicaron una seroprevalencia del 0.6%, lo que sugiere que aproximadamente 540,000 individuos están infectados con *T. cruzi*¹¹ (tabla 3).

Encuestas centinelas realizadas en bancos de sangre de 11 estados de la República revelaron un 1.5 % de hemodonantes infectados¹¹. Debido a que en México se realizan 850,000 transfusiones al año en promedio, se calcula que, de no aplicarse un tamizaje adecuado de las muestras, unos 1,300 individuos se infectarían con *T. cruzi* por este mecanismo, de los cuales 500 podrían desarrollar miocardiopatía chagásica con el tiempo¹¹ (tabla 3).

No. De casos	Localidad	Investigador(es)	Año
2	Tejomulco, Oaxaca	Mazzotti	1940
2	Mérida, Yucatán	Palomo	1947
1	Tutuapan, Edo. De México	Biagi y Tay	1958
1	Guaymas, Sonora	Palencia y Montaña	1959
1	Atoyac de Alvarez, Guerrero	Rodríguez y cols.	1961
1	Mixteca Baja, Oaxaca	Tay y cols.	1961
1	Tetillán, Guerrero	Biagi y Tay	1964
1	Compostela, Nayarit	Pérez Reyes y cols.	1964
1	Tierra Blanca, Veracruz	Fernández y cols.	1965
1	El Limón, Oaxaca	Biagi y cols.	1965
1	Tututepec, Oaxaca	Biagi y cols.	1965
1	Tuxpan, Michoacán	Tay y Navarrete	1966
5	Tepechitlán y Jaipa, Zacatecas; Chimatlán, Sta María de los Angeles, Jalisco y Acatlán Jalisco.	Cuartero y cols.	1967
2	Tonalá, Jalisco	Velasco y Tellaèche	1967
1	Acatlán de Juárez, Jalisco	Velasco y cols	1970
1	Chila, Oaxaca	Goldsmith y cols.	1971
1	Tepechitlán, Zacatecas	Martínez-Marañón	1972
1	Jojutla, Morelos	González y cols.	1972
1	Hunucma, Yucatán	Zavala y cols.	1973
3	Atotonilco, Jalisco	Velasco y Tay	1974
2	Atotonilco, Jalisco	CNEP y Tellaèche	1974
6	Muna, Tzincab, Yucatán	Quintal y Zavala	1975
74	Varias localidades	CNEP	1976
8	León Brindis, Palenque, Chiapas	Ortega y cols.	1976
3	Agua Azul, Chilón, Chiapas	Ortega y cols.	1976
2	Atotonilco, Jalisco	CNEP y Tellaèche	1976
1	Ameca, Jalisco	CNEP y Tellaèche	1976
1	Colotlán, Jalisco	CNEP y Tellaèche	1976
1	Bolaños, Jalisco	CNEP y Tellaèche	1976
1	Guadalajara, Jalisco	CNEP y Tellaèche	1976
1	Acotlán, Jalisco	CNEP y Tellaèche	1976
1	Magdalena, Jalisco	Velasco y cols.	1976
18	Yucatán	Zavala y cols.	1977
8	Zacoalco de Torres, Jalisco	Tay y Salazar	1979
1	San Juan Colorado, Oaxaca	Salazar y cols.	1979
2	Arandas, Jalisco	Velasco y cols.	1982
3	Atoyac, Jalisco	Velasco y cols.	1983
1	Tomaltepec, Oaxaca	Salazar y cols.	1984
4	Miahuatlán, Jalisco	Tay y cols.	1985
5	Santiago Yosotiche, Oaxaca	Cortéz y cols.	1985
10	Tuxcueca, Jalisco	Velasco y cols.	1986
1	Cocula, Jalisco	Depto. Sal. Públ. Jalisco	1986
2	Sayula, Jalisco	Depto. Sal. Públ. Jalisco	1986
1	Tareta, Michoacán	Gutiérrez y Tay	1987
1	Culiacán, Sinaloa	Candil	1990

187 casos

Tabla 2. Relación por localidades de casos humanos de trypanosomosis americana comprobados en México hasta 1991¹⁰.

	Prevalencia en Población General (Enero, 1987)			Prevalencia en Hemodonantes (INDRE 1993-95)	
	Porcentaje de seropositivos			Porcentaje de hemodonantes infectados	
	n	HAI 1:8	HAI-IFI 1:32	n	%
Hidalgo	2005	3.2	1.5	1388	3.24
Jalisco	3630	0.1	0.1	592	3.20
Oaxaca	1418	4.6	0.9	2088	2.15
Yucatán	1812	1.5	0.0	2052	1.60
Veracruz	2213	3.0	0.4	996	1.10
D.F.	2598	0.8	0.2	2300	0.94
Tabasco	3942	2.3	0.1	727	0.82
Nuevo León	3747	2.1	0.2	431	0.48
Guerrero	1519	1.7	0.1	630	0.47
Chihuahua	2159	0.6	0.1	1192	0.16
Chiapas	1714	5.0	3.0	186	0.0
Total/promedio	26 757	2.48	0.6	12582	1.49

Tabla 3. Resultados comparativos en la detección de anticuerpos anti *Trypanosoma cruzi* en población general y hemodonantes en México, mediante las técnicas de hemaglutinación e inmunofluorescencia indirecta en 11 estados en donde se realizó tamizaje anti *T. cruzi* en hemodonadores".

n=Población muestral.

HAI 1:8= Prueba filtro. Se considera infectado a todo individuo positivo con este título.

HAI-IFI 1:32= Prueba confirmatoria. La asociación HAI-IFI con este título de corte es precisa en un 99%.

%= Porcentaje de hemodonantes infectados.

2.2. El *Trypanosoma cruzi*.

2.2.1. Ubicación taxonómica.

La familia **Trypanosomatidae**, a la cual pertenece *Trypanosoma cruzi*, se encuentra dentro del orden **Kinetoplastida**, compuesto por organismos flagelados que poseen un organelo denominado cinetoplasto, estructura constituida por una red fibrosa de DNA localizada en la mitocondria de la célula. La ubicación taxonómica de *T. cruzi* es la siguiente¹²:

REINO: Protozoa

PHYLUM: Sarcomastigophora

SUBPHYLUM: Mastigophora

CLASE: Zoomastigophora

ORDEN: Kinetoplastida

FAMILIA: Trypanosomatidae

GENERO: *Trypanosoma*

ESPECIE: *T. cruzi*

2.2.2. Fases morfológicas.

Dependiendo del ambiente en el que se encuentre, *T. cruzi* se presenta en la naturaleza principalmente en tres estadios morfológicos: tripomastigote, epimastigote y amastigote¹³; otras formas transicionales de las anteriores pueden encontrarse en el tracto digestivo y en las deyecciones de los insectos transmisores^{14,15}.

Tripomastigote: es una forma no replicativa de aspecto fusiforme, que mide aproximadamente 20 μm de largo y 2 μm de ancho, con el núcleo situado en la parte central de la célula¹²; en el polo posterior de la misma se localiza el cinetoplasto, de donde surge un flagelo que se extiende a todo lo largo del organismo, formando una membrana ondulante¹⁵ (fig 1).

En los mamíferos infectados, se encuentra extracelularmente en la circulación sanguínea, principalmente durante la fase aguda, presentando forma de "U", "C" ó "S", que se conoce como **tripomastigote sanguíneo**³.

En los triatóminos infectados, los tripomastigotes se localizan extracelularmente en la luz del intestino posterior, y poseen una forma más delgada y recta, denominada **tripomastigote metacíclico**¹⁴. Esta fase es depositada junto con las heces cuando el insecto defeca, y constituye la forma infectante para el huésped vertebrado^{13,14}.

Epimastigote: es una forma alargada, que mide de 20-40 μm de longitud, cuyo cinetoplasto se encuentra situado cercano al núcleo; también posee una membrana ondulante y un flagelo que queda libre hacia el extremo de la célula¹³ (fig 2).

Los epimastigotes se localizan en el lumen del intestino medio de los triatóminos, en donde se dividen activamente por fisión binaria, manteniendo perenne la infección en dichos insectos¹⁴. A estas formas también se les puede encontrar en los medios de cultivo axénicos¹⁶.

Amastigote: es una célula de forma esférica u ovoide, de 2-7 μm de diámetro, que tiene un flagelo libre muy corto¹³ (fig 3).

Los amastigotes constituyen la fase intracelular de *T. cruzi* en el huésped vertebrado, se dividen por fisión binaria en un tiempo aproximado de 12 h, formando grupos de 4 a 60 parásitos denominados “nidos” en los tejidos de los mamíferos infectados^{5,7}.

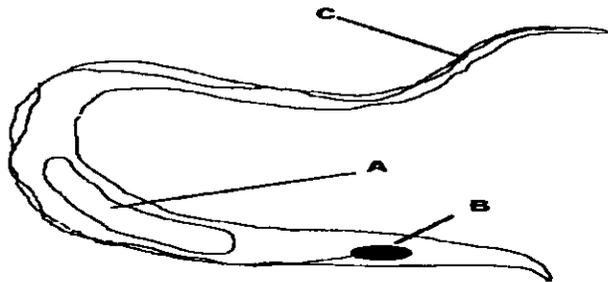


Figura 1. Representación esquemática de un tripomastigote: **A**=núcleo, **B**=cinetoplasto, **C**=flagelo.

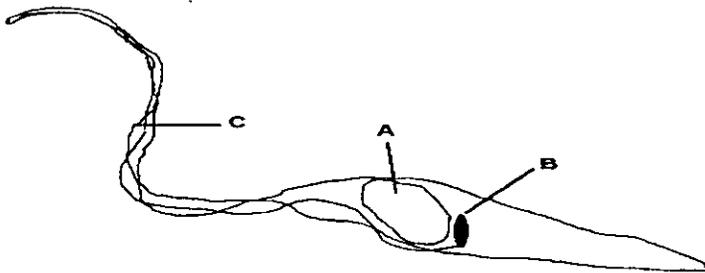


Figura 2. Representación esquemática de un epimastigote: **A**=núcleo, **B**=cinetoplasto, **C**=flagelo.

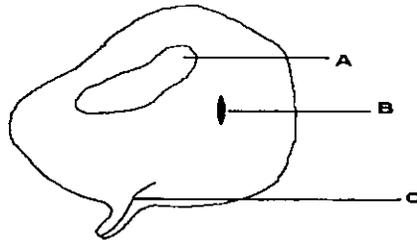


Figura 3. Representación esquemática de un amastigote: **A**=núcleo, **B**=cinetoplasto, **C**=flagelo.

2.2.3. Ciclo Biológico.

El ciclo biológico de *T. cruzi* inicia cuando un triatómino se alimenta con sangre de un mamífero infectado que presenta parasitemia; los tripomastigotes sanguíneos ingeridos pasan a la luz del intestino medio del insecto y se transforman en epimastigotes, que se multiplican activamente por fisión binaria longitudinal.

Algunos epimastigotes llegan al intestino posterior del triatómino, fijándose a la pared rectal en donde, además de dividirse, sufren cambios estructurales que dan origen a los tripomastigotes metacíclicos.

Si un triatómino ingiere sangre de un mamífero hasta la repleción, puede defecar al mismo tiempo, expulsando junto con las heces a los tripomastigotes metacíclicos, que son capaces de penetrar a través de la piel por el sitio de la picadura, o bien penetrar por las mucosas.

Ya en el mamífero, los tripomastigotes metacíclicos invaden las células (cualquier célula nucleada es susceptible de invasión), transformándose en amastigotes, que son capaces de dividirse por fisión binaria en el citoplasma de la célula huésped. En el interior de la célula

puede ocurrir que debido a la multiplicación sostenida de los amastigotes, la célula se rompa y los libere, para transformarse en tripomastigotes en el exterior, o bien que los amastigotes se transformen allí mismo, dentro de la célula, en tripomastigotes¹⁶; cualquiera que sea la forma en que suceda, los tripomastigotes originados salen de la célula infectada para penetrar a las células adyacentes, o pueden diseminarse por todo el organismo a través de la circulación sanguínea^{13,14}.

El ciclo biológico se completa cuando un triatómino libre de infección se alimenta de un mamífero infectado con *T. cruzi*, succionando a los tripomastigotes sanguíneos presentes en la circulación^{13,14,17} (fig 4).

El protozoo *Trypanosoma cruzi* está constituido por un conjunto de poblaciones que circulan entre seres humanos, artrópodos transmisores y reservorios animales; se utiliza el término **cepa** para designar a una población específica que ha sido aislada de un huésped cualquiera y caracterizada en el laboratorio, sin importar la metodología utilizada¹⁸.

Existe una gran variabilidad en el comportamiento de las cepas de *T. cruzi* tanto *in vivo* como *in vitro*^{18,19}. Una de las características principales que varían entre las cepas es el grado de patogenicidad que presentan en un huésped determinado¹⁸; en el hombre, por ejemplo, la enfermedad de Chagas puede manifestarse en distintas formas¹⁹. Este fenómeno se debe a que los individuos que integran a las distintas poblaciones del parásito son genéticamente heterogéneos, lo cual da lugar a una diversidad fenotípica que repercute en la virulencia de las cepas^{18,19,20}.

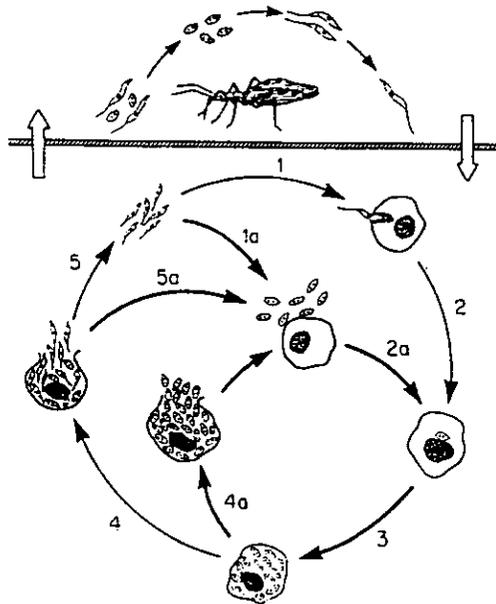


Figura 4. Ciclo biológico de *Trypanosoma cruzi*¹⁷.

Cuando el insecto transmisor se alimenta con la sangre de un mamífero infectado ingiere tripomastigotes sanguíneos (flecha, arriba a la izquierda), los cuales en la luz del intestino del insecto se transforman en epimastigotes, que son formas replicativas no infectivas. Los epimastigotes se diferencian a tripomastigotes metacíclicos, que son expulsados junto con las heces del insecto y entran al huésped vertebrado a través del orificio de la picadura (flecha, arriba a la derecha). Los tripomastigotes metacíclicos invaden las células del huésped (paso 1); escapan de la vacuola formada y se transforman en amastigotes (paso 2); se replican en el citoplasma (paso 3) y se diferencian a tripomastigotes sanguíneos (paso 4), que son liberados por la ruptura de la célula huésped (paso 5). Un subciclo alternativo puede ocurrir en el huésped vertebrado cuando los amastigotes, ya sean aquellos derivados de la ruptura prematura de la célula huésped (pasos 4a, 5a) o los que se diferenciaron extracelularmente en tripomastigotes (paso 1a), son ingeridos por macrófagos, en donde los parásitos pueden sobrevivir y completar el ciclo intracelular.

2.3. TRANSMISORES DE *Trypanosoma cruzi*.

2.3.1. Taxonomía

Los insectos que usualmente se conocen como chinches se ubican dentro del orden **Hemiptera**, cuyos miembros se caracterizan por poseer piezas bucales largas y delgadas, adaptadas para succionar líquidos nutritivos de diverso origen²¹. El orden Hemiptera se divide en dos subórdenes, que son **Homoptera** y **Heteroptera**²¹.

La mayoría de los hemípteros son fitófagos o depredadores de invertebrados; sin embargo, dentro del suborden **Heteroptera** existen cuatro familias que incluyen especies hematófagas obligadas: la familia Cimicidae, a las que pertenecen las chinches de cama (*Cimex lectularius* y *Cimex hemipterus*) que se alimentan del hombre; la familia Polyctenidae, cuyas formas se alimentan exclusivamente de murciélagos; la familia Lygidae y la familia Reduviidae, compuesta en su mayoría por especies depredadoras de otros invertebrados²¹. Dentro de la familia **Reduviidae** se encuentra una subfamilia cuyos representantes son hematófagos obligados en su totalidad (115 especies), especializados en la succión de sangre de aves y mamíferos: la subfamilia **Triatominae**²¹.

La subfamilia **Triatominae** se divide en cinco tribus³:

1. *Bolboderini*, que agrupa a tres géneros:

Bolboder (una especie)

Belminus (tres especies)

Parabelminus (una especie)

2. *Cavernicolini*, posee un género y una especie:

Cavernicola pilosa

3. *Rhodniini*, con dos géneros:

Psammolestes (tres especies)

Rhodnius (diez especies)

4. *Alberproseniini*, un género y una especie

Alberprosenia goyovargasi

5. *Triatomiini*, con siete géneros:

Panstrongylus (doce especies)

Dipetalogaster (una especie)

Paratriatoma (una especie)

Neotriatoma (una especie)

Nesotriatoma (una especie)

Linchosteus (una especie)

Triatoma (114 especies)

Sin embargo, aún no existe consenso entre los taxonomistas acerca del número exacto de tribus, géneros y especies, que oscila entre 5-7, 14-15 y 109-115, respectivamente²⁰.

En el continente americano se localizan 13 géneros y 105 especies de triatóminos, de los cuales más de la mitad de las especies se han encontrado infectadas naturalmente con *T. cruzi*.

2.3.2. Características generales de los triatóminos.

Los triatóminos son insectos cuyo cuerpo está segmentado en cabeza, tórax y abdomen, lo que les da una forma característica (fig 5). Su tamaño es variable, ya que va desde 5 mm de largo de *Alberprosenia goyovargasi* de Venezuela en la fase adulta, hasta 45 mm de largo de *Dipetalogaster maxima* de México en dicha fase².

Generalmente su cuerpo es de color marrón o negro, aunque muchas especies poseen bandas de colores como el amarillo, rojo, naranja o rosa en el conxivo, nombre con el que se designan a las porciones laterales de los segmentos abdominales. Su característica principal es la proboscis de tres segmentos (fig 6), de donde los triatóminos toman su nombre: tri=tres, tomos=partes; dicha estructura es recta y delgada, adaptada para perforar el integumento blando de los vertebrados, a diferencia de la proboscis que poseen los demás miembros de la familia Reduviidae, dividida en cuatro segmentos, rígida y curva, porque está adaptada para perforar el duro integumento de otros artrópodos².

Como consecuencia de su hematofagia obligada, los triatóminos habitan en las cercanías de sus huéspedes vertebrados: nidos de aves, madrigueras de zarigüeyas, montones de rocas, árboles huecos, nidos de pequeños roedores, cuevas con murciélagos y en general, cualquier lugar que los proteja del clima y asegure su acceso a una fuente permanente de alimento². Algunas especies también invaden y colonizan ambientes peridomésticos tales como gallineros y corrales para el ganado, y algunas otras han realizado la transición para colonizar las viviendas humanas^{2,5}.

La mayoría de las especies de triatóminos se alimentan de noche, cuando sus huéspedes vertebrados están dormidos².

2.3.3. Fases de desarrollo.

Los triatóminos llevan a cabo un ciclo vital exopterigoto, es decir que su desarrollo postembrionario se realiza en forma gradual, iniciando con el huevo para luego dar lugar a cinco estadios ninfales, hasta finalmente alcanzar la talla adulta (fig 7) junto con la madurez del aparato reproductor que permite la diferenciación entre machos y hembras².

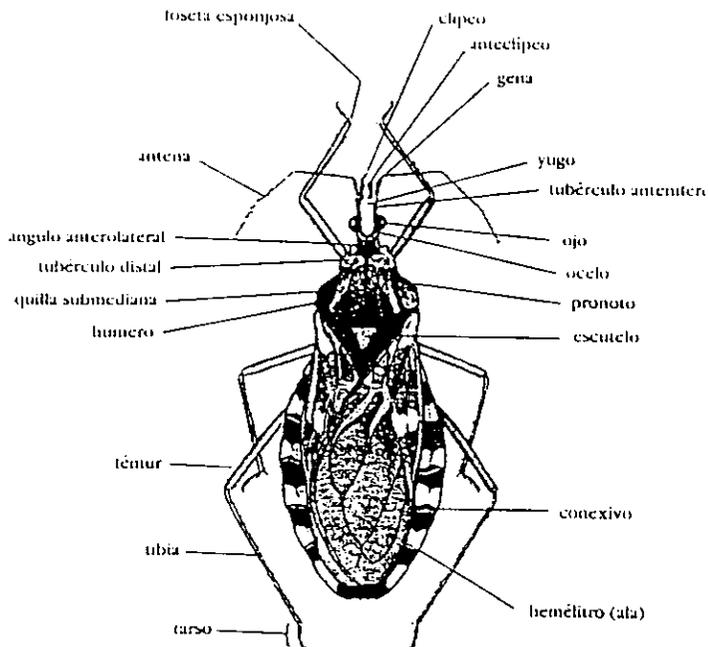


Figura 5..Morfología externa de un triatómino adulto macho².

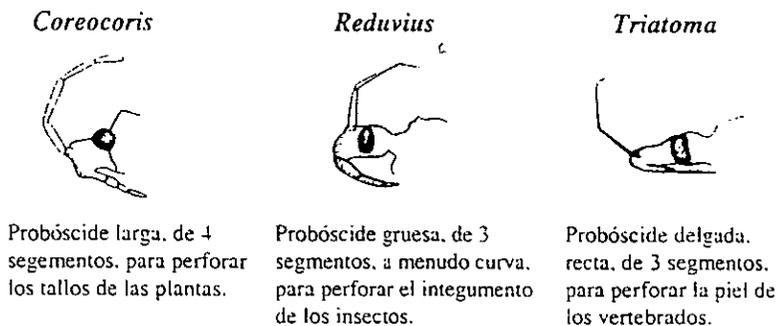


Figura 6. Vistas laterales de las cabezas de hemipteros fitófagos, predatorios y hematófagos, mostrando los aparatos bucales adaptados de diferentes maneras².

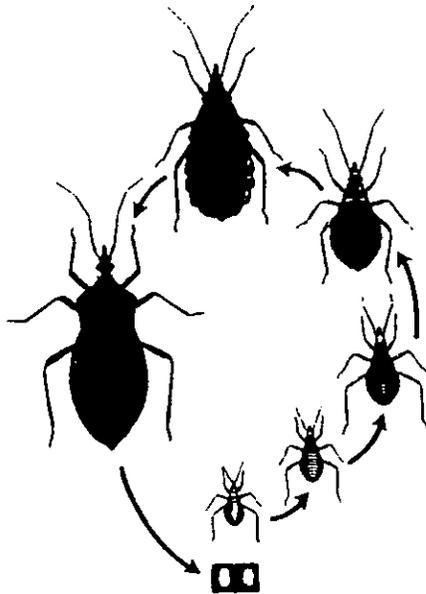


Figura 7. Ciclo vital de un triatómino (*Panstrongylus*)².

Huevo.

Los huevos de los triatóminos son de forma ovoide y están operculados, son de un color blanco o rosado, que se torna más oscuro a medida que el embrión se desarrolla. Eclosionan al cabo de 10-40 días después de su oviposición, tiempo que depende de la especie que se trate, así como de la temperatura ambiental². Su estructura superficial es compleja, y se utiliza como criterio para la clasificación taxonómica de los triatóminos².

Estadios ninfales.

Las ninfas de primer estadio recién eclosionadas del huevo son blandas, de color rosado, y son capaces de alimentarse de sangre a los 2-3 días post-eclosión, cuando su cutícula ya se ha endurecido; pueden sobrevivir por varias semanas sin alimento. Los estadios ninfales sucesivos ya presentan el cuerpo pigmentado como el de los adultos, y se diferencian entre sí únicamente por pequeños detalles morfológicos, como son el ancho de las patas, la forma del tórax o el tamaño y posición que ocupan las alas conforme van apareciendo.

Todos los estadios ninfales ocupan el mismo habitat que los adultos, así como también utilizan los mismos recursos alimenticios; la frecuencia en la alimentación y la cantidad de sangre ingerida, son factores que determinan el momento de la muda hacia el siguiente estadio².

Adultos.

Los triatóminos adultos se distinguen de las ninfas debido a que sus órganos genitales están bien desarrollados, al igual que las alas, que presentan un tamaño mayor, y por la presencia de ocelos, estructuras similares a los ojos, situadas en la región anterocular de la cabeza.

Por lo general, la hembra es más grande que el macho, y posee órganos genitales visibles e inequívocos².

Las hembras oviponen generalmente a los 10 ó 20 días después de la primera cópula exitosa, y cada hembra puede depositar de 100 a 600 huevos durante toda su vida adulta, que tiene una duración de 2-12 meses, dependiendo de la especie y de la cantidad de sangre que ingiera².

2.3.4. Capacidad transmisora.

Los triatóminos son insectos hematófagos que se alimentan de una amplia variedad de especies de mamíferos, aves y reptiles; para asegurar su acceso permanente a una fuente de sangre de vertebrado, estos artrópodos colonizan los nidos y madrigueras que habitan dichos animales. El hecho de que los triatóminos succionen sangre únicamente en un ecotopo silvestre determinado, permite que se establezca una estrecha asociación natural entre *T. cruzi*, el artrópodo transmisor y el huésped vertebrado, considerada como una zoonosis⁵.

Debido a que el hombre invadió y degradó los ecosistemas naturales, algunas especies de triatóminos ocuparon ambientes peridomésticos y domiciliarios, involucrando a humanos y animales domésticos en el ciclo de transmisión de *T. cruzi*, convirtiendo a la asociación triatómino-protozoo-huésped vertebrado en una antropozoonosis⁵.

De acuerdo con estas condiciones, los triatóminos realizan tres diferentes ciclos de transmisión de *T. cruzi*, que están en relación directa con su antropofilia³:

1.- Ciclo silvestre o enzoótico.

Triatóminos que viven en ambientes selváticos y que solo ocasionalmente se alimentan del hombre, ejemplos: *T. protracta*, *T. sanguisuga*, *T. rubida*, *T. lecticulatus*, *T. platensis*, *T. rubrovaria* y *R. neglectus*.

2.- Ciclo peridoméstico, intermedio o zooantropótico.

Lo llevan a cabo aquellos que habitan en las cercanías de la vivienda humana (gallineros, pocilgas, establos, etc.) y que han iniciado la colonización de esta, ejemplos: *T. dimidiata*, *T.*

phyllosoma, *T. sordida*, *T. maculata*, *T. pallidipennis*, *T. picturata*, *T. longipennis*, *Panstrongylus megistus*, *Rhodnius pallescens*.

3.- Ciclo doméstico, domiciliario o antroponómico.

Triatóminos que tienen como principal fuente de alimento al hombre, aunque no desdeñan animales domésticos o silvestres (murciélagos, tlacuaches, ciertos roedores) que viven en la habitación humana o penetran a ella, ejemplos: *Triatoma infestans* y *Rhodnius prolixus*.

A pesar de que en aproximadamente 60 especies de triatóminos se ha señalado infección natural o experimental con *Trypanosoma cruzi*, y debido a que entre ellas su comportamiento y fisiología son similares, se considera susceptible de infección a la totalidad de las especies, pero solamente algunas de ellas tienen importancia en la transmisión del parásito al hombre²⁸. Los factores principales que determinan el potencial de los triatóminos como transmisores son: la adaptación a la vivienda humana, un alto grado de antropofilia y su capacidad para defecar durante o inmediatamente después de la alimentación²⁷.

Además, factores tales como el consumo de sangre por el insecto y la temperatura ambiental, pueden influir en una transmisión efectiva, ya que el desarrollo del parásito en el insecto está estrechamente ligado a ellos²⁹.

2.3.5. Distribución geográfica en México.

En México existe una gran variedad de triatóminos, distribuidos ampliamente en todo el territorio nacional; en total suman 32 especies pertenecientes a siete géneros, de los cuales, el género *Triatoma* es el más abundante con 25 especies³. Se han encontrado triatóminos de diversas especies en todos los estados de la república (tabla 4), la mayoría naturalmente infectados con *T. cruzi*; sin embargo, muchas de las especies habitan únicamente en

ambientes selváticos, por lo que se presume que su papel como transmisores del parásito al hombre no es tan importante²⁴.

Especies	Estado
<i>Dipetalogaster maxima</i>	Baj
<i>Eratyrus cuspidatus</i>	Chi, Ver
<i>Panstrongylus rufotuberculatus</i>	Cam, Chi, Ver
<i>Rhodnius prolixus</i>	Oax, Chi
<i>Triatoma barberi</i>	Col, Gua, Gue, Hid, Jal, Mex, Mic, Mor, Oax, Pue, Tla
<i>Triatoma dimidiata</i>	Cam, Chi, Jal, Oax, Pue, Qui, SLP, Tab, Ver, Yuc
<i>Triatoma gerstaeckeri</i>	Chi, Coa, Nue, SLP, Tam
<i>Triatoma hegneri</i>	Qui
<i>Triatoma lecticularia</i>	Nue
<i>Triatoma longipennis</i>	Agu, Chi, Col, Jal, Nay, Sin, Zac
<i>Triatoma mazzotti</i>	Dur, Gue, Mic, Nay, Oax
<i>Triatoma pallidipennis</i>	Col, Gue, Jal, Mic, Mor, Nay, Pue
<i>Triatoma peninsularis</i>	Baj
<i>Triatoma phylosoma</i>	Oax
<i>Triatoma recurva</i>	Chi, Nay, Sin, Son
<i>Triatoma protracta</i>	Baj, Coa, Chi, Dur, Nue, SLP, Sin, Son, Tam, Zac

Tabla 4. Especies de triatóminos encontrados en México infectados naturalmente con *T. cruzi*.²⁵

Estados: Agu-Aguascalientes; Baj-Baja California; Cam-Campeche; Chi-Chiapas; Coa-Coahuila; Col-Colima; Dur-Durango; Gua-Guanajuato; Gue-Guerrero; Hid-Hidalgo; Jal-Jalisco; Mic-Michoacán; Mex-México (D.F. incluido); Mor-Morelos; Nay-Nayarit; Nue-Nuevo León; Oax-Oaxaca; Pue-Puebla; Qui-Quintana Roo; SLP-San Luis Potosí; Sin-Sinaloa; Son-Sonora; Tab-Tabasco; Tam-Tamaulipas; Tla-Tlaxcala; Ver-Veracruz; Yuc-Yucatán; Zac-Zacatecas.

En nuestro país, las especies de triatóminos que son consideradas como las mejores transmisores de la enfermedad de Chagas son *Triatoma barberi* y *Triatoma dimidiata*²³.

Triatoma barberi.

Esta especie autóctona es quizás el mejor transmisor de *T. cruzi* en México, debido a su marcada antropofilia y a sus hábitos exclusivamente domésticos y peridomésticos^{23,25}. Se distribuye en las regiones central y sur del país, en los estados de Oaxaca, Jalisco, Morelos y Guerrero, entre otros²³.

Triatoma dimidata.

Es una especie de tamaño grande, que se distingue por su colorido; está reconocida como el transmisor principal de la enfermedad de Chagas en Centroamérica²⁶. En México, es el triatómino que ocupa el territorio más extenso, ya que su distribución abarca todos los estados del sureste y la península de Yucatán, así como algunos estados del centro (San Luis Potosí, Puebla)²³. Ha sido capturada en casas, establos y gallineros, y es capaz de penetrar en las habitaciones volando, atraída por la luz²⁵.

Además de estas especies, existen en nuestro país dos especies de triatóminos, *Rhodnius prolixus* y *Triatoma pallidipennis*, cuyo potencial de transmisión no se ha determinado claramente por falta de estudios al respecto²⁴; de *R. prolixus* se sabe que habita en los estados de Oaxaca y Chiapas, y que probablemente llegó a México transportado por aves migratorias del norte de Venezuela. Por su parte, *T. pallidipennis* se encuentra ampliamente distribuido en los estados del centro del país, en donde además de habitar en ambientes selváticos, puede localizarse también en el interior y los alrededores de las casas habitación

^{24,27}

2.3.6. *Triatoma pallidipennis* (Stål, 1872).

Es una especie mexicana de gran tamaño, ya que el adulto macho mide entre 31 y 34 mm de longitud y la hembra mide de 32 a 35 mm; su cuerpo es bastante ancho, sobre todo en la región abdominal, en donde el macho mide de 12 a 13 mm y la hembra de 13 a 16 mm²².

Tiene un color que va del pardo oscuro al negro, con marcas características de color rojo-naranja en el conexivo, que en esta especie es inusualmente ancho; posee un par de alas de color blanco amarillento relativamente angostas, que no cubren la totalidad del conexivo. Su cabeza y sus patas son de color negro²² (fig 8).



Figura 8. *Triatoma pallidipennis* (Stål, 1872).

Se distribuye en los estados de Colima, Guerrero, Jalisco, Michoacán, México, Morelos y Nayarit, en donde ha sido encontrado infectado naturalmente con *T. cruzi*²⁴. Habita en ambientes selváticos, asociada sobre todo a la rata de campo (*Neotoma alleni*) y al armadillo (*Dasyus novemcinctus*), ubicándose en sus nidos y madrigueras²²; no obstante, se

ha encontrado también en ambientes domésticos y peridomésticos, incluyendo viviendas y hoteles de zonas urbanas en la ciudad de Cuernavaca, Morelos^{24,27}.

El potencial de esta especie como transmisor de la enfermedad de Chagas no está determinado con precisión, ya que por una parte se señala como un triatómino con patrones de defecación prolongados, por lo que podría considerarse como un mal transmisor²⁸. Por otro lado, se conoce su alta susceptibilidad a la infección con *T. cruzi* y su adaptación a ambientes domésticos y peridomésticos, inclusive en zonas urbanas^{27,29}, además de que la defecación posprandial tardía puede ser compensada por una relación más prolongada entre el insecto y el huésped²⁶.

2.4. VIRULENCIA DE *Typanosoma cruzi*.

La virulencia puede definirse como el grado de patogenicidad de un microorganismo, ya sea un serotipo, una cepa o una clona de este, en un huésped particular⁸. Se ha relacionado a la virulencia con la capacidad del parásito para multiplicarse, la cual puede ser atenuada o exaltada dependiendo de la magnitud de la respuesta inmune del huésped³⁰.

Para evaluar la virulencia de las cepas de *T. cruzi*, se realiza una caracterización biológica *in vivo*; este estudio consiste en la infección de animales de experimentación para determinar las diferencias que presenta cada cepa en su desarrollo dentro del huésped vertebrado⁵.

La alta susceptibilidad del ratón a la infección con *T. cruzi* ha ocasionado su extensa utilización en los estudios de caracterización biológica de las cepas, además de que pueden distinguirse claramente todas las etapas de la infección en un tiempo conveniente para los investigadores, lo que no ocurre con otros animales ^{7,29}. Se han empleado diversas cepas de ratones, como son: CD-1, BALB-C, C57, CBA, CFW, C3H, entre otras, seleccionándose en base a sus características genéticas y a las necesidades de la investigación ^{31,32,33}.

Los parámetros utilizados para evaluar la virulencia de las cepas de *T. cruzi* en los ratones se basan en la capacidad del parásito para multiplicarse y para producir lesiones tisulares; por este motivo, en los estudios se determinan datos tales como: la intensidad de la parasitemia durante el curso de la infección, la cantidad y distribución de los amastigotes en los diferentes tejidos y órganos, la afinidad del parásito para invadir ciertos órganos (histotropismo), y finalmente, los porcentajes de mortalidad acumulada durante el periodo de estudio ³².

2.5. FACTORES QUE INFLUYEN EN LA VIRULENCIA DE *T. cruzi*.

Las cepas de *T. cruzi* son genéticamente heterogéneas entre sí, y como consecuencia presentan una gran variabilidad en características tales como: morfología, patrones antigénicos, isoenzimas, DNA del cinetoplasto, infectividad para los transmisores y virulencia en los huéspedes vertebrados, entre otras ^{18,34}.

Adicionalmente a sus características genéticas, la virulencia de *T. cruzi* puede modificarse cuando el parásito se desarrolla en el insecto transmisor³⁵. Para ciertas cepas de este protozoo se ha sugerido que la interacción de los tripanosomas con factores humorales del tipo de las lectinas, que se encuentran en el intestino del insecto, aumenta la virulencia del parásito³⁶. Por otra parte, la infección de los triatóminos puede ocurrir debido a una "selección" de subpoblaciones pertenecientes a una población heterogénea natural; generalmente, se seleccionan las subpoblaciones más resistentes al ambiente potencialmente hostil del intestino del insecto, lo cual puede influir en la virulencia del *T. cruzi*³⁷. Esta selección clonal puede ocurrir también en medios de cultivo acelulares, dando como resultado subpoblaciones con un comportamiento virulento diferente al de la población original³⁸.

Finalmente, se ha reportado una atenuación en la virulencia de las cepas cuando estas son mantenidas en medios de cultivo acelulares; la virulencia de las cepas disminuye en forma inversamente proporcional al tiempo durante el cual se mantienen en cultivo³³.

3. HIPÓTESIS.

El *Trypanosoma.cruzi* es un microorganismo constituido por un conjunto de poblaciones genéticamente heterogéneas, que lleva a cabo su ciclo biológico en dos huéspedes diferentes, uno vertebrado y el otro invertebrado; el comportamiento y las características de estas poblaciones están en función de la información genética que poseen.

Sin embargo, las características de las poblaciones de *T.cruzi* en el huésped vertebrado son distintas a las que presentan en el huésped invertebrado; estas diferencias se deben principalmente a la información genética del microorganismo, pero además a la interacción del parásito con el microambiente del huésped.

Con base en estos hechos, se planteó la siguiente hipótesis:

Si se tienen diversas cepas de *T.cruzi* con diferente grado de patogenicidad, que se han mantenido en ratones y se hace un pase de estas cepas por el transmisor *Triatoma pallidipennis*, la interacción del parásito con el huésped invertebrado modificará sus características, y en particular su virulencia en el huésped vertebrado.

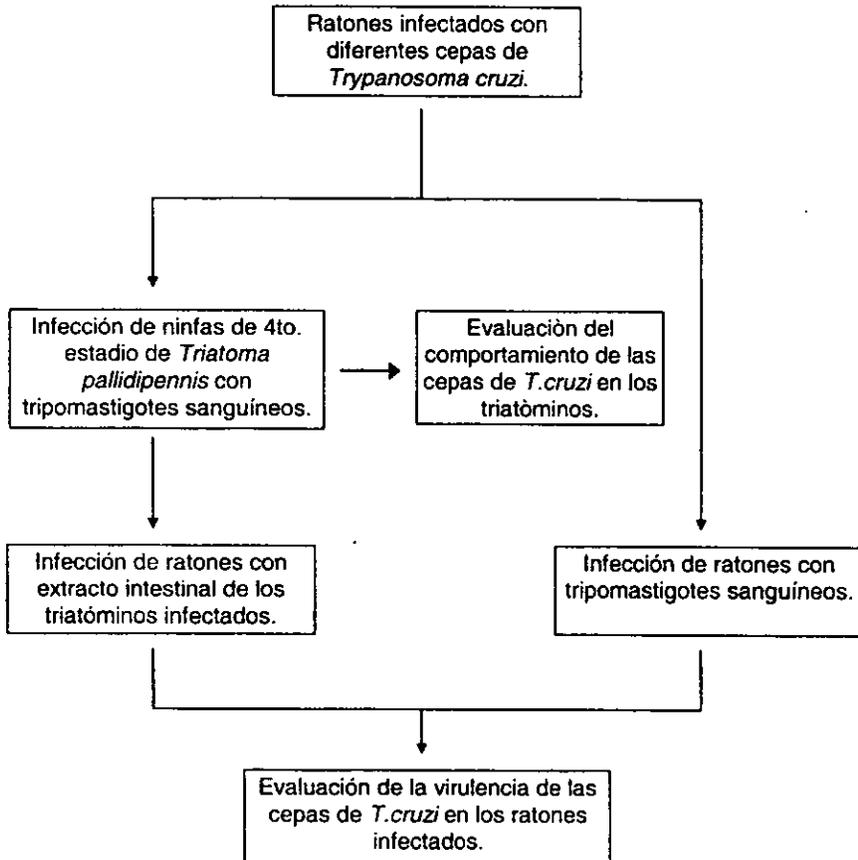
4. OBJETIVOS.

Para corroborar la hipótesis planteada, se establecieron los siguientes objetivos:

- Establecer la infección en ninfas de cuarto estadio de *Triatoma pallidipennis* con cepas de *Trypanosoma cruzi* aisladas de diversas especies de triatóminos.
- Evaluar el comportamiento y metaciclologénesis de las cepas de *T. cruzi* en los triatóminos infectados experimentalmente.
- Determinar si la virulencia de las cepas de *T. cruzi* en ratones se modifica después de su pase por *Triatoma pallidipennis*.

5. DISEÑO EXPERIMENTAL.

Para alcanzar los objetivos, se diseñó el siguiente esquema de trabajo:



6. MATERIAL Y MÉTODOS.

6.1. CEPAS DE *Trypanosoma cruzi*.

Se emplearon cinco cepas de *T. cruzi* que fueron aisladas de diversas especies de triatóminos infectados naturalmente; los triatóminos fueron colectados por personal del laboratorio en diferentes localidades de la República Mexicana (tabla 1).

Nombre de la cepa	Especie de triatómino	Localidad donde fue aislada	Año de aislamiento
Querétaro	<i>Triatoma barberi</i>	La Cueva, Querétaro	1986
Purísima	<i>Triatoma barberi</i>	Purísima de la Cueva, Querétaro	1996
Tequesquitengo	<i>Triatoma pallidipennis</i>	Tequesquitengo, Morelos	1992
Oaxtepec	<i>Triatoma pallidipennis</i>	Oaxtepec, Morelos	1996
T5	<i>Triatoma dimidiata</i>	Xuchiles, Veracruz	1996

Tabla 1. Cepas de *Trypanosoma cruzi* utilizadas en el experimento.

Estas cepas fueron aisladas en el laboratorio, inoculando ratones de la cepa CD-1 con heces de los triatóminos infectados, por vía intraperitoneal; a partir de la fecha de su aislamiento se han mantenido en el laboratorio mediante pases sucesivos en ratones y en medios de cultivo.

6.2. INFECCIÓN DE TRIATÓMINOS CON LAS DIFERENTES CEPAS DE

T. cruzi.

Los triatóminos utilizados para la infección con las distintas cepas de *T. cruzi* fueron de la especie *Triatoma pallidipennis*, eclosionados en el laboratorio y libres de infección con el

parásito. Para el experimento se seleccionaron ninfas de cuarto estadio, con el objeto de impedir que alcanzaran la fase adulta durante el periodo de estudio, evitando así la consideración del sexo como una variable adicional.

Las ninfas de *T. pallidipennis* se distribuyeron en lotes de ocho ejemplares cada uno, en un total de cinco lotes, correspondientes al número de cepas de *T. cruzi* utilizadas durante el experimento. Los cinco lotes de triatóminos se colocaron en frascos de vidrio de boca ancha³⁹, acondicionados con papel doblado en forma de acordeón para brindarles soporte a los insectos; la boca de los frascos se cubrió con trozos de tela (organza) sujetos por ligas de hule.

Se emplearon cinco ratones cepa CD-1, de los cuales cada uno fuè infectado con las diferentes cepas de *T. cruzi* indicadas en la tabla 1 de esta sección. Cuando los ratones presentaron parasitemia se utilizaron para infectar los triatóminos, sujetándolos sobre una plancha de unicel para mantenerlos inmóviles y en posición ventral.

La infección de los triatóminos se llevó a cabo colocando la boca del frasco sobre el abdomen del ratón inmóvil para permitir que las ninfas se acercaran a alimentarse; el frasco se cubrió con una tela para protegerlo de la luz, y se dejó alimentar a los triatóminos durante 30 minutos, repitiendo el mismo procedimiento para todas las otras cepas de *T. cruzi*.

Todas las ninfas fueron pesadas antes y después de la alimentación para calcular el volumen de sangre y la cantidad de tripomastigotes sanguíneos ingeridos por cada insecto (tabla 2).

No. De tripomastigotes sanguíneos ingeridos por cada insecto								
Cepa	TRIATÓMINO #							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Querétaro	7.25x10 ⁹	8.25x10 ⁸	8.42x10 ⁸	5.8x10 ⁶	6.78x10 ⁶	0.668x10 ⁶	2.98x10 ⁶	16.6x10 ⁶
Purísima	0.09x10 ⁹	0.09x10 ⁸	0.03x10 ⁸	+	0.08x10 ⁶	0.18x10 ⁶	0.11x10 ⁶	0.06x10 ⁶
Tequesquitengo	1.36x10 ⁸	1.9x10 ⁶	1.39x10 ⁶	+	2.15x10 ⁶	0.45x10 ⁶	2.3x10 ⁶	0.47x10 ⁶
Oaxtepec	0.45x10 ⁹	0.24x10 ⁶	+	+	0.009x10 ⁶	0.03x10 ⁶	+	0.19x10 ⁶
T5	12x10 ³	31.8x10 ³	19.1x10 ³	15.8x10 ³	18x10 ³	18x10 ³	13.1x10 ³	+

Tabla 2. Dosis de infección para los triatóminos con las diferentes cepas de *T. cruzi*. Las dosis fueron calculadas a partir de la diferencia en peso registrada para cada triatómino después de alimentarse; esta diferencia en peso fué dividida entre el valor de la densidad correspondiente a la sangre de ratón ($\rho=1.120$ g/mL), con lo cual se obtuvo el volumen de sangre ingerido por cada insecto para finalmente calcular el número de parásitos ingeridos partiendo de la parasitemia presentada por cada ratón al momento de la infección.

+ Triatóminos que no se alimentaron sobre el ratón infectado.

6.3. DENSIDAD PARASITARIA DE LAS CEPAS DE *T. cruzi* EN LAS HECE DE LOS TRIATÓMINOS.

El término densidad parasitaria se emplea para indicar la cantidad de tripanosomas presentes en las deyecciones de los triatóminos; esta se determinó contando los flagelados presentes en las deyecciones de las ninfas infectadas cada 3 ó 4 días posinfección durante un período de 90 días, mediante el procedimiento siguiente:

- **Obtención de heces de triatóminos.**

Para provocar la defecación de las ninfas de *T. pallidipennis* infectadas, estas fueron estimuladas presionando ligeramente su abdomen. Las deyecciones fueron depositadas sobre portaobjetos y estos fueron colocados en cajas de Petri con algodones humedecidos con agua para evitar la deshidratación de las heces.

- **Confirmación de la infección con *T. cruzi*.**

De cada una de las muestras de heces obtenidas, se tomó un volumen de 2 μL el cual se vertió sobre un portaobjetos; mezclándolo con dos-tres gotas de DPBS con la finalidad de aclarar las muestras y facilitar la visualización de los parásitos. Sobre la preparación se colocó un cubreobjetos y se observó al microscopio a 10X y 40X para detectar la presencia o ausencia de parásitos.

- **Densidad parasitaria en las heces.**

La cuenta se llevó a cabo únicamente en las muestras donde la presencia de flagelados de *T. cruzi* fue confirmada. De cada una de estas muestras se tomaron 5 μL de heces y se diluyeron 1:10 con DPBS; las heces que por su color oscuro dificultaban la observación, fueron diluidas 1:100 con el mismo diluyente. Empleando una cámara de Neubauer, se contó el número de parásitos presentes en 10 μL de heces diluidas, expresando los resultados en número de parásitos / mL de heces.

6.4. DETERMINACIÓN DE LA METACICLOGÈNESIS DE LAS CEPAS DE *T. cruzi* EN LOS TRIATÒMINOS.

Después de la evaluación de la densidad parasitaria de las cepas de *T. cruzi* en las heces de los triatóminos, se realizó un conteo de los tripomastigotes metacíclicos, epimastigotes, esferomastigotes y otras formas parasitarias encontradas en las deyecciones de las ninfas; este conteo permitió determinar para cada cepa de *T. cruzi* el grado de metaciclogénesis, que es el proceso que ocurre en el intestino del insecto mediante el cual los parásitos se transforman en tripomastigotes metacíclicos. Con las heces restantes de las muestras utilizadas para la determinación de la densidad parasitaria, se realizaron frotos, los cuales se

fijaron con metanol absoluto durante un minuto y se tiñeron con Giemsa durante 15 minutos. Las preparaciones teñidas se observaron al microscopio a 100X, contando el total de parásitos en cada una e identificándolos de acuerdo con su morfología y la posición del cinetoplasto (ver inciso 1.2.2).

6.5. ALIMENTACIÓN DE LOS TRIATÓMINOS.

Los triatóminos infectados se mantuvieron en el laboratorio alimentándolos cada 15 días durante el tiempo de duración del experimento, utilizando la sangre de una paloma como fuente de alimento, ya que se recomienda la utilización de aves para alimentar a los insectos por ser refractarias a la infección con *T. cruzi*. Cada frasco con ninfas fué colocado sobre la paloma durante 20 minutos para permitir a los triatóminos la ingestión de sangre.

6.6. INFECCIÓN DE RATONES CON DIFERENTES CEPAS DE *T. cruzi*.

Una vez que se determinó la densidad parasitaria en las heces de los triatóminos y la metaciclologénesis de las cepas de *T. cruzi* empleadas en el estudio, se procedió a evaluar su virulencia; para este propósito se infectaron ratones, los cuales fueron divididos en dos grupos: el primer grupo fue inoculado con el extracto intestinal de los triatóminos infectados experimentalmente con las cepas del parásito, mientras que el segundo se infectó con tripomastigotes sanguíneos provenientes de las mismas cepas mantenidas en ratones, sin haber pasado por los triatóminos. Posteriormente, en ambos grupos de ratones infectados se determinaron los siguientes parámetros: las cinéticas de la parasitemia, los porcentajes de mortalidad, el histotropismo de las cepas a tres órganos: pulmón, bazo y corazón y los porcentajes de ratones infectados con nidos de amastigotes.

- **Ratones.**

Para esta fase del experimento, se utilizaron ratones de la cepa CD-1, hembras, de 6-8 semanas de edad.

- **Infección de ratones con extracto intestinal de triatóminos.**

Al cumplir 90 días posinfección, se efectuó una disección de todas las ninfas infectadas sobrevivientes, depositando su contenido intestinal en frascos viales. Utilizando una cámara de Neubauer, se determinó la cantidad de parásitos por mL de extracto intestinal en cada uno de los viales. Para llevar a cabo la infección, se distribuyeron cincuenta ratones en lotes de 10, uno por cada cepa de parásitos; cada ratón se inoculó por vía intraperitoneal con 200 μ L de extracto intestinal. Las dosis de infección fueron variables para cada cepa de *T. cruzi* (tabla 2), debido a que la cantidad de parásitos presentes en el contenido intestinal de los triatóminos fué distinta para cada cepa.

- **Infección de ratones con tripomastigotes sanguíneos.**

Otro grupo de 50 ratones distribuidos por lotes de la misma forma que en el inciso anterior, se infectó con tripomastigotes sanguíneos provenientes de la sangre, obtenida por punción cardíaca, de ratones infectados con las diferentes cepas de *T. cruzi*. Cada ratón fué inoculado por vía intraperitoneal con la misma dosis de parásitos que los ratones inoculados con extracto intestinal y contenida en un volumen de 200 μ L de sangre (tabla 2).

- **Lote Control.**

Un lote de 10 ratones fué inoculado por vía intraperitoneal con 200 μ L de DPBS a cada ratón, utilizándolo como control negativo de infección.

Cepa de <i>T. cruzi</i>	Dosis de infección (# parásitos inoculados/ratón)	
	Extracto intestinal de triatóminos	Tripomastigotes sanguíneos
Querétaro	1.2×10^5	1.2×10^5
Purísima	1.2×10^5	1.2×10^5
Oaxtepec	6×10^4	6×10^4
Tequesquitengo	1×10^4	1×10^4
T5	1×10^4	1×10^4

Tabla 2. Dosis de infección inoculadas a los ratones.

6.7. DETERMINACIÓN DE CURVAS DE PARASITEMIA.

La intensidad de la parasitemia se determinó en los ratones cada tres y cuatro días posinfección, durante un período de 50, extrayendo 10 μ L de sangre de la cola de cada ratón y diluyéndolo 1:10 con NH_4Cl al 0.87% para lisar los eritrocitos y facilitar la observación⁴⁰. El conteo de los tripomastigotes sanguíneos se efectuó utilizando una cámara de Neubauer, expresando el resultado en número de tripomastigotes/mL de sangre.

6.8. HISTOTROPISMO DE LAS CEPAS DE *T. cruzi* EN RATONES.

Se llevó a cabo una búsqueda de nidos de amastigotes en el corazón, los pulmones y el bazo de los ratones infectados con *T. cruzi* para determinar si el tropismo de las distintas cepas del parásito hacia estos órganos se ve modificado después de la interacción de los tripanosomas con el insecto transmisor. La elección del corazón para esta parte experimental se realizó con base a los reportes que indican afinidad de ciertas cepas de *T. cruzi* por este órgano, en tanto que el bazo y los pulmones fueron elegidos por poseer una irrigación

sanguínea abundante, la cual favorece el paso de los tripomastigotes sanguíneos a través de estos órganos y aumenta la probabilidad de invasión del parásito.

La búsqueda de nidos de amastigotes se efectuó en cortes histopatológicos preparados en el laboratorio de la manera siguiente:

- **Extracción y conservación de órganos.**

De todos los ratones sobrevivientes al día 50 posinfección fueron extraídos el corazón, los pulmones y el bazo, lavándolos con DPBS y envolviendo cada órgano en un trozo de gasa; los órganos se mantuvieron en una solución de formol buffer durante 72 horas.

- **Deshidratación.**

Los órganos fueron enjuagados dejándolos bajo un chorro fino de agua durante 12 horas para eliminar los residuos de formol. La deshidratación se efectuó utilizando etanol al 30, 40, 50, 60, 70, 80, 96 y 100%, embebiendo los órganos en cada una de estas soluciones durante 24 h

- **Inclusión.**

Los órganos fueron sumergidos sucesivamente en cuatro recipientes con parafina fundida, durante un tiempo de 4 h en los primeros tres, y de 12 h en el cuarto recipiente, para después colocarlos sobre moldes que fueron llenados con parafina fundida.

- **Cortes.**

Una vez solidificada la parafina se desmoldaron los bloques con los órganos incluidos y se utilizó el microtomo para hacerles cortes longitudinales de 4 μ de espesor, tomando una muestra del tejido cada 10 cortes realizados hasta completar un total de 100 cortes por

órgano. Los tejidos se colocaron en un baño de flotación con agua a 50°C para desprender la parafina circundante a la muestra, recogiendo los después con ayuda de un pincel y colocándolos sobre un portaobjetos. Las preparaciones con las muestras de los tejidos se introdujeron en una estufa a 60°C durante 12 horas para eliminar los residuos de parafina.

- **Tinción.**

Los cortes histopatológicos se tiñeron con Eosina-Hematoxilina para poner de manifiesto a los amastigotes, ya que la hematoxilina tiñe los núcleos de las células de color azul y la eosina tiñe de color rosa el citoplasma.

- **Montaje.**

Las preparaciones teñidas se cubrieron con bálsamo de Canadá y se colocó un cubreobjetos sobre cada una de ellas, dejando secar a la resina antes de observarlas.

- **Búsqueda de nidos de amastigotes.**

Se observaron al microscopio, a 100X (inmersión) las preparaciones montadas con los cortes histológicos ya teñidos para buscar la presencia o ausencia de nidos de amastigotes; cada sección de tejido en la preparación fué examinada completamente cubriendo todos los campos microscópicos, registrando la localización de los nidos de amastigotes encontrados.

7. RESULTADOS.

Para cumplir los objetivos de este experimento, se evaluó el comportamiento de varias cepas mexicanas de *Trypanosoma cruzi* en el insecto transmisor, específicamente en *Triatoma pallidipennis* y posteriormente se determinó la virulencia de las mismas cepas en ratones. Para realizar la evaluación del comportamiento de las cepas del parásito en los triatóminos, se registró su densidad parasitaria en las deyecciones, el grado de metacicloogénesis que presentaron y los porcentajes de las diferentes formas parasitarias observadas en las heces de los triatóminos a lo largo del período de estudio.

En la determinación de la virulencia de las cepas de *T.cruzi* en los ratones, se tomaron en cuenta los parámetros siguientes: el porcentaje de mortalidad en cada lote de ratones, la intensidad de la parasitemia durante el curso de la infección y el histotropismo a pulmones, bazo y corazón.

7.1. DENSIDAD PARASITARIA.

En este experimento se determinó la densidad parasitaria de las cepas de *T. cruzi* en las deyecciones de los triatóminos infectados durante un período de 90 días; los resultados de esta determinación se muestran en la figura 9.

Como puede observarse en la figura 9, los resultados de la determinación de la densidad parasitaria en las heces de *Triatoma pallidipennis* fueron diferentes entre las distintas cepas de *T. cruzi*. En primer lugar, el tiempo que transcurrió a partir de la infección de los

triatóminos hasta la detección inicial de los parásitos en sus deyecciones fue distinto para cada cepa; en la cepa Querétaro, dicho tiempo fue de 7 días y de 14 días en la cepa Purísima, ambas aisladas de *Triatoma barberi*; en los triatóminos infectados con las cepas aisladas en el estado de Morelos y de la misma especie transmisora *T. pallidipennis*, los flagelados de la cepa Oaxtepec se detectaron a los 11 días posinfección y a los 21 días posinfección los de la cepa Tequesquitengo, mientras que en aquellos insectos infectados con la cepa veracruzana T5, aislada de *Triatoma dimidiata*, los flagelados se detectaron en las heces hasta el día 21.

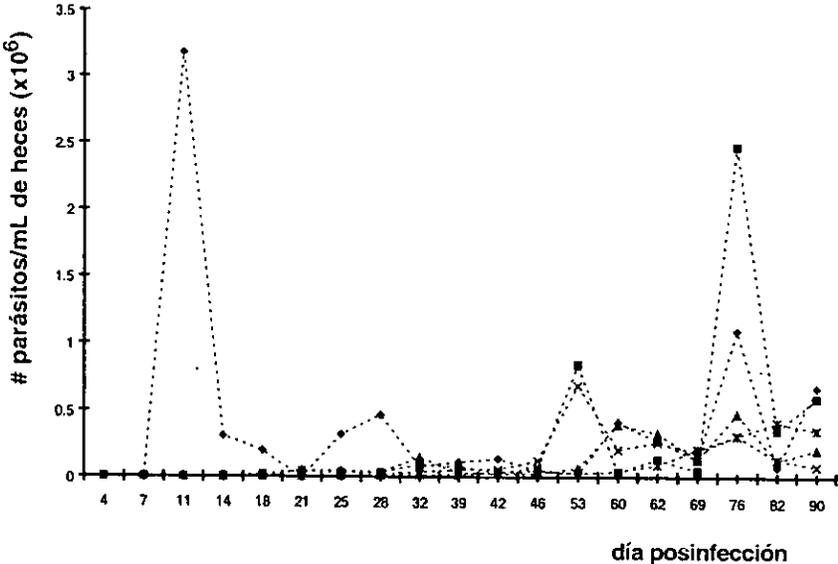


Figura 9. Cinética de la densidad parasitaria de las diferentes cepas de *T. cruzi* en heces de ninfas de cuarto estadio de *Triatoma pallidipennis*. Promedio de 8 insectos por cepa. Triatóminos infectados con *T. cruzi* cepas: Querétaro (◆), Purísima (■), Oaxtepec (▲), Tequesquitengo (X) y T5 (*).

Con respecto a la magnitud de la densidad parasitaria, la mayor cantidad de flagelados en las heces se encontró en los insectos infectados con las cepas del estado de Querétaro, ya que tal como se observa en la figura, se contó un máximo de 3.1×10^6 parásitos/mL de heces en la cepa Querétaro al día 11 p.i., en tanto que en la cepa Purísima el conteo más alto fue de 2.5×10^6 parásitos/mL. Por el contrario, las cepas del estado de Morelos fueron las que presentaron una menor densidad parasitaria, ya que en las ninfas infectadas con la cepa Oaxtepec la mayor cantidad promedio detectada en las muestras fue de 4×10^5 parásitos/mL de heces y en la cepa Tequesquitengo, la cantidad de parásitos más grande encontrada en las heces fue de 6×10^5 parásitos/mL. Otra cepa que presentó una densidad parasitaria muy baja fue T5, en la cual el número promedio máximo de flagelados fue de 4.2×10^5 parásitos/mL de heces.

Otro aspecto notable que se puede observar en la figura, es que la densidad parasitaria no se mantuvo constante en ninguna cepa de *T. cruzi* a lo largo del estudio, sino que la cantidad de parásitos en las deyecciones de los insectos presentó variaciones considerables; esto puede apreciarse de manera más notoria en la cepa Querétaro, en donde no se encontró ningún parásito tan solo cuatro días después de contar millones de parásitos en las muestras; la densidad parasitaria en la cepa Purísima también presentó gran variabilidad, ya que los primeros 69 días se contó un máximo de 5×10^4 parásitos/mL de heces, pero tan solo unos días después, es decir, al día 76 p.i., se llegó a encontrar un promedio de 2×10^6 flagelados por cada mL de heces.

En las cepas restantes, estas variaciones en la densidad parasitaria no fueron tan grandes como en los casos descritos.

7.2 METACICLOGÉNESIS DE LAS CEPAS DE *T. cruzi* EN LOS TRIATÓMINOS.

Para la determinación de la metaciclogénesis de las diferentes cepas de *T. cruzi* en los insectos infectados, se llevó a cabo un conteo de las distintas formas parasitarias encontradas en las heces de los triatóminos, con la finalidad de reportar el grado de actividad en el proceso de transformación del parásito a tripomastigote metacíclico; los resultados obtenidos se encuentran en las figuras 10-14.

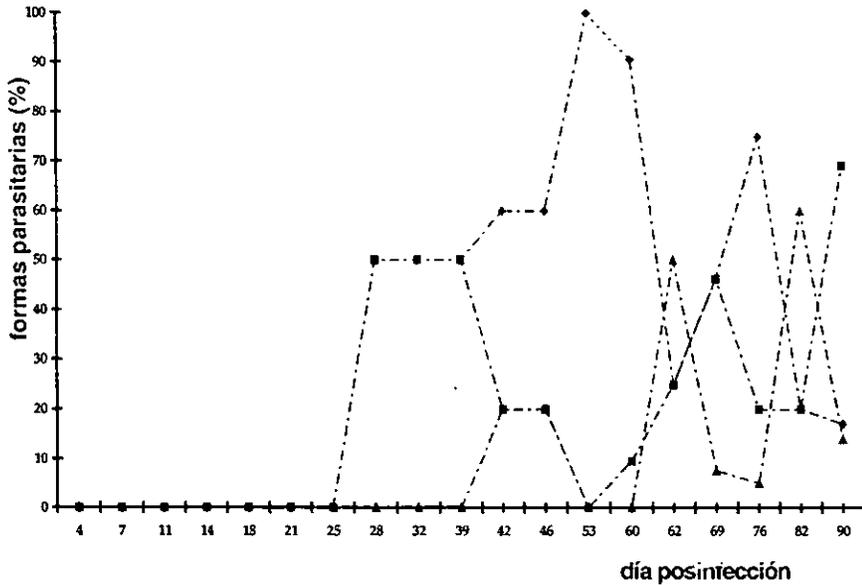


Figura 10. Cinética de metaciclogénesis para la cepa Querétaro. Porcentaje de las distintas fases de *T. cruzi* observadas en las heces de triatóminos infectados: Tripomastigotes (◆), Epimastigotes (■), Otras formas (▲).

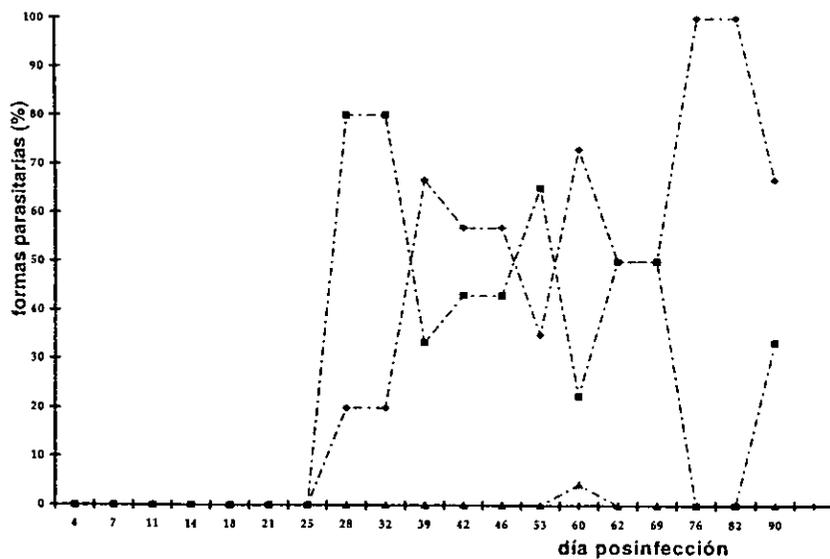


Figura 11. Cinética de metaciclogénesis para la cepa Purisima. Porcentaje de las distintas fases de *T. cruzi* observadas en las heces de los triatóminos infectados: Tripomastigotes (◆), Epimastigotes (■), Otras formas (▲).

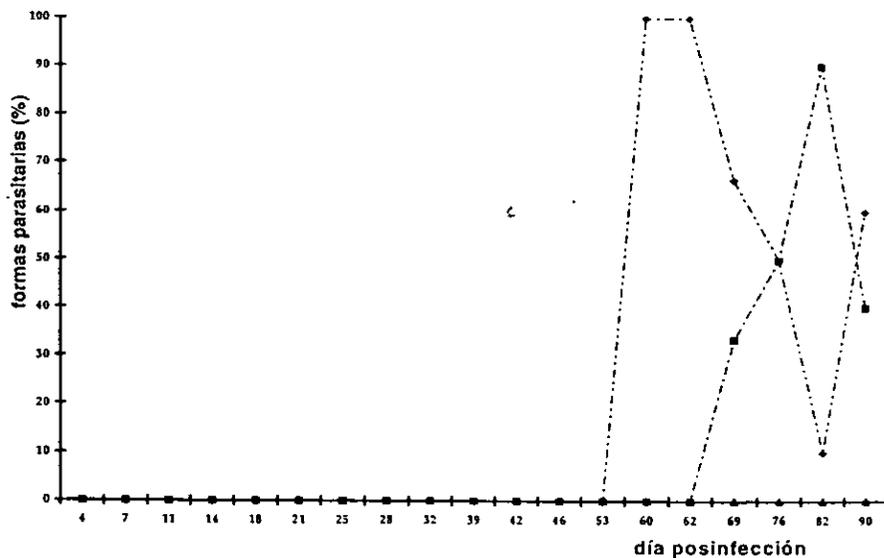


Figura 12. Cinética de metaciclogénesis de la cepa Oaxtepec. Porcentaje de las diferentes fases de *T. cruzi* observadas en las heces de triatóminos infectados: Tripomastigotes (◆), Epimastigotes (■), Otras formas (▲).

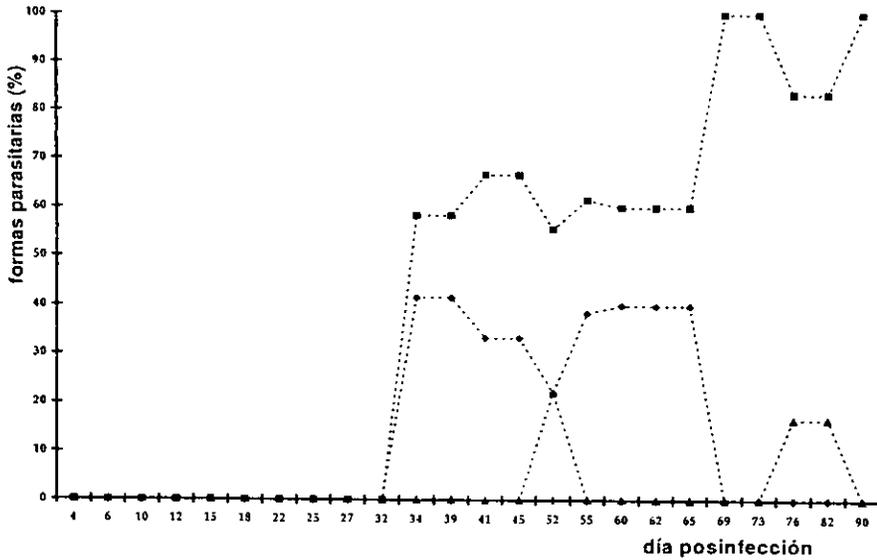


Figura 13. Cinética de metaciclógenesis para la cepa Tequesquitengo. Porcentaje de las distintas fases de *T. cruzi* observadas en las heces de triatóminos infectados: Tripomastigotes (◆), Epimastigotes (■), Otras formas (▲).

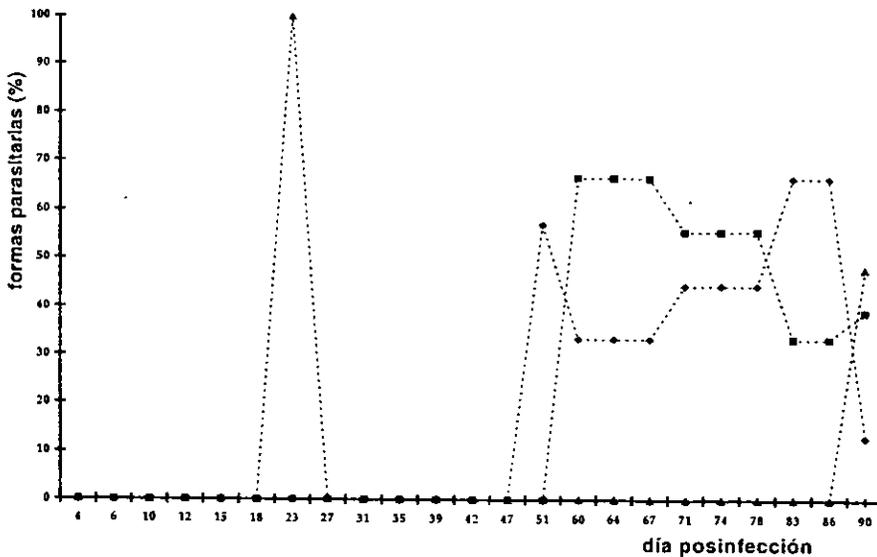


Figura 14. Cinética de metaciclógenesis para la cepa T5. Porcentaje de las distintas fases de *T. cruzi* observadas en las heces de triatóminos infectados: Tripomastigotes (◆), Epimastigotes (■), Otras formas (▲).

Las fases del parásito encontradas en las heces de los triatóminos infectados con las diferentes cepas de *T. cruzi* fueron el tripomastigote, epimastigote y formas transicionales de morfología variable (esféricas, piriformes y alargadas), cuyos porcentajes se encuentran representados en las gráficas (figuras 10-14) como "Otras formas", con excepción de la cepa Oaxtepec (figura 4) en la que no se encontraron estas formas transicionales.

En las figuras 10-14 puede observarse que el proceso de transformación del parásito fue diferente en cada cepa, el predominio de las diferentes formas fue alternándose a lo largo del estudio. En la cepa Querétaro (fig. 10) se presentó un equilibrio entre tripomastigotes y epimastigotes hasta el día 39 p.i.; posteriormente hubo un aumento en la cantidad de tripomastigotes, alcanzando el 100% en las muestras del día 53 p.i. aunque después hay un aumento en la cantidad de epimastigotes.

La cepa Purísima (fig. 11) presentó un comportamiento semejante al de la cepa Querétaro, con cantidades similares de epimastigotes y tripomastigotes durante los primeros 60 días posinfección. De modo general, el aumento de tripomastigotes se observa desde el día 39 en adelante, con algunos puntos de equilibrio con epimastigotes (día 62 al 69) y predominio de estos últimos (día 53). Casi no se observaron formas transicionales de esta cepa.

Para la cepa Oaxtepec (fig. 12), los parásitos se detectaron e identificaron en las muestras a partir del día 60 posinfección con predominancia de tripomastigotes, aunque este porcentaje disminuyó al llegar el día 82, en el cual se incrementaron los epimastigotes; hacia el final del estudio (día 90), los tripomastigotes aumentaron nuevamente.

El predominio de las diferentes formas parasitarias de *T. cruzi* en las heces de los insectos infectados con la cepa Tequesquitengo fue distinto al de las otras cepas estudiadas, ya que tal y como se observa en la figura 13, el epimastigote fue la fase más abundante en las heces durante todo el estudio.

El comportamiento de la cepa T5 también fue muy diferente (fig. 14), ya que en las heces de los triatóminos infectados con esta cepa se encontró el porcentaje más elevado de formas transicionales entre todas las cepas, alcanzando el 100% al día 23 posinfección; en días posteriores y hasta la finalización del estudio, el número de estas formas transicionales disminuyó, observándose tripomastigotes y epimastigotes en cantidades semejantes.

7.3. PORCENTAJE DE MORTALIDAD.

Para evaluar el comportamiento de las cepas de *T. cruzi* en ratones, antes y después de pasar a través del transmisor de la especie *T. pallidipennis*, se determinó el porcentaje de mortalidad en los ratones infectados con las diferentes cepas, cuantificando el número de ratones muertos hasta el día 50 posinfección. Los resultados de esta determinación se encuentran en las figuras 15-19.

Los resultados obtenidos muestran un comportamiento diferente de cada cepa del parásito en el huésped vertebrado, y se puede observar que solamente los ratones infectados con la cepa Purísima (fig. 16) y los que se inocularon con DPBS (resultados no mostrados) sobrevivieron en su totalidad; en los ratones infectados con las cepas restantes la mortalidad fue variable tanto en los animales inoculados con tripomastigotes sanguíneos como en los que fueron inoculados con extracto intestinal de triatóminos.

La mortalidad ocurrida entre los animales infectados con la cepa Querétaro (fig. 15) fué del 50% en los ratones que se inocularon con tripomastigotes sanguíneos y del 40% en aquellos inoculados con tripanosomas del tracto digestivo de los triatóminos.

En los ratones infectados con la cepa Oaxtepec (fig 17), únicamente murió el 10% de los ratones inoculados con tripomastigotes sanguíneos.

Se observa que la cepa que provocó una mayor mortalidad en los ratones fue la T5 (fig 19), ya que murió el 90% de los animales inoculados con extracto intestinal de triatóminos y el 60% de los inoculados con tripomastigotes sanguíneos.

El resultado más significativo fue obtenido de los ratones infectados con la cepa Tequesquitengo, ya que como se observa en la figura 18, todos los ratones inoculados con tripomastigotes sanguíneos sobrevivieron, en tanto que de aquellos que fueron inoculados con los tripanosomas provenientes del tracto digestivo de los insectos, murió un 60%.

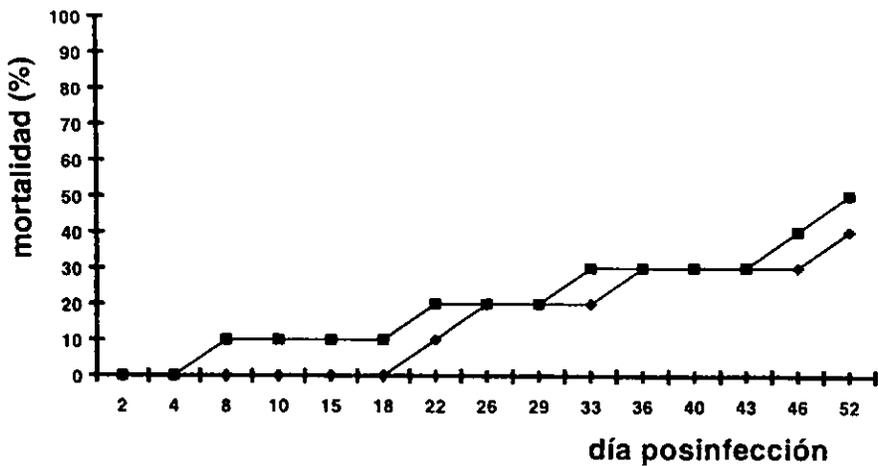


Figura 15. Mortalidad en ratones infectados con *T. cruzi* cepa Querétaro antes y después de pasar a través del tracto digestivo de *T. pallidipennis*: ratones inoculados con extracto intestinal de triatóminos infectados (◆), ratones inoculados con tripomastigotes sanguíneos obtenidos a partir de un ratón con parasitemia (■).

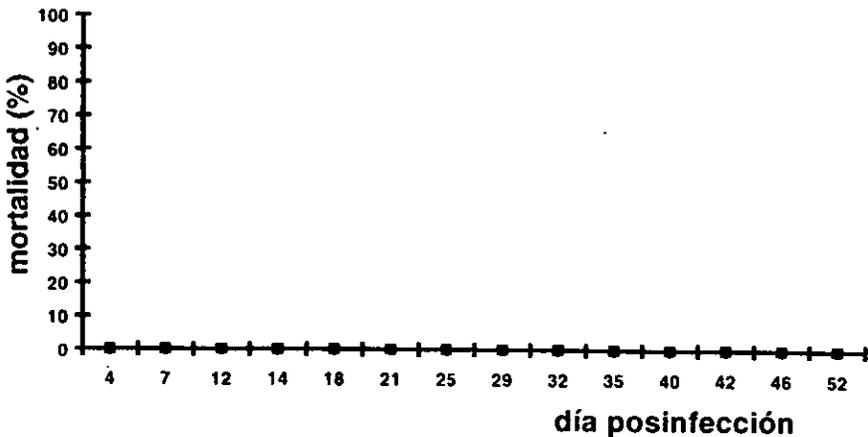


Figura 16. Mortalidad en ratones infectados con *T. cruzi* cepa Purísima antes y después de pasar a través del tracto digestivo de *T. pallidipennis*: ratones inoculados con extracto intestinal de triatóminos infectados (◆), ratones inoculados con tripomastigotes sanguíneos obtenidos a partir de un ratón con parasitemia (■).

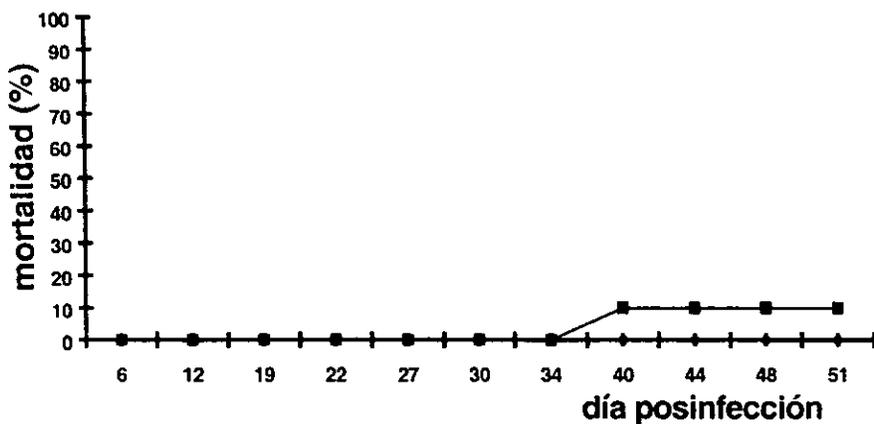


Figura 17. Mortalidad en ratones infectados con *T. cruzi* cepa Oaxtepec antes y después de pasar a través del tracto digestivo de *T. pallidipennis*: ratones inoculados con extracto intestinal de triátominos infectados (◆), ratones inoculados con tripomastigotes sanguíneos obtenidos a partir de un ratón con parasitemia (■).

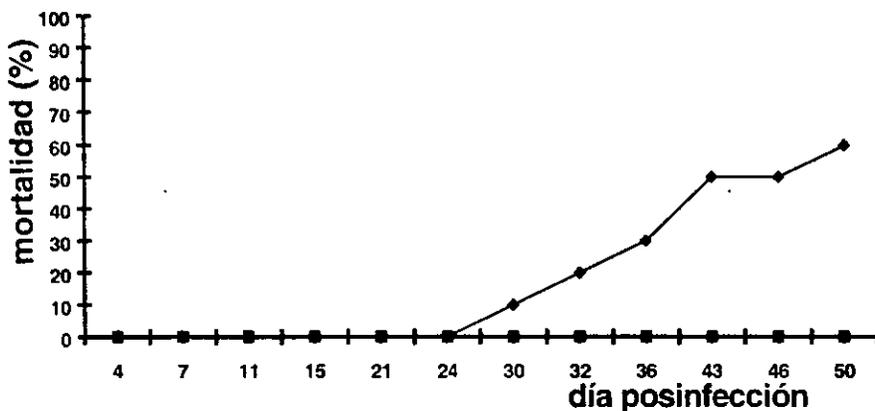


Figura 18. Mortalidad en ratones infectados con *T. cruzi* cepa Tequesquitengo antes y después de pasar a través del tracto digestivo de *T. pallidipennis*: ratones inoculados con extracto intestinal de triátominos infectados (◆), ratones inoculados con tripomastigotes sanguíneos obtenidos a partir de un ratón con parasitemia (■).

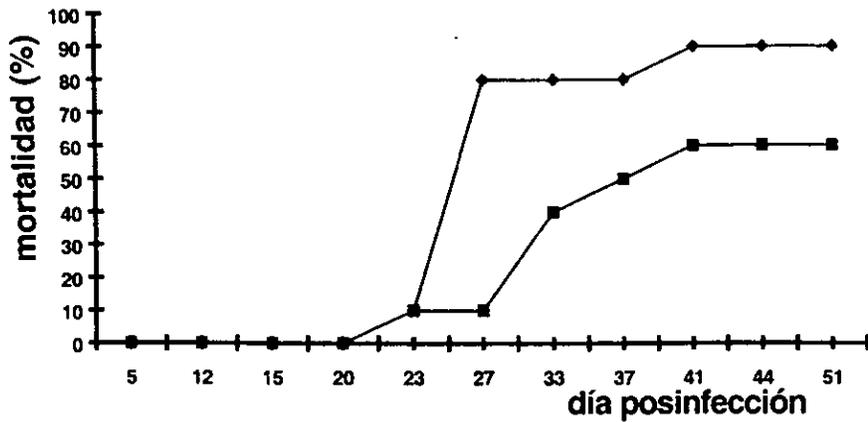


Figura 19. Mortalidad en ratones infectados con *T. cruzi* cepa T5 antes y después de pasar a través de *T. pallidipennis*: ratones inoculados con extracto intestinal de triatóminos infectados (◆), ratones inoculados con tripomastigotes sanguíneos obtenidos a partir de un ratón con parasitemia (■).

7.4. DETERMINACIÓN DE CURVAS DE PARASITEMIA.

Debido a que la intensidad de la parasitemia durante el curso de la infección es otro de los parámetros empleados para determinar la virulencia de *T. cruzi* en los huéspedes vertebrados, se construyeron curvas de parasitemia con los resultados de su determinación en los ratones infectados con las distintas cepas; las curvas resultantes corresponden a las figuras 20-24.

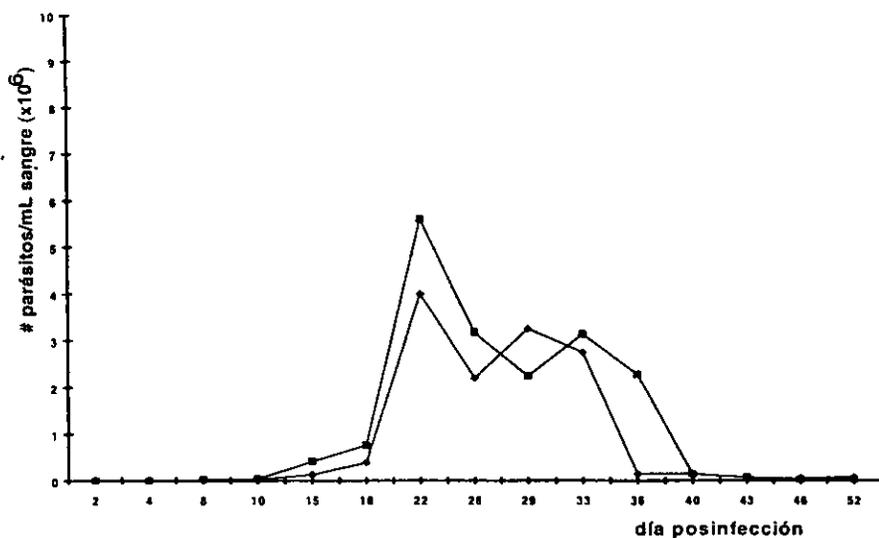


Figura 20. Curvas de parasitemia en ratones infectados con *T. cruzi* cepa Querétaro. Promedio de 10 ratones: ratones inoculados con extracto intestinal de triatóminos infectados (◆), ratones inoculados con tripomastigotes sanguíneos obtenidos a partir de un ratón con parasitemia (■).

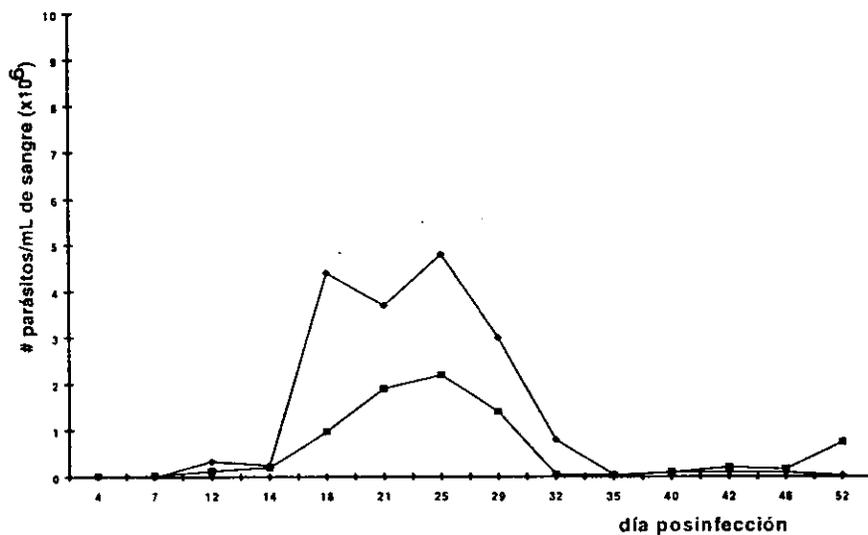


Figura 21. Curvas de parasitemia en ratones infectados con *T. cruzi* cepa Purísima. Promedio de 10 ratones: ratones inoculados con extracto intestinal de triatóminos infectados (◆), ratones inoculados con tripomastigotes sanguíneos obtenidos a partir de un ratón con parasitemia (■).

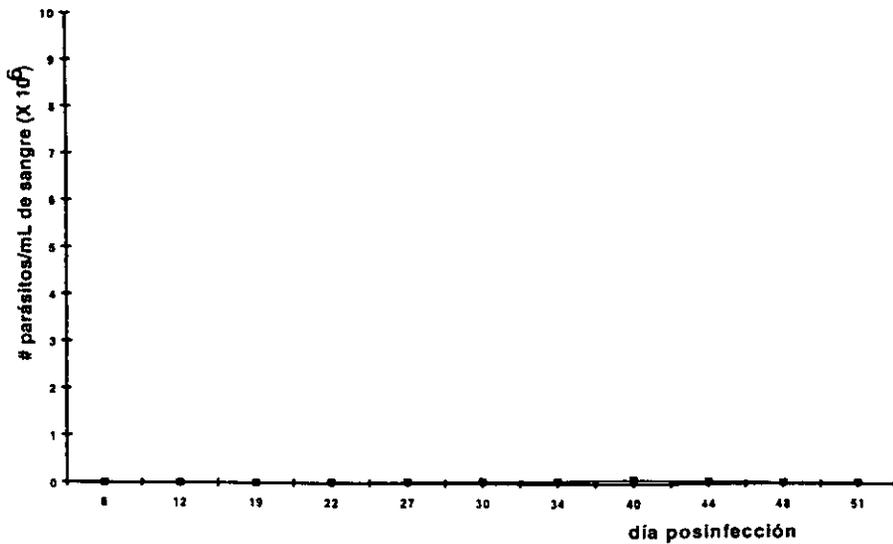


Figura 22. Curvas de parasitemia en ratones infectados con *T. cruzi* cepa Oaxtepec. Promedio de 10 ratones: ratones inoculados con extracto intestinal de triatóminos infectados (◆), ratones inoculados con tripomastigotes sanguíneos obtenidos a partir de un ratón con parasitemia (■).

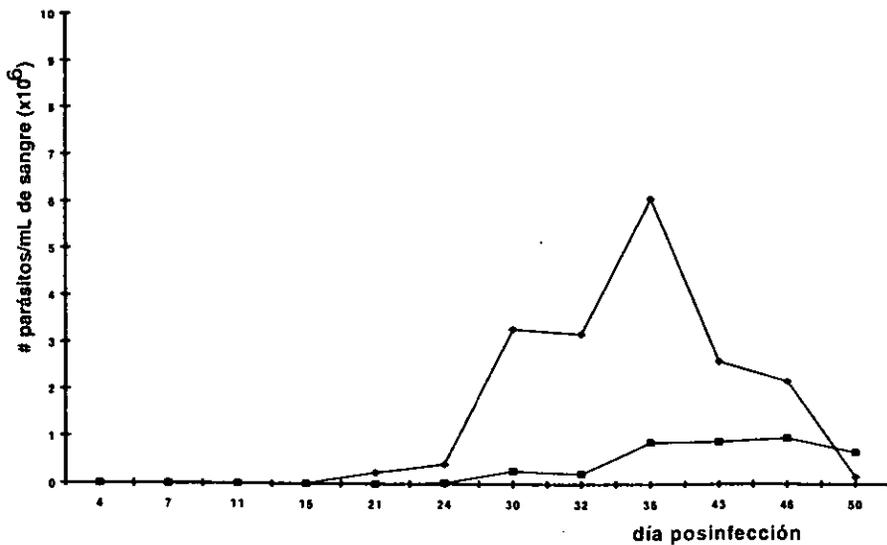


Figura 23. Curvas de parasitemia en ratones infectados con *T. cruzi* cepa Tequesquitengo. Promedio de 10 ratones: ratones inoculados con extracto intestinal de triatóminos infectados (◆), ratones inoculados con tripomastigotes sanguíneos obtenidos a partir de un ratón con parasitemia (■).

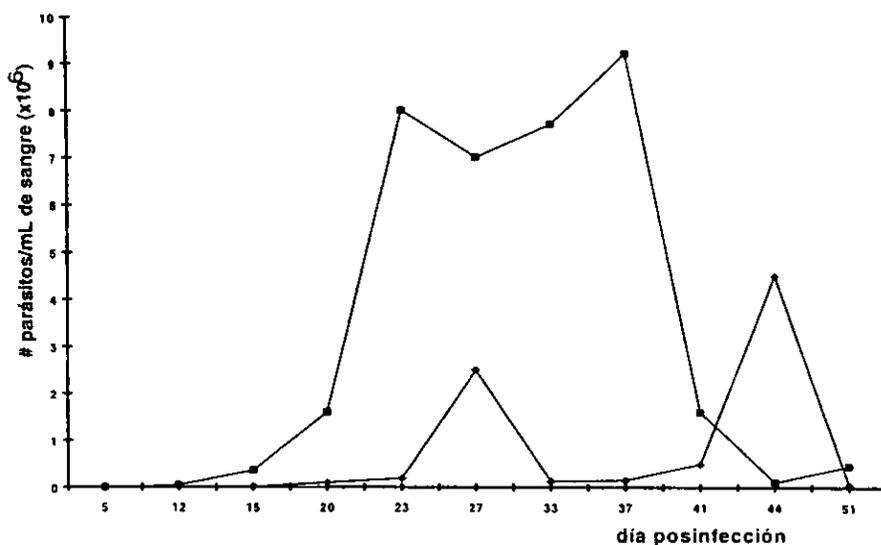


Figura 24. Curvas de parasitemia en ratones infectados con *T. cruzi* cepa T5. Promedio de 10 ratones: ratones inoculados con extracto intestinal de triatóminos infectados (◆), ratones inoculados con tripomastigotes sanguíneos obtenidos a partir de un ratón con parasitemia (■).

Al igual que ocurrió con la mortalidad en los ratones, la cantidad de flagelados en la sangre también presentó variabilidad entre las distintas cepas de *T. cruzi*.

Como puede observarse en la figura 20, los animales inoculados con tripomastigotes sanguíneos de la cepa Querétaro presentaron un promedio máximo de 6×10^6 tripomastigotes/mL de sangre, mientras que la parasitemia en los ratones inoculados con extracto intestinal de triatóminos infectados con esta misma cepa fue un poco más baja, pero con un comportamiento similar, ya que ambas curvas de parasitemia presentan aumentos y disminución en la cantidad de parásitos en los mismos días.

En los ratones infectados con la cepa Purísima (fig. 21), se observó una cantidad mayor de flagelados en sangre en aquellos ratones inoculados con extracto intestinal de triatóminos, alcanzando un promedio máximo de casi 5×10^6 parásitos/mL de sangre, aunque las curvas de parasitemia de ambos grupos de ratones presentan semejanzas en cuanto al tiempo en que se presentaron los incrementos y disminución de los flagelados.

Un comportamiento diferente se observa en los ratones infectados con la cepa Oaxtepec (fig 22), ya que en la sangre de los ratones inoculados con extracto intestinal de triatóminos no se detectaron parásitos durante todo el período de estudio, en tanto que en los ratones inoculados con tripomastigotes sanguíneos las cantidades de flagelados encontradas en la sangre fueron muy bajas, con un máximo de 0.08×10^6 parásitos/mL de sangre (ligeramente observable).

Del mismo modo, pueden observarse diferencias entre las dos curvas de parasitemia de la figura 23, que corresponden a los ratones infectados con la cepa Tequesquitengo, ya que la cantidad de flagelados en la sangre de los ratones inoculados con extracto intestinal de triatóminos alcanzó un promedio máximo de 6.1×10^6 parásitos/mL de sangre, mientras que el valor promedio más alto de la parasitemia en los ratones inoculados con tripomastigotes sanguíneos fue de casi 1×10^6 .

Los ratones inoculados con tripomastigotes sanguíneos de la cepa T5 (figura 24) fueron los que presentaron las parasitemias más altas en todo el estudio, sobrepasando los 9×10^6 parásitos/mL de sangre en su punto máximo. Observando la misma figura puede apreciarse que en los ratones inoculados con extracto intestinal de triatóminos, las parasitemias encontradas fueron mucho más bajas.

7.4. DETERMINACIÓN DEL HISTOTROPISMO DE LAS CEPAS DE *T.cruzi*.

La evaluación de la virulencia de las cepas de *T.cruzi* en los ratones se completó determinando la capacidad del parásito para invadir los tejidos, para lo cual se calculó el porcentaje de animales con nidos de amastigotes en bazo, corazón y pulmones, empleando los resultados obtenidos de la búsqueda de amastigotes en los cortes histopatológicos. Los porcentajes resultantes se encuentran en las figuras 25-28.

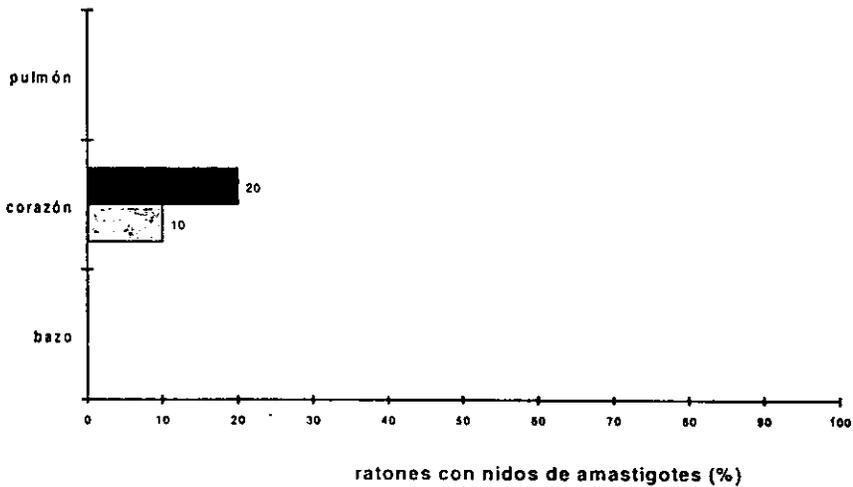


Figura 25. Porcentaje de ratones con nidos de amastigotes que fueron infectados con la cepa *Purísima* de *T.cruzi*: ratones inoculados con extracto intestinal de triatóminos infectados (□), ratones inoculados con tripomastigotes sanguíneos (■).

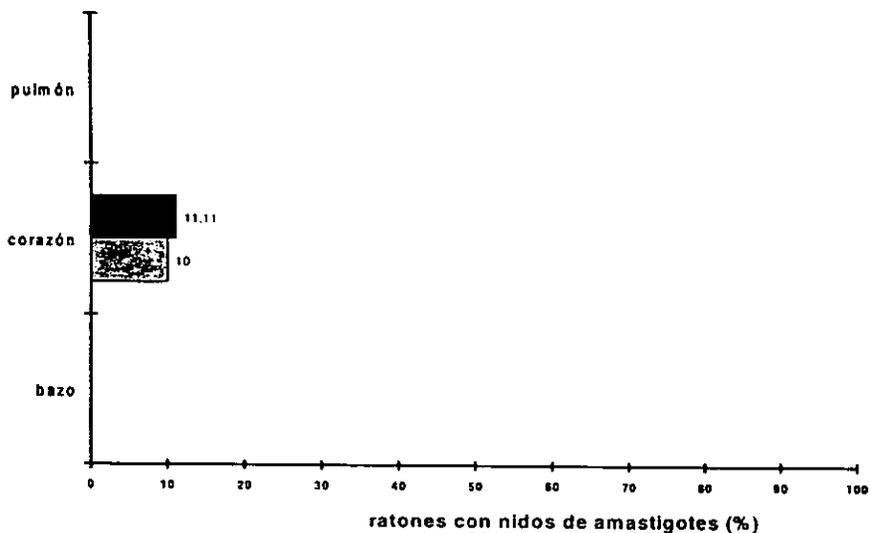


Figura 26. Porcentaje de ratones con nidos de amastigotes que fueron infectados con la cepa **Oaxtepec** de *T.cruzi*: ratones inoculados con extracto intestinal de triatóminos infectados (▨) ratones inoculados con tripomastigotes sanguíneos (■)

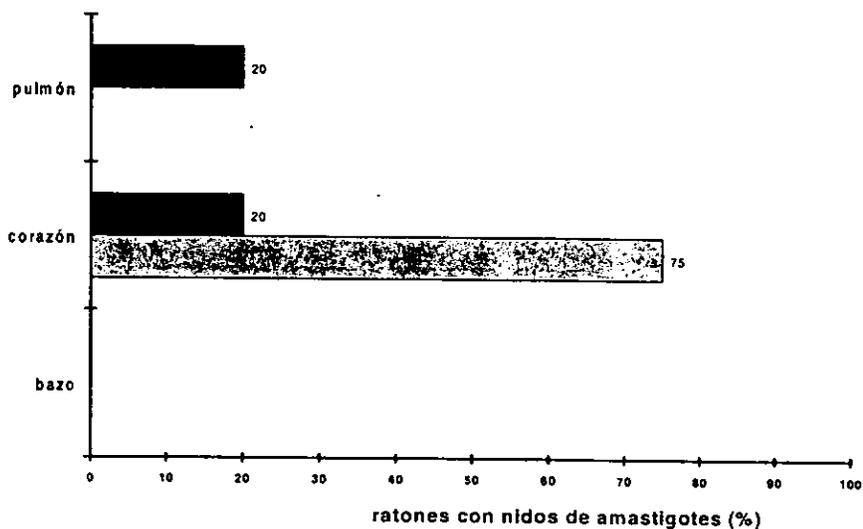


Figura 27. Porcentaje de ratones con nidos de amastigotes que fueron infectados con la cepa **Tequesquitengo** de *T.cruzi*: ratones inoculados con extracto intestinal de triatóminos infectados (▨), ratones inoculados con tripomastigotes sanguíneos (■).

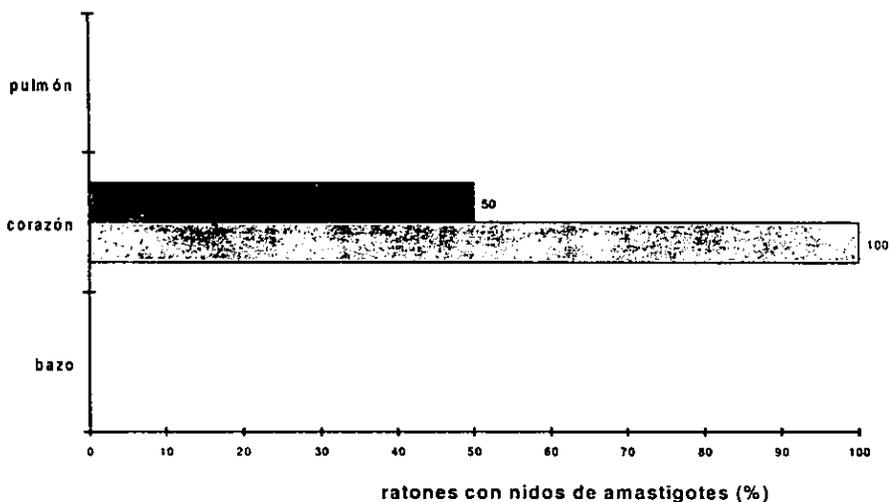


Figura 28. Porcentaje de ratones con nidos de amastigotes que fueron infectados con la cepa T5 de *T.cruzi*: ratones inoculados con extracto intestinal de triatóminos infectados (▨), ratones inoculados con tripomastigotes sanguíneos (■).

Como puede observarse en las figuras 25-28, se presentaron diferencias entre los ratones infectados con las distintas cepas de *T.cruzi* en cuanto a los porcentajes de animales con nidos de amastigotes resultantes.

En primer lugar, en los ratones infectados con la cepa Querétaro, no se encontraron nidos de amastigotes en ninguno de los órganos analizados (resultados no mostrados).

La figura 25 muestra los resultados de los animales infectados con la cepa Purísima y en ella puede observarse que en un 10% de los ratones inoculados con el contenido intestinal de los

triatóminos infectados con esta cepa, se encontraron nidos de amastigotes, mientras que en los ratones inoculados con tripomastigotes sanguíneos, este porcentaje fue del 20%; también puede observarse en la misma figura que de los tres órganos analizados, el corazón fue el único donde se encontraron parásitos intracelulares de esta cepa.

Al igual que en los ratones infectados con la cepa Purísima, solamente se encontraron amastigotes en el corazón de los ratones infectados con la cepa Oaxtepec, en la cual, un 10% de los ratones inoculados con extracto intestinal de triatóminos presentaron nidos de amastigotes, en tanto que el porcentaje de ratones con nidos de amastigotes fue de 11.11% para los ratones inoculados con tripomastigotes sanguíneos (fig. 26).

Los ratones infectados con la cepa Tequesquitengo (fig. 27) presentaron porcentajes más elevados de animales con nidos de amastigotes con respecto a los inoculados con las cepas descritas anteriormente: 75% de los ratones inoculados con extracto intestinal presentaron nidos de amastigotes en el corazón, mientras que en un 20% de los animales inoculados con tripomastigotes sanguíneos se observaron nidos de amastigotes en el corazón y en otro 20% de ellos se localizaron nidos de amastigotes en los pulmones.

Los porcentajes más altos de animales con nidos de amastigotes se encontraron en la cepa T5 (fig. 28), en la cual todos los ratones inoculados con extracto intestinal de triatóminos infectados con dicha cepa presentaron al parásito intracelularmente en el corazón y lo mismo ocurrió con la mitad de los ratones inoculados con tripomastigotes sanguíneos.

En cuanto al histotropismo de las diferentes cepas, los resultados de las figuras 25-28 muestran una predilección del parásito por invadir el corazón, por lo que puede decirse que estas cepas son cardiotrópicas.

7. DISCUSIÓN.

Los resultados obtenidos muestran que la infección de las ninfas de *Triatoma pallidipennis* con *T. cruzi* logró establecerse con todas las cepas del parásito, no solamente con aquellas cepas provenientes de localidades donde se ubica esta especie de transmisor, de la cual fueron aisladas (Oaxtepec, Tequesquitengo) sino que además, con cepas que fueron aisladas de otras especies de triatóminos, como son *Triatoma barberi* y *Triatoma dimidiata*, que habitan en las regiones donde se llevó a cabo el aislamiento de dichas cepas (cepas Querétaro, Purísima y T5). La infección de *T. pallidipennis* con todas las cepas de *T. cruzi* estudiadas, concuerda con los resultados de los estudios de Alejandro-Aguilar y cols. (1993), en donde se indica que esta especie de transmisor posee una gran susceptibilidad a la infección por *T. cruzi*.

Con respecto a la densidad parasitaria en las heces de los triatóminos, puede observarse que resultó distinta en cada cepa de *T. cruzi*. Estos resultados permiten suponer que el riesgo de infección de los huéspedes vertebrados está en función de la cepa del parásito, ya que dicho riesgo aumenta cuando un si la densidad parasitaria en las heces de los triatóminos es alta. Este fue el caso de las cepas Querétaro y Purísima, de las cuales llegaron a encontrarse millones de flagelados en cada mL de heces, a diferencia de las cepas restantes (Oaxtepec, Tequesquitengo y T5), en donde se encontraron cantidades menores. Los resultados también muestran que el número de parásitos en las deyecciones no se mantuvo constante a través del tiempo, y en determinados periodos del estudio, como fue el comprendido entre los días 36 y 42, todas las cepas presentaron una densidad parasitaria semejante, lo que permite suponer que en este periodo, el riesgo de transmisión de *T. cruzi* a

un vertebrado es equivalente entre todas las cepas. A pesar de que el trabajo de Noguera-Torres y cols.(1993) demostró que *T. pallidipennis* posee patrones de defecación sobre su huésped que pueden considerarse como prolongados cuando se comparan con los de otras especies, esta variabilidad en la cantidad de flagelados expulsados junto con las heces que se presenta en esta especie de triatómino, como resultado de las características únicas de cada cepa de *T. cruzi*, podría considerarse como un factor adicional al estudiar la capacidad de transmisión de estos artrópodos.

El conteo de las diferentes fases del parásito encontradas en las heces de los triatóminos infectados con las distintas cepas de *T. cruzi*, permitió determinar en cuales de estas fue más activo el proceso de metaciclo. Es un hecho que el desarrollo morfológico de los tripanosomas a través del tracto digestivo de los triatóminos, está en función de las características genéticas de cada cepa, como lo demuestra el estudio de Schaub (1989); la forma en que cada cepa lleva a cabo este proceso dentro del insecto repercute finalmente en la cantidad de tripomastigotes metacíclicos infectantes expulsados.

Se esperaba que el tripomastigote metacíclico fuera la forma parasitaria más abundante en las heces de los triatóminos, debido a que esta fase permanece fija a la pared rectal del insecto y es arrastrada por las heces al momento de la defecación. Sin embargo, en ocasiones llegaron a encontrarse en todas las cepas, grandes cantidades de epimastigotes y formas transicionales; esto ocurrió posiblemente debido a que la fase que mantiene la infección en el insecto es precisamente el epimastigote, para lo cual debe dividirse activamente y en forma constante en la luz del intestino medio, mientras que el tripomastigote metacíclico es una forma no replicativa. La replicación sostenida de los epimastigotes necesaria para mantener perenne la infección en los triatóminos, pudo ocasionar que en determinado momento estas formas aumentaran en gran cantidad y fueran

expulsadas junto con las heces al momento de la defecación, en tanto que las formas transicionales no completaron la metacicloogénesis.

Un común denominador fue la predominancia de *T. cruzi* en fase de tripomastigote después del día 40 posinfección para las cepas estudiadas, con excepción de la cepa Tequesquitengo y en menor grado T5.

Las muestras de heces con proporciones más altas de tripomastigotes metacíclicos, fueron las pertenecientes a los triatóminos infectados con las cepas Querétaro y Purísima, y continuando en orden decreciente, las de las ninfas infectadas con Oaxtepec, T5 y Tequesquitengo.

Estos resultados permiten sugerir que las cepas Querétaro y Purísima son potencialmente mejor transmisibles por *T. pallidipennis*, ya que en las heces presentaron las mayores cantidades de tripomastigotes metacíclicos, que constituyen la forma infectante para el huésped vertebrado, además de que también fueron las cepas que presentaron la densidad parasitaria más alta.

Es difícil determinar con precisión, de acuerdo a los resultados obtenidos, el riesgo de infección con la cepa Oaxtepec, ya que por una parte, se encontró predominancia de tripomastigotes metacíclicos entre las fases de *T. cruzi* halladas en las heces, pero también se encontraron bajas densidades parasitarias en las mismas.

La posibilidad de que un huésped vertebrado se infecte al ser picado por *T. pallidipennis* infectado con las cepas de *T. cruzi* Tequesquitengo y T5 puede considerarse como baja, debido a que los valores de densidad parasitaria y de tripomastigotes metacíclicos que presentaron en las heces fueron menores en relación con las demás cepas.

Acerca de la evaluación de la virulencia de las cepas de *T. cruzi* en los ratones y de la influencia que ejerce en ella la interacción del parásito con el transmisor, se encontraron diferencias entre las cepas en los tres parámetros determinados: mortalidad, parasitemia e histotropismo.

Una de las cepas que puede ser considerada como virulenta de las cinco que fueron caracterizadas es la cepa Querétaro, ya que los tripanosomas de esta cepa mantenidos en ratones mataron a la mitad de los animales que se inocularon con estos parásitos, en tanto que los flagelados de esta cepa provenientes del tracto digestivo de los triatóminos provocaron la muerte del 40% de los ratones. Además, la parasitemia en los ratones inoculados con esta cepa fue de las más altas, encontrándose picos de más de 5×10^6 parásitos/mL de sangre en los ratones inoculados con tripomastigotes sanguíneos y más de 4×10^6 parásitos/mL de sangre en los animales inoculados con extracto intestinal de triatóminos. Las grandes cantidades de tripomastigotes sanguíneos corresponden a una intensa multiplicación del parásito en fase intracelular, sin embargo, no se encontraron nidos de amastigotes en ninguno de los tres órganos estudiados, lo cual se debió posiblemente a que esta cepa posee afinidad por tejidos diferentes a los analizados, o quizás tiene preferencia por permanecer en sangre. La semejanza en los resultados obtenidos en los tres parámetros entre ambos grupos de ratones, permiten afirmar que no existió ninguna influencia del microambiente del insecto en la virulencia de esta cepa.

A pesar de que la cepa Purísima fue una de las que presentaron los valores más altos de parasitemia en los ratones, con promedios máximos de 5×10^6 parásitos/mL de sangre en los ratones inoculados con extracto intestinal de triatóminos y de 2×10^6 en ratones inoculados con tripomastigotes sanguíneos, se considera que es una cepa poco virulenta, ya que no murió ninguno de los ratones que fueron infectados con ella. Por otra parte, el porcentaje de ratones con nidos de amastigotes en los órganos analizados fue bajo: 10% en los animales

inoculados con parásitos provenientes del intestino del insecto y 20% en los ratones inoculados con tripomastigotes sanguíneos; estos porcentajes bajos de animales con formas intracelulares contrastan con las parasitemias altas, de manera semejante a lo ocurrido con la cepa Querétaro, por lo que probablemente el tropismo de la cepa Purísima está dirigido a tejidos que no estudiamos en este experimento. Finalmente, tampoco en esta cepa se aprecia una influencia de su pase a través del insecto en los parámetros determinados.

De acuerdo con los resultados obtenidos, la cepa de *T. cruzi* Oaxtepec también puede ser considerada como poco virulenta, puesto que solamente murió un 10% de los ratones inoculados con tripomastigotes sanguíneos, además de que la parasitemia en estos mismos ratones fue la más baja entre todas las cepas. En los ratones inoculados con extracto intestinal de triatóminos no se detectaron parásitos en la sangre: la posibilidad de que en este caso la infección no se hubiera establecido, lo cual hubiera impedido la determinación de la influencia del insecto en la virulencia de esta cepa, queda descartada por el hecho de que se encontraron formas intracelulares en el corazón del 10% de estos ratones. Al igual que en las cepas del estado de Querétaro, la interacción de la cepa Oaxtepec con *T. pallidipennis* no modificó significativamente la capacidad del parásito para multiplicarse e invadir tejidos.

La mortalidad del 70% de los ratones inoculados con extracto intestinal de triatóminos infectados con *T. cruzi* cepa Tequesquitengo, el pico de parasitemia de 6×10^6 tripomastigotes/mL de sangre y un 75% de ratones con nidos de amastigotes en el corazón, hacen de esta cepa una de las más virulentas de las cinco estudiadas; además, estos resultados contrastan con los obtenidos de los ratones inoculados con tripomastigotes sanguíneos, en donde no murió ningún ratón, el pico de parasitemia fue de 1×10^6 y el 40% de los animales presentó nidos de amastigotes, un 20% de ellos en el corazón y otro 20% en los pulmones. Estos resultados sugieren que el desarrollo de esta cepa en *T. pallidipennis*

conduce a una alteración de su comportamiento dentro del huésped vertebrado, inclusive el histotropismo, ya que los parásitos provenientes del insecto no invaden pulmones.

La cepa T5 fue sin duda la más virulenta de todas si se considera la mortalidad que provocó en los animales: 80% en los inoculados con extracto intestinal de triatóminos y 60% en los inoculados con tripomastigotes sanguíneos. La parasitemia de los ratones inoculados con tripomastigotes sanguíneos de esta cepa fue la más alta: más de 9×10^5 parásitos/mL de sangre, mientras que la de los ratones inoculados con extracto intestinal de triatóminos fue de 2.5×10^6 tripomastigotes en su punto máximo. En cuanto a la determinación del histotropismo, esta cepa también resultó ser cardiotrópica, y la totalidad de los ratones inoculados con extracto intestinal de triatóminos presentó nidos de amastigotes, en tanto que de los ratones inoculados con tripomastigotes sanguíneos, se encontraron formas intracelulares en el 50%. Las diferencias encontradas entre los parámetros resultantes de los ratones inoculados con la cepa mantenida en ratones y la misma cepa desarrollada en el insecto, no son tan significativas como para afirmar que el microambiente del insecto influyó en la virulencia de esta cepa.

Es de hacer notar que las fases de *T. cruzi* que se encontraron en mayor cantidad para las cepas que produjeron mayor muerte en ratones fue de epimastigote (Tequesquitengo y T5). También resalta que los parásitos obtenidos del extracto intestinal de triatóminos infectados con la cepa Tequesquitengo produjeron una mayor mortalidad y parasitemia en los ratones mientras que la mortalidad en los ratones inoculados con la cepa T5 también fue mayor después del pase de esta cepa a través de *T. pallidipennis*, aunque en el caso de la parasitemia no ocurrió lo mismo, ya que fue más baja que la provocada por la cepa mantenida en ratones; este resultado en particular difiere con los hallazgos de Zetelón y cols. (1970), en los cuales las cepas que presentaron las parasitemias más altas fueron también las más invasivas. Otra observación importante es que se produjo una mayor

infectividad en los tejidos de los ratones inoculados con extracto intestinal de triatóminos infectados con las cepas Tequesquitengo y T5, congruente con la virulencia observada al determinar la mortalidad que ocasionaron a los ratones.

La virulencia de la cepa Tequesquitengo de *Trypanosoma cruzi* definitivamente se vió influenciada por el pase a través de *Triatoma pallidipennis*, lo cual fue confirmado con los tres parámetros que permitieron evaluar su poder patogénico: mortalidad, parasitemia e histotropismo. No existe información precisa acerca de las causas de esta influencia del microambiente del insecto en la virulencia del *T. cruzi*, aunque una posible explicación sería la regulación genética de mayor expresión de moléculas del parásito que tienen que ver con su virulencia, la cual definitivamente está en función del huésped en que se encuentra y que da como resultado la capacidad del flagelado para unirse a células del huésped, la posterior penetración intracelular y quizás también un aumento en la velocidad de reproducción, de aquí el porqué del incremento en la parasitemia. Pero otra explicación probable es la selectividad clonal de *T. cruzi*, en la que al pasar por el insecto se seleccionan las clonas más virulentas y las de menor patogenicidad se eliminan y no logran adaptarse, tal como sucedió en el estudio de Lima y cols. (1990) en el que la cepa CL, altamente infectiva, estaba compuesta entre otras, por una clona que resultó avirulenta.

Para el caso de T5 podríamos decir que el microambiente del intestino también influyó en la virulencia de la cepa, sin embargo, el resultado de la determinación de la parasitemia resultó contrario a lo esperado; quizás este parámetro no sea de significancia para demostrar que sí influyó el pase a través del transmisor, pero sí lo sean la mortalidad y el histotropismo.

9. CONCLUSIONES.

De acuerdo con los resultados obtenidos, puede concluirse lo siguiente:

- *Triatoma pallidipennis* demostró ser una especie transmisora de *Trypanosoma cruzi* susceptible a la transmisión con cepas del parásito provenientes de diferentes localidades del país y aisladas de diversas especies de triatóminos mexicanos.
- Existe una variabilidad entre las cepas de *T. cruzi* en cuanto a la cantidad de flagelados expulsados junto con las heces por los triatóminos infectados, la cual repercute en el mecanismo natural de transmisión del parásito a los huéspedes vertebrados; asimismo, la transmisión del *T. cruzi* a dichos huéspedes por conducto de las deyecciones de los insectos no es muy efectiva en los primeros días posinfección, ya que durante este período, la fase del parásito más abundante en las heces es el epimastigote, mientras que el tripomastigote metacíclico, forma infectante para los vertebrados, predomina en las deyecciones aproximadamente después de 40 días de la infección del insecto, aumentando la probabilidad del establecimiento de la infección.
- La cepa Tequesquitengo de *T. cruzi* aumentó significativamente su virulencia en ratones después de pasar por el tracto digestivo de *Triatoma pallidipennis*. El pase de la cepa de *T. cruzi* T5 por el mismo transmisor también aumentó, de manera parcial, su virulencia en ratones.

10. BIBLIOGRAFÍA.

1. Chagas C. (1909). Nova tripanosomiase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi*, n.gen., n.sp., agente etiologico de nova entidade morbida do homem, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 1,159.
2. Schofield C.J. Triatominae. Biología y control. UK: Zeneca Public Health, 1994.
3. Velasco C.O. La enfermedad de Chagas. Dirección General de Epidemiología. Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos Dr. Manuel Martínez Baez. Publicación técnica del INDRE No. 8. México: Secretaría de Salud, 1991.
4. Tay Z.J., Velasco C.O., Lara A.R., Gutiérrez Q.M. Parasitología Médica. Sexta Edición, México: Méndez Editores, 1996:109-133.
5. Control de la Enfermedad de Chagas: Informe de un Comité de expertos de la OMS (Serie de informes técnicos de la OMS; 811) Organización Mundial de la Salud, 1991.
6. Acha N.P., Szyfres B. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. Segunda Edición, Organización Panamericana de la Salud, 1986:590-602.
7. Santos-Buch A.C., Acosta M.A. Pathology of Chagas' disease. En: Tizard I. Editor. Immunology and pathogenesis of trypanosomiasis. Boca Raton, Florida: CRC Press, Inc. 1985:145-183.

8. Kumate J., Gutiérrez G., Muñoz O., Santos J.I. Manual de Infectología Clínica. Decimocuarta Edición, México: Méndez Editores, 1994.
9. Schofield C.J., Dujardin J.P., Jurberg J. (editors) (1996). Proceedings of the International Workshop on Population Genetics and Control of Triatominae, Santo Domingo de los Colorados, Ecuador. INDRE, Mexico City, 116 pp.
10. Tay Z.J., Schenone H., Sánchez J.T., Robert L. (1992). Estado actual de los conocimientos sobre la enfermedad de Chagas en la República Mexicana. *Bol. Chil. Parasitol.* 47:43-53.
11. Velasco-Castrejón O., Valdespino J.L., Tapia-Conyer R., Salvatierra B., Guzmán Bracho C., Magos C., Llausás A., Gutiérrez G., Sepúlveda J. (1992) Seroepidemiología de la enfermedad de Chagas en México. *Salud Pública Mex.* 34:186-196.
12. Levine N.D., Corliss J.O., Cox F.E.G., De Roux G., Grain J., Honighberg B.M., Leedale G.F., Loeblich A.R., Lom J., Lynn D., Merinfeld E.G., Page E.C., Poljansky G., Sprague V., Vavra J. and Wallace F.G. (1980). A newly revised classification of the protozoa. *J. Protozool.* 27:1-37
13. Pereira M.E.A. Cell Biology of *Trypanosoma cruzi*. En: Wyler J.D. Editor. Modern parasite Biology: cellular, immunological and molecular aspects. New York: W.H. Freeman and company, 1990:64-78.
14. Brener Z. (1973). Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Annu. Rev. Microbiol.* 27:349-381.

15. Schaub A.G. (1989). *Trypanosoma cruzi*: Quantitative studies of development of two strains in small intestine and rectum of the vector *Triatoma infestans*. *Exp. Parasitol.* 68:260-273.
16. Zingales B., Colli W. (1985). *Trypanosoma cruzi*: interaction with host cells. *Current Topics in Microbiology and Immunology.* 117 .
17. Burleigh A.B., Adreus W.N. (1995). The mechanisms of *Trypanosoma cruzi* invasion of mammalian cells. *Annu. Rev. Microbiol.* 49:175-200.
18. Thompson R.C.A., Lymbery A.J. (1990). Intraspecific variation in parasites-What is a strain? *Parasitology Today.* 6:345-347.
19. Dvorak J.A. (1984). The natural heterogeneity of *Trypanosoma cruzi*. Biological and medical implications. *J. Cell. Biochem.* 24:357-371.
20. Tybarenc M., Ayala F.J. (1991). Towards a population genetics of microorganisms: The clonal theory of parasitic protozoa. *Parasitology Today.* 7:228-236.
21. Lehane M.J. *Biology of blood-sucking insects.* UK: Harper Collins Academic, 1991.
22. Lent H., Wygodzinsky P. (1979). Revision of the Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) and their significance as vectors of Chagas disease. *Bull. Am. Mus. Nat. Hist.* 163:124-520.
23. Asin S., Catalá S. (1995). Development of *Trypanosoma cruzi* in *Triatoma infestans*: Influence of temperature and blood consumption. *J. Parasitol.* 81:1-7.

24. Salazar S.P.M., De Haro A.I., Unibarren B.T. (1988). Chagas disease in Mexico. *Parasitology Today*. 4:348-352.
25. Zárate G.L., Zárate J.R., Tempelis H.C., Goldsmith R. (1980). The biology and behavior of *Triatoma barbeni* (Hemiptera:Reduviidae) in Mexico: I. Blood meal sources and infection with *Trypanosoma cruzi*. *J. Med. Entomol.* 17:103-116.
26. Zeledón R. El *Triatoma dimidiata* y su relación con la enfermedad de Chagas en Costa Rica.
27. Cortés-Jiménez M., Noguera-Torres B., Alejandro Aguilar R., Isita Tomell L., Ramírez-Moreno E. (1996). Frequency of triatomines infected with *Trypanosoma cruzi* in Cuernavaca city, Morelos, México. *Rev. Lat.-Amer. Microbiol.* 38:115-119.
28. Noguera T.B., Ramírez-Moreno E., Cortés-Jiménez M. (1993). Evaluación de la capacidad de transmisión de *Trypanosoma cruzi* de cinco especies de triatóminos (Insecta:Reduviidae). I. Patrones de defecación. *Zool. Informa.* 26:3-12.
29. Alejandro-Aguilar R., Noguera-Torres B., Calvo-Méndez M.de L., Cortés-Jiménez M. (1993). Estudio comparativo de la susceptibilidad de cinco especies de triatóminos (Insecta:Reduviidae) a la infección con *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Lat.-Amer. Microbiol.* 35:201-206.
30. Andrade A.Z., Andrade G.S. Patología. En: Brener Z., Andrade A.Z. *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas. Río de Janeiro: Guanabara Koogan, 1979:199-248.

31. Villalta F., Kierszenbaum F. (1987). Insect-borne and culture-derived metacyclic *Trypanosoma cruzi*: Differences in infectivity and virulence. *Am.J. Trop. Med. Hyg.* 36:529-532.
32. Lima M.T., Jansen A.M., Rondinelli E., Gattas C.R. (1990). *Trypanosoma cruzi*: properties of a clone isolated from CL strain. *Parasitol. Res.* 77:77-81.
33. Bice E.D., Zeledón R. (1970). Comparison of infectivity of strains of *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909). *J. Parasitol.* 56:663-670.
34. McDaniel P.J., Dvorak J.A. (1993). Identification, isolation and characterization of naturally-occurring *Trypanosoma cruzi* variants. *Mol. Biochem. Parasitol.* 57:213-222.
35. Tay Z.J., Salazar S.P.M., Ontiveros D. (1969). El comportamiento en el ratón blanco de una cepa de *Trypanosoma cruzi* mediante pases sucesivos en diferentes especies de triatomas. *Rev. Lat.-Amer. Microbiol.* 11:79-89.
36. Mello C.B., Azambuja P., García E.S., Ratcliffe N.A. (1996). Differential *in vitro* and *in vivo* behavior of three strains of *Trypanosoma cruzi* in the gut and hemolymph of *Rhodnius prolixus*. *Exp. Parasitol.* 82:112-121.
37. Azambuja P., García E.S. (1991). Development and interactions of *Trypanosoma cruzi* within the insect vector. *Parasitology Today.* 7:240-244.
38. Lima M.T., Jansen A.M., Rondinelli E., Gattas C.R. (1990). *Trypanosoma cruzi*: properties of a clone isolated from CL strain. *Parasitol. Res.* 77:77-81.

39. Neghme A., Alfaro E., Reyes H., Schenone H. (1967). Método para la crianza de laboratorio de *Triatoma infestans* (Klug, 1834) (Hemiptera: Reduviidae). *Bol. Chil. Parasitol.* 22:107-112.

40. Hoff R. A method for counting and concentrating living *Trypanosoma cruzi* in blood lysed with ammonium chloride. *J. Parasitol.* 60:527-528.

10. APÉNDICE.

- DPBS (Dulbecco's PBS)

NaCl	8g	138mM
KCl	0.2g	2.7mM
Na ₂ HPO ₄	1.15g	8.1mM
KH ₂ PO ₄	0.2g	1.2mM
H ₂ O mega pura		1000mL

Filtrar por una membrana de 0.22 μ m y esterilizar en autoclave. Se conserva indefinidamente a temperatura ambiente.

- Solución de cloruro de amonio para lisar eritrocitos.

NH ₄ Cl	0.87g
H ₂ O destilada	100.0mL

Filtrar por una membrana de 0.22 μ m y esterilizar en autoclave. Se conserva indefinidamente a temperatura ambiente.

- Tinción de Giemsa.

Se utiliza para parásitos tisulares y flagelados intestinales.

-Solución madre de Giemsa:

Giemsa en polvo	3.8g
Glicerol	250.0mL
Metanol libre de acetona	250.0mL

En un mortero se coloca un poco de Giemsa en polvo y unos 3mL de glicerol,; con el pistilo del mortero se mezcla mientras se va agregando poco a poco el resto del colorante y el glicerol, hasta obtener una suspensión homogénea; en seguida se adiciona el metanol y se guarda en frasco ámbar, dejándose madurar durante dos meses. Pasado este tiempo se filtra la solución y se ensayan diferentes tiempos de tinción hasta encontrar el óptimo.

- Tinción de eosina-hematoxilina (Cowdry, 1948).

Esta técnica se utiliza para protozoarios intestinales y de cavidades.

-Solución de hematoxilina de Harris:

Hematoxilina	1g
Sulfato doble de aluminio y potasio	20g
Óxido mercurico	0.5g
Etanol absoluto	10.0mL
H ₂ O destilada	200.0mL

-Solución acuosa de eosina:

Eosina	0.2g
H ₂ O destilada	100.0mL

-Solución acuosa de hiposulfito de sodio al 5%

-Solución acuosa saturada de carbonato de litio.

Se disuelve la hematoxilina en 10mL de etanol absoluto; por otro lado se disuelve el sulfato doble de aluminio y potasio en 200mL de agua destilada, con ayuda de calor. Se mezclan ambas soluciones y se colocan rápidamente a hervir y se adiciona en seguida el óxido mercúrico; en este paso la solución se toma púrpura. Se enfría rápidamente en baño de agua fría y se guarda en frasco con tapón esmerilado. Puede adicionarse un 5% de ácido acético.

Método:

1. Portaobjetos con cortes histopatológicos de 5µm de espesor.
2. Alcohol yodado 1 a 2 minutos.
3. Lavar en agua destilada.
4. Solución acuosa de hiposulfito de sodio durante 3 minutos.
5. Lavar en agua destilada.
6. Solución de hematoxilina de 12 a 15 minutos.
7. Lavar con agua destilada adicionada de unas gotas de carbonato de litio durante 5 a 10 minutos.
8. Solución acuosa de eosina durante un minuto.
9. Lavar en agua destilada.
10. Deshidratar en alcoholes en concentraciones crecientes desde 50% hasta absoluto durante 5 minutos en cada uno.
11. Dos pasos de xilol de un minuto cada uno. Montar con resina o bálsamo de Canadá.