

## INFECCIÓN POR *Trypanosoma cruzi* DURANTE EL DESARROLLO DE *Triatoma barberi* USINGER (HEMIPTERA:REDUVIIDAE)

✉ Marco Antonio Becerril-Flores<sup>1</sup>, José Luis Imbert-Palafox<sup>1</sup> y María del Rosario Tovar-Tomás<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>Área académica de Medicina, Instituto de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Carretera Pachuca-Tulancingo Km 4.5 Pachuca (Municipio: Mineral de la Reforma, Hgo. Código Postal: 42074.

<sup>2</sup>Área académica de Biología, Instituto de Ciencias Biológicas e Ingeniería, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Carretera Actopan-La Concepción San Juan Tilcuautla) San Agustín Tlaxiaca, Hgo. Código Postal: 42160.

✉ Correo: mbecerril\_65@yahoo.com.

**RESUMEN.** Los triatóminos son hemípteros reduvidos que transmiten a *Trypanosoma cruzi*, el agente causal de la enfermedad de Chagas. Aunque una de las mejores especies transmisoras es *Triatoma barberi*, no se sabe cómo es la infección durante sus diferentes fases. Para este trabajo se infectaron con *Trypanosoma cruzi* cinco ejemplares de cada uno de las fases ninfales, machos y hembras. Se alimentaron sobre un ratón con parasitemia determinada midiendo la cantidad de heces y parásitos ingeridos. Durante 30 días, cada cuarto día se provocaba su defecación y con un ml de heces, se realizaba examen directo para contar los parásitos, así como tinción de Giemsa para identificar las fases de *Trypanosoma cruzi*. Los resultados indicaron que todas las fases se infectan; la fase con mayor cantidad de parásitos es del quinto estadio. La fase de *Trypanosoma cruzi* más frecuente fue el tripomastigote. Los resultados explican gran eficacia de *T. barberi* como transmisor.

**Palabras clave:** *Triatoma barberi*, *Trypanosoma cruzi*, desarrollo.

### *Trypanosoma cruzi* infection during development of *Triatoma barberi* USINGER (Hemiptera: Reduviidae)

**ABSTRACT.** Triatomine are Hemiptera reduviids that transmit *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas disease. Although *Triatoma barberi* is one of the best vector species, it is not known how is the infection in every phase. For this study five triatomine of each of the instar as well as males and females were infected with *Trypanosoma cruzi*. Insects were fed on a mouse with parasitaemia determined by measuring the amount of feces and ingested parasites. For 30 days and every fourth day one ul of feces was observed by direct examination and the count of trypanosomes was performed and Giemsa staining allowed identify *Trypanosoma cruzi* phases. The results indicated that all phases were infected; fifth instar was the phase with the highest number of parasites. *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes was the most frequent. The results allow explain high efficiency of *T. barberi* as vector.

**Key words:** *Triatoma barberi*, *Trypanosoma cruzi*, development.

## INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis Americana, es una enfermedad parasitaria potencialmente mortal causada por el protozooario flagelado *Trypanosoma cruzi*. Esta enfermedad se presenta principalmente en América Latina y se estima que afecta a 10 millones de personas y más de 25 millones podrían estar en riesgo de adquirir la enfermedad (OMS, 2010). La enfermedad se adquiere por el contacto con las heces de insectos chupadores de sangre denominados Triatóminos. Estos son organismos pertenecientes al orden Hemiptera, suborden Heteroptera, Familia Reduviidae y subfamilia Triatominae. Todos los miembros de esta subfamilia son hematófagos, característica que se considera reciente en términos evolutivos (Tartarotti, 2006).

En México, un vector importante es *Triatoma barberi*, que se distribuye en 12 de sus estados: Colima, Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Michoacán, Morelos, Oaxaca, Puebla, Querétaro, Tlaxcala, Veracruz y el Distrito Federal. Su importancia como vector radica en su amplia distribución dentro del territorio nacional y por su domiciliaridad, así como por sus hábitos alimenticios nocturnos; prefiere la sangre de mamíferos y su defecación la efectúa al momento de alimentarse (Martínez-Ibarra *et al.*, 2005; Salazar-Schettino *et al.*, 2005). Igualmente Becerril y colaboradores reportan a *Triatoma barberi* como un buen transmisor de *T. cruzi* (Becerril y cols. 2010). Aunque se piense que esta especie de triatomino es buena transmisora, aún no se ha explicado el porqué. En este trabajo se describe la infección con el parásito en cada una de las fases de desarrollo de esta especie de triatomino.

## MATERIALES Y MÉTODO

**Triatóminos.** Los triatóminos estudiados pertenecen a la especie *Triatoma barberi*, los cuales se han mantenido en el laboratorio por 10 años. Se seleccionaron aleatoriamente 35 individuos: cinco ejemplares de cada uno de los cinco estadios ninfales, cinco machos y cinco hembras quienes se distribuyeron por fase colocándolos en recipientes de plástico con una base de cartón y otro cartón plegado a manera de abanico (fig. uno).



Fig.1 Incubación de triatóminos repartidos en recipientes por cada fase.

**Infección de triatóminos con *Trypanosoma cruzi*.** Antes de la infección cada triatomino se pesó. Dentro de su recipiente, los triatóminos se colocaron durante una hora sobre la parte ventral de un ratón CD-1, sujetado fijamente y en cuya sangre se determinó previamente la concentración de  $2.1 \times 10^5$  tripomastigotes sanguíneos/ml. Posteriormente se volvieron a pesar cada uno de los insectos. Obteniendo la diferencia de peso de cada triatomino se pudo calcular la cantidad de sangre ingerida. La densidad de la sangre del ratón se determinó previamente resultando ser de 10 mg/ml. Conociendo la cantidad en peso de sangre ingerida y la densidad de la misma, determinó el volumen de sangre ingerida y considerando la parasitemia se calculó la cantidad de parásitos ingeridos por cada triatomino.

**Cinética de infección de triatóminos.** Una vez infectados los insectos, cada cuarto día se presionaba su abdomen ayudándose de pinzas de disección con la finalidad de provocar la defecación de tal forma que las heces se colocaran sobre un portaobjetos; de ahí se tomaba un ml

y se mezclaba con nueve ml de solución de NaCl al 0.85%, entonces este volumen total se colocaba entre portaobjetos y cubreobjetos para realizar el conteo total de los parásitos observados.

**Determinación de metaciclojenia.** Una vez realizado el conteo se separaba el cubreobjetos y la muestra en el portaobjetos se fijaba, colocando encima metanol absoluto por cinco minutos y enseguida colorante Giemsa durante 20 minutos para después lavar la preparación con agua corriente; una vez dejando secar, se procedió a observar bajo el microscopio y contar epimastigotes, tripomastigotes u otras formas. Del total de parásitos observados se calculaba el porcentaje de cada fase de *T. cruzi*.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la figura dos podemos observar que a medida que se desarrolla más el triatómino, la cantidad de sangre del ratón que ingiere es mayor; los pesos variaron entre uno y 13 mg de sangre lo que equivale a 0.1 a 1.3 ml pues como se mencionó antes, la densidad de la sangre es de 10 mg/ml. Además cabe mencionar que el quinto estadio es el que consume más sangre, luego las hembras. Quizás esto podría explicarse por el tamaño del organismo, entre más grande, su intestino es mayor y por tanto es mayor la cantidad de sangre que ingieren; sin embargo, aunque un adulto presenta un mayor tamaño que una ninfa es probable que el quinto estadio requiera más cantidad alimenticia para mudar a adulto; luego sigue la hembra porque necesita prepararse para la cópula y oviposición, por lo que requiere mayor aporte energético.

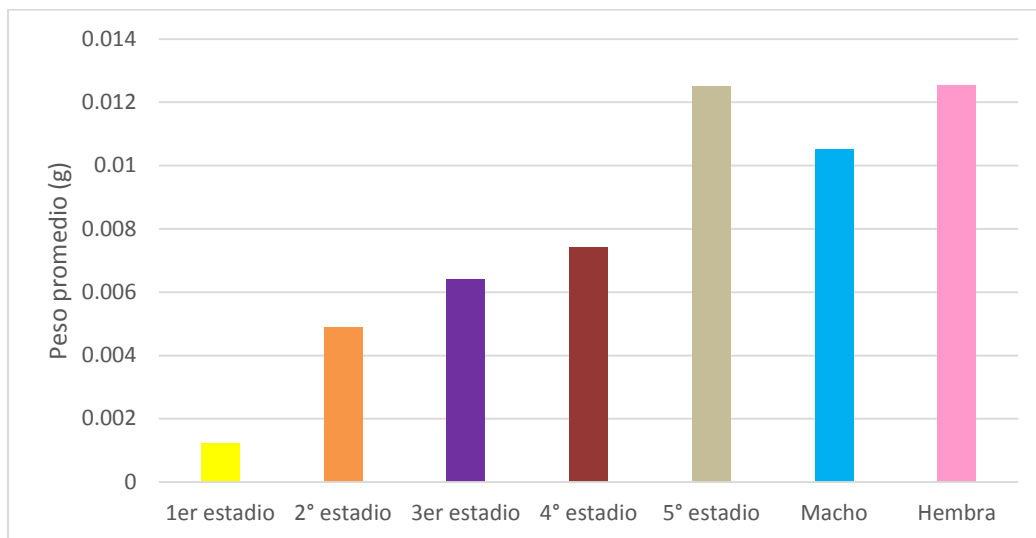


Fig. 2 Peso promedio de sangre ingerida por cada fase de triatómino.

En la figura tres podemos observar la cantidad total de parásitos que ingieren los triatóminos. Si los triatóminos ingirieron entre 0.1 a 1.3 ml de sangre del ratón, y la parasitemia fue de  $2.1 \times 10^5$  parásitos/ml de sangre, entonces el rango de cantidad de parásitos ingeridos osciló de  $0.21$  a  $2.7 \times 10^5$  (20,000 a 270 mil parásitos para cada insecto). De la misma manera como se presenta en la figura uno, también las fases que se infectan con más parásitos son las del quinto y hembras, en tercer lugar los machos. Este resultado refuerza las observaciones de Durán P. y colaboradores (2014) en que demuestran que las ninfas del quinto estadio de la especie *Triatoma*

*infestans* son mejores transmisores que los adultos. Es importante señalar que la consecuencia de infectarse con más parásitos aumenta la probabilidad de ser más transmisores.

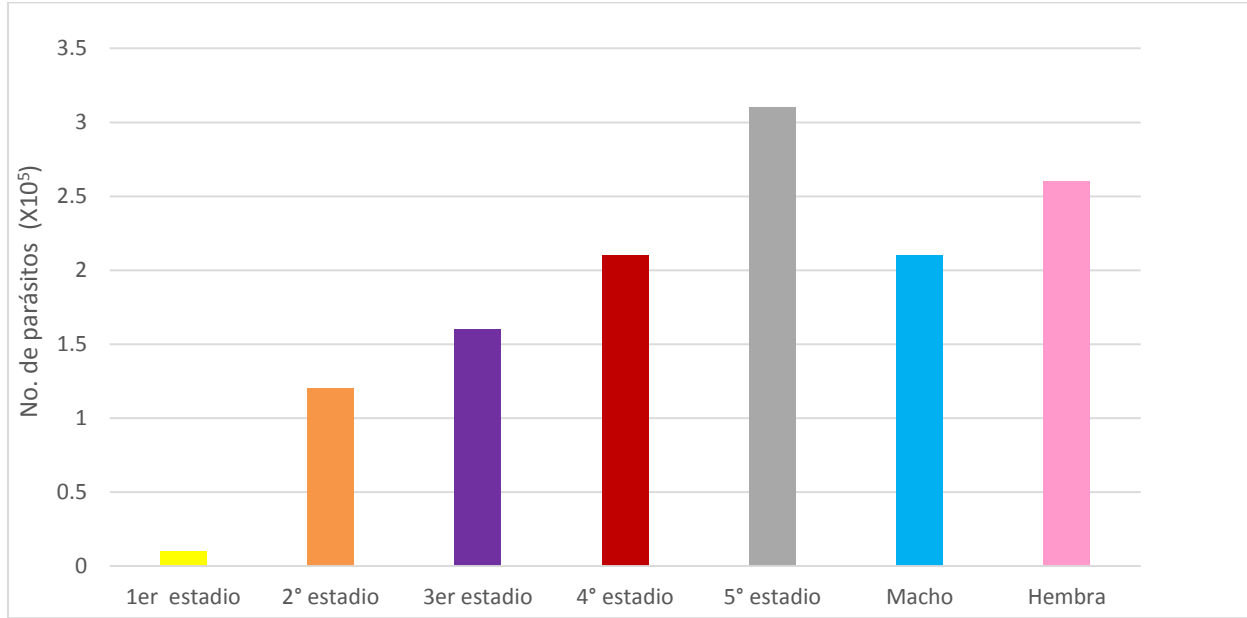


Fig.3 Número promedio de parásitos ingeridos por cada fase de triatóminos.

Para saber si la cantidad de parásitos ingerida corresponde a la cantidad de parásitos que presenta en las diferentes fases de desarrollo de los insectos se graficó a distintos tiempos la cantidad de tripanosomas. En la figura cuatro se puede observar la forma como se presenta la cinética de la infección con *Trypanosoma cruzi* en cada fase de triatómino; es importante señalar que no se pudieron observar los parásitos en los triatóminos de primer estadio pero si en los restantes.

Por un lado es de llamar la atención que desde el día siete de infección ya se observan parásitos en las heces del resto de las fases. También se puede notar un pico de máxima presencia de parásitos al día 19 para los estadios del cuarto en adelante, pero para segundo y tercer estadio es hasta el día 23 y 28 respectivamente. La cantidad de parásitos en heces varía entre 0.6 y  $1 \times 10^6$  parásitos/ml. Los triatóminos eliminan una gota de su excremento cuyo volumen equivale aprox. a 20  $\mu\text{L}$ ; es decir, que eliminan entre 12 mil a 20 mil parásitos. Si comparamos estas cantidades contra las de los parásitos ingeridos, observamos una reducción desde la mitad hasta una décima parte. Lo anterior hace pensar que la cantidad de parásitos ingerida al inicio de la infección no necesariamente corresponde a la cantidad de tripanosomas que se va a desarrollar, tal como se observa en las fases del cuarto estadio y machos que llegaron a eliminar por heces más que las hembras; por otro lado observamos que las hembras eliminan menos parásitos con el tiempo aunque tienden a mantener una cifra constante.

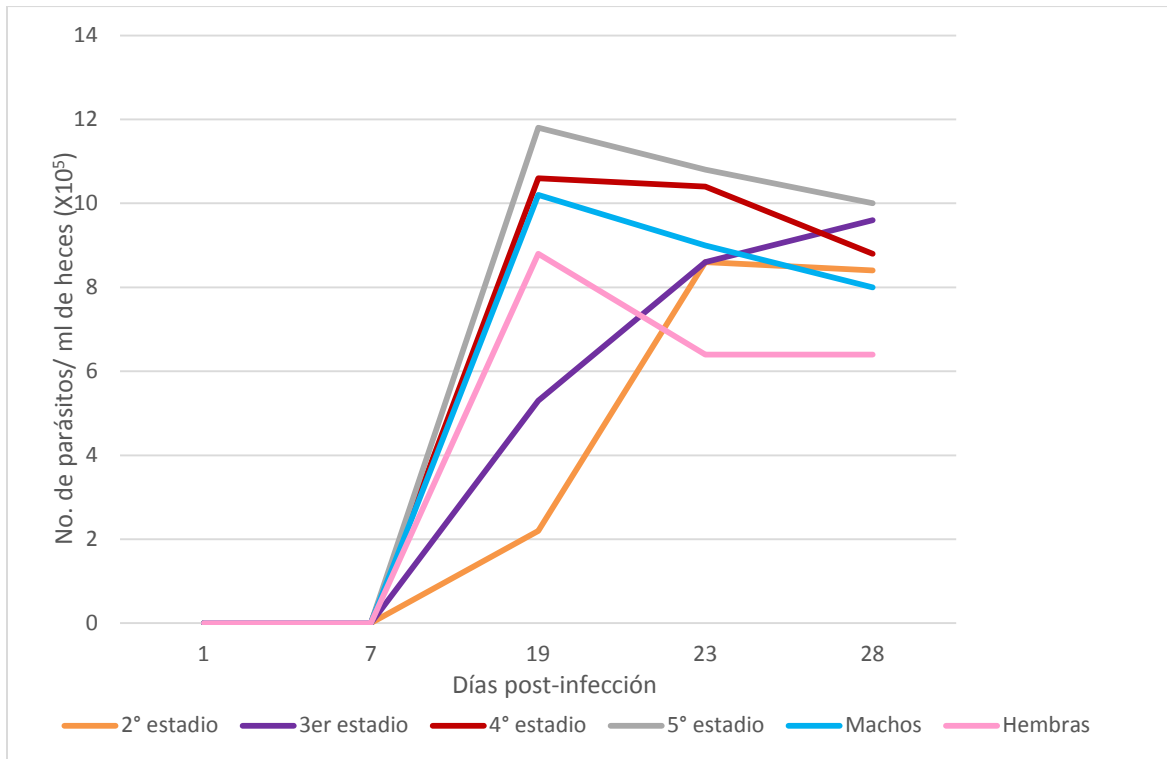


Fig. 4. Cinética de infección de *Trypanosoma cruzi* en cada fase de triatóminos.

Tabla 1. Porcentaje de cada fase de *Trypanosoma cruzi* observada para cada fase del triatómino.

Fase de desarrollo del triatomino	Epimastigotes	Tripomastigotes	Otras
Primero	Nd	Nd	Nd
Segundo	40 %	40%	20%
Tercero	40 %	40%	20%
Cuarto	40 %	60%	0%
Quinto	20%	80%	0%
Macho	20%	80%	0%
Hembra	20%	50%	30%

Nd: no se pudo determinar.

En la tabla uno se puede ver que la cantidad de tripomastigotes en heces es mayor conforme avanza el desarrollo del triatomino, excepto en las hembras; y que en estas últimas aumenta la cantidad de otras fases del parásito.

Los resultados permiten concluir que hay alto riesgo de transmisión de *Trypanosoma cruzi* pues pueden eliminar desde más de 10 mil parásitos. Sin embargo, aún faltan más estudios que permitan entender las condiciones para que se presente la transmisión tal como la variación de la cantidad de parásitos a lo largo de la vida completa del triatomino, ¿Cuál es la mínima cantidad de parásitos que permiten la infección? y si la fase influye en la capacidad para llevar a cabo la infección. Factores de adaptabilidad de *Trypanosoma cruzi* podrían estar influyendo en la sobrevivencia del parásito tal como lo describen Noireau y cols. (2009) y Garcia y cols.(2007),

así como lo proponen Kollien AH, Schaub GA (2000), lo cual explicaría que la cantidad de los parásitos que inicialmente infectan, pueden ser eliminados por algunas fases y no para otras. Dentro de estos factores están los relacionados con mucinas lo cual sería importante investigar en *Triatoma barberi* tal como sugieren Gonzalez y cols. (2013).

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por la Secretaría de Educación Pública bajo el programa SEP-PROMEP para el apoyo de la Red temática de investigación “Red epidemiológica de enfermedades zoonóticas y transmitidas por vector (Etv’s) de importancia en salud pública”. También se agradece la colaboración de la Ing. En Biotecnología Karen Lizbeth Cordero Mejía por su apoyo en el desarrollo de las figuras e imágenes.

## LITERATURA CITADA

- Durán P., Siñani E., Depickère S. 2014. Biological cycle and preliminary data on vectorial competence of *Triatoma boliviana* in laboratory conditions. *Acta Trop.*140:124-9. doi: 10.1016/j.actatropica.2014.08.014.
- Evangelista-Martínez Z, Imbert-Palafox JL, Becerril-Flores MA, Gómez-Gómez JV. 2010. [Morphologic analysis of eggs of *Triatoma barberi* Usinger (Hemiptera: Reduviidae)]. *Neotropical entomology.* 39(2):207-13
- García E.S., Ratcliffe N.A., Whitten M.M., Gonzalez M.S., Azambuja P. 2007. Exploring the role of insect host factors in the dynamics of *Trypanosoma cruzi*-*Rhodnius prolixus* interactions, *J. Insect Physiol.* 53:11–21.
- Gonzalez MS, Souza MS, García ES, Nogueira NF, Mello CB, Cánepa GE, Bertotti S, Durante IM, Azambuja P, Buscaglia CA. 2013. *Trypanosoma cruzi* TcSMUG L-surface mucins promote development and infectivity in the triatomine vector *Rhodnius prolixus*. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013 Nov 14;7(11):e2552. doi: 10.1371/journal.pntd.0002552.
- Kollien AH, Schaub GA. 2000. The development of *Trypanosoma cruzi* in triatominae. *Parasitol Today.* 16(9):381-7.
- Martínez-Ibarra, JA., Noguera-Torres, B., Paredes, E., Alejandro-Aguilar, R., Solorio-Cibrian, M., Barreto, SP., Gómez-Estrada, HI. & Trujillo-García, JC. 2005. Development of *Triatoma rubida* Sonoriana, *Triatoma barberi* and *Meccus mazzottii* (Heteroptera, Reduviidae) under laboratory conditions. *Journal of the American Mosquito Control Association* 21(3): 310-315.
- Noireau, F., Diosque, P. & Jansen AM. 2009. *Trypanosoma cruzi*: adaptation to its vectors and its hosts. *Vet. Res.* 40(26).
- Salazar-Schettino, P.M., De Haro-Arteaga, I. y Cabrera-Bravo, M. 2005. Importance of three triatoma vectors of *Trypanosoma cruzi* in México. *Medicina (B Aires)* 65(1): 63-69.
- Tartarotti, E., Azaredo-Oliveira, MTV. & Ceron, CR. 2006. Phylogenetic approach to the study of triatomines (Triatominae, Heteroptera). *Braz. J. Biol.* 66(2B): 703-708.
- WHO, 2010. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/es/index.html>.