

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA
PROGRAMA EXPERIENCIAS DOCENTES CON LA COMUNIDAD
SUBPROGRAMA EDC-BIOLOGÍA

INFORME FINAL DE LA PRÁCTICA DE EDC
LABORATORIO DE ENTOMOLOGÍA APLICADA Y PARASITOLOGÍA
(LENAP)
Enero 2008 – Enero 2009

Br. Allan Estuardo Urbizo Herrera
Profesor Supervisor: Licda. Eunice Enríquez
Supervisor de la Unidad de Práctica: Licda. Antonieta Rodas

Vo. Bo. Asesora Institucional

Índice

1. Introducción.....	3
2. Cuadro de Resumen de Actividades de EDC.....	4
3. Actividades realizadas durante la práctica de EDC.....	5
4. Actividades de Servicio.....	5
5. Actividades de Docencia.....	7
6. Actividades No Planificadas.....	8
7. Anexos.....	9

Informe final de Investigación

8. Resumen.....	12
9. Introducción.....	13
10. Referente Teórico.....	14
11. Planteamiento del Problema.....	17
12. Justificación	18
13. Objetivos.....	19
14. Hipótesis.....	19
15. Metodología.....	19
16. Resultados.....	24
17. Discusión de Resultados.....	27
18. Conclusiones.....	32
19. Recomendaciones.....	33
20. Referencias Bibliográficas.....	33

1. Introducción

El subprograma de EDC integrado para la carrera de Biología, tiene como objetivos el contribuir a la formación profesional del estudiante. La elaboración de un informe final de la práctica permite presentar las metas cumplidas y limitaciones presentadas durante el desarrollo de la práctica en las tres grandes áreas en que se constituye: servicio, docencia e investigación. Asimismo permite presentar un panorama general de las actividades realizadas, los objetivos alcanzados y, de manera muy importante, el conocimiento adquirido, así como el servicio realizado en el tiempo de la práctica y la información generada en el proceso de la investigación. Por otro lado permite al estudiante y supervisor contrastar lo esperado con lo obtenido. Es así como es posible observar si la ejecución de servicio, docencia e investigación fue acorde a los objetivos y calendarización propuesta. Finalmente proporciona, a otros estudiantes interesados en hacer sus prácticas en la misma Unidad de Investigación, la información sobre esta y las actividades a realizar en ella.

2. Cuadro Resumen de las Actividades de EDC

Programa Universitario	Nombre de la Actividad	Fecha de la Actividad	Horas EDC ejecutadas
Servicio	Limpieza de bioterio	Febrero 2008 - Enero de 2009	20
	Servicio preliminar de Herbario	Enero-Febrero 2008	40
	Organización de colección de especímenes de <i>Triatoma dimidiata</i> .	Febrero-Julio 2008	104
	Apoyo a investigación "Fuentes alimenticias"	Feb-Junio	150
Docencia	Capacitación sobre temas genéticos y moleculares por parte de la Licda. Elizabeth Solórzano	Feb-08	48
	Capacitación sobre el uso Adecuado de equipo utilizado para estudios de biología molecular	Feb-08	15
	Taller sobre "Formulación correcta de propuestas de Investigación" DIGI 2008	Mar-08	5
	Taller sobre "Día Internacional de la Biodiversidad"	22 de Mayo de 2008	5

Programa Universitario	Nombre de la Actividad	Fecha de la Actividad	Horas EDC ejecutadas
Investigación	Corte de Abdomen de <i>T. dimidiata</i> Extracción de ADN Cuantificación de ADN Dilución de ADN Amplificación por medio de la Técnica de PCR Electroforesis de Geles y Fotografiado. Procesamiento y Análisis de datos Elaboración de Protocolo De Investigación Elaboración de Informe Final	Marzo 2008 - Enero 2009-	500

3. Actividades Realizadas durante la Práctica de EDC

3.1 Actividades de Servicio

3.1 Nombre de la Actividad: Limpieza del bioterio.

3.1.1 Objetivo: Contribuir con el mantenimiento de los ratones utilizados para la alimentación de las chinches, así como la limpieza general del bioterio.

3.1.2 Procedimiento: Se realiza por turnos debido al número de personas que participan en el laboratorio, a cada persona se le asigna uno o dos días al mes para su realización. El procedimiento consiste en limpiar, con cloro y jabón, las cajas en las cuales permanecen los ratones, luego se agrega nueva viruta y concentrado a las cajas donde estarán los ratones, se lavan las pajas con jabón y se llenan de agua limpia y se limpia en general el bioterio, sacudiendo y desinfectando.

3.1.3 Resultados: Se mantuvo el cuidado del bioterio durante los meses de servicio en el LENAP

3.1.4 Limitaciones: Ninguna.

3.2 Nombre de la Actividad: Apoyo en la Investigación “Fuente Alimenticia de *Triatoma dimidiata*”

3.2.1 Objetivo: Determinar su la fuente alimenticia de *Triatoma dimidiata* produce una variación en la presencia del parásito *Trypanosoma cruzi*.

3.2.2 Procedimiento: Se identifica la procedencia de la fuente de alimentación de las chinches mediante la técnica de PCR especie-específico. El procedimiento consiste en cortar el abdomen de la chinche para obtener el material digestivo, luego mediante el uso de un Kit de extracción de ADN se extrae el material genético del contenido digestivo de la chinche, seguidamente se cuantifica el ADN mediante el uso de un espectrofotómetro. Con el ADN cuantificado se procede a diluirlo para tenerlo a una concentración óptima (ya que el exceso de ADN puede inhibir el proceso ulterior de PCR). Teniendo el ADN diluido se procede a agregarle los reactivos para el proceso de PCR que son: Taq polimerasa y cebadores específicos de cada especie (7 en total). Luego de tener el ADN amplificado se procede a revelarlo mediante el uso de electroforesis y geles para conocer las fuentes alimenticias de *Triatoma dimidiata*.

3.2.3 Resultados:

- Se optimizaron las temperaturas de unión de los cebadores especie-específico.
- Se consiguieron tejidos de Perro y de ratón para utilizarlos como controles positivos en la investigación.
- Se evaluaron un total de 20 chinches (aproximadamente) con todos los cebadores incluyendo revelado con geles.

3.2.4 Limitaciones: Tiempo, Disponibilidad de material de laboratorio como: Pipetas, Tubos de microcentrífuga esterilizados, Termociclador, etc.

3.3 Nombre de la actividad: Mantenimiento de la colección de Triatominos.

3.3.1 Objetivo: Contribuir en el mantenimiento de la colección de Triatominos, que se encuentra en el Bioterio y que son utilizadas en diversas investigaciones, como referencia o utilizando los especímenes como en las investigaciones genéticas, para intercambios, para que estas estén al alcance de los investigadores y puedan obtener los datos necesarios para diversos proyectos de investigación.

3.3.2 Procedimiento: Se limpian las frascos en lo que se encuentran preservadas las chinches. Se revisa el espécimen para asegurarse que se encuentre en buen estado.

3.3.3 Resultados:

- Se revisaron un total de 2500 frascos de la colección (de la A3500 a la A6000), cambiándoles alcohol, etiquetándolos debidamente y anotando los frascos con chinches en mal estado, extraviados o repetidos.
- Se buscaron y ordenaron los frascos de la A6001 a la A7000, ubicándolos en canastas adecuadas para su fácil localización.

3.3.4 Limitaciones: Ninguna.

4. Actividades de Docencia

4.1 Nombre de la actividad: Capacitación sobre el adecuado uso de equipo utilizado para estudios de Biología Molecular.

4.1.1 Objetivo: Capacitar al estudiante acerca del buen uso y aprovechamiento del equipo para fines de investigación molecular que posee el LENAP.

4.1.2 Procedimiento: Se capacita al estudiante sobre la manera apropiada de la utilización de equipo utilizado para estudios moleculares en el LENAP, por una persona con experiencia, que sepa los mecanismos básicos para la utilización de este equipo.

4.1.3 Resultados: Se capacitó al estudiante sobre el correcto uso de:

- Termociclador para fines de investigación con PCR.
- Campana de extracción, para manejo de las muestras en condiciones asépticas.
- Pipetas, para manejo de volúmenes de uso molecular.
- Espectrofotómetro, para cuantificación del ADN.
- Cámara de electroforesis, para poder revelar los geles.
- Cámara de Luz UV, para revelado de geles.
- Congelador de -80 °C, para guardar material de uso molecular.
- Centrifugadora, para centrifugar muestras de importancia en la investigación.
- Spiner

4.1.4 Limitaciones: Ninguno.

4.1 Nombre de la actividad: Capacitación sobre temas Genéticos y Moleculares, por parte de Elizabeth Solórzano.

4.1.1 Objetivo: Capacitar al estudiante en temas de importancia Genética y Molecular para que se involucre en estas áreas y pueda desenvolverse de una manera ágil en estos temas. Además se espera hacer conciencia en el estudiante para que visualice la importancia de este tema en Guatemala y así pueda formular su tema para la investigación, si así lo considera oportuno.

4.1.2 Procedimiento: Se proporcionan temas científicos al estudiante quién debe hacer una investigación personal para empaparse de los temas para luego aplicar ese conocimiento en el laboratorio.

4.1.3 Resultados: Se capacitó al estudiante en los temas:

- Enfermedad de Chagas: Andrade Z, Andrade S: **Chaga's Disease (American Trypanosomiasis)**. The Williams and Wilkiny Company.
- Teoría de la técnica de PCR
- Estudios sobre las fuentes alimenticias de los vectores de la enfermedad de Chagas: Pizarro J, Stevens L: **Vector movement and feeding revealed by forensic DNA analysis of the blood meal in the Chagas disease vector Triatoma infestans in Chuquisaca, Bolivia.**
- PCR aplicado a la enfermedad de Chagas: Dorn Pl, Engelke D, Rodas A, Rosales R, Melgar S, Brahney B, Flores J, Monroy C: **Utility of the Polymerase Chain Reaction in detection of Tripanosoma cruzi in Guatemalan Chagas vectors.** Am J Trop Med Hyg 1999, 60:740-745.

4.1.4 Limitaciones: Tiempo.

5. Actividades no planificadas

5.1 Nombre de la Actividad: Selección de material de la colección de triatominos para intercambio con investigadores de Colombia.

5.1.1 Objetivo: Seleccionar ejemplares en buen estado para intercambio con Investigadores Colombianos, para investigaciones sobre morfometría de chinches.

5.1.2 Procedimiento: Se realiza una revisión en la base de datos para seleccionar ejemplares que cumplan con los requisitos para poder ser tomados en cuenta para el intercambio. Los ejemplares no deben de estar disectados, no deben de tener ningún tipo de daño producido por hongos u otros agentes degradadores, asimismo deberá estar entero.

5.1.3 Resultados: Se seleccionaron 15 ejemplares de *Triatoma dimidiata* intradomiciliares y 15 peridomiciliares colectadas en el departamento de Jutiapa para el intercambio con investigadores de Colombia.

5.1.4 Limitaciones: Ninguna.

5.2 Nombre de la Actividad: Día internacional de la Biodiversidad

5.2.1 Objetivo: Fomentar la importancia del conocimiento y conservación de la Biodiversidad en Guatemala y el Mundo.

5.2.2 Procedimiento: Se impartieron unas charlas a diferentes colegios con la finalidad de fomentar el interés sobre la Biodiversidad y su conservación.

5.2.3 Resultados: Se impartieron charlas sobre la biodiversidad a estudiantes de 2 colegios distintos.

5.2.4 Limitaciones: Ninguna.

5.3 Nombre de la actividad: Taller sobre la formulación de Proyectos de Investigación (DIGI 2008)

5.2.1 Objetivo: Capacitar a las personas que se desenvuelven en el ámbito de la investigación para que puedan desarrollar propuestas de investigación de una manera adecuada y objetiva.

5.2.2 Procedimiento: Se proporcionan las bases del método científico, y las bases para formular propuestas de investigación. Estas charlas se llevaron a cabo en la Dirección general de Investigación (DIGI) y fue impartida por una experta en el tema.

5.2.3 Resultados: Se capacitó al estudiante en los temas de importancia de metodología científica.

5.2.4 Limitaciones: Tiempo

ANEXOS

Fotos



Trabajando en la Colección de Triatomíneos



Apoyo en la investigación “Variación de las Fuentes alimenticias” financiado por la IDRC de Canadá.



Docencia Impartida en la actividad del “Día Internacional de la Biodiversidad” realizado en el Jardín Botánico.



Universidad de San Carlos de Guatemala
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia
Programa de Experiencias Docentes con la Comunidad
Subprograma de EDC-Biología

INFORME FINAL DE INVESTIGACIÓN
“Efecto de la variación de la fuente alimenticia sobre la positividad a
***Trypanosoma cruzi* en *Triatoma dimidiata* en las aldeas de la Brea y el Tule,**
Quezada, Jutiapa, Guatemala”

Br. Allan Estuardo Urbizo Herrera
Profesor Supervisor: Licda. Eunice Enríquez
Supervisor de la Unidad de Práctica: Licda. Antonieta Rodas

Vo. Bo. Licda. Antonieta Rodas

Resumen de Investigación

Efecto de la variación de la fuente alimenticia sobre la positividad a *Trypanosoma cruzi* en *Triatoma dimidiata* en las aldeas de la Brea y el Tule, Quezada, Jutiapa, Guatemala.

Laboratorio de Entomología Aplicada y Parasitología. Lenap.

Br. Allan Urbizo. urbiology@gmail.com

Asesora de Investigación: Ph.D. Carlota Monroy

La Tripanosomiasis Americana, es una enfermedad parasitaria con gran incidencia en los países de América Latina, la cual es catalogada como la cuarta causa de mortalidad por enfermedades infecciosas en humanos. Es por ello que la prioridad de la salud pública en Latinoamérica ha sido su control debido a su fuerte impacto epidemiológico y social. Dicho control se ha basado en los estudios centrados en la habilidad de los vectores para trasladarse entre hábitats y colonizar los mismos, ya que esta información aporta datos para la comprensión de la relación entre vectores y humanos y así se utiliza para la determinación de las estrategias adecuadas para combatir la enfermedad. Con la presente investigación se pretende identificar las fuentes alimenticias de *Triatoma dimidiata* para determinar patrones de preferencia de los hospederos por parte del vector y la presencia del parásito *Trypanosoma cruzi* para así conocer los reservorios epidemiológicamente significativos en las aldeas estudiadas. Para poder evaluar esto, se puso a prueba a 60 triatominos (30 de cada aldea) y al contenido sanguíneo del abdomen de cada Triatomo se le extajo el ADN. Se evaluó cada muestra utilizando la técnica de la Reacción en cadena de la polimerasa, en la cual se probaron cebadores especie-específico diseñados por Jerylin Walker de la Universidad estatal de Louisiana, que evaluaron seis hospederos del parásito *T. cruzi*: Perro, gallina, ratón, cerdo, tacuazín y humano. Asimismo las muestras fueron evaluadas con el cebador de *T. cruzi* para su posterior comparación. La utilización los cebadores especie-específico, radicó en su capacidad para detectar secuencias específicas del ADN, por lo que a partir de la detección del mismo, se replicaron los fragmentos que diferían en tamaño. Las muestras replicadas se colocaron en una cámara de electroforesis que, mediante las propiedades de tamaño del fragmento replicado, migraron con diferente velocidad, por lo que se pudo conocer a que especie pertenecía ese fragmento. Los resultados obtenidos indicaron que las fuentes alimenticias más frecuentadas fueron: Perro, cerdo y ave con 100, 30 y 42 % respectivamente. También es importante mencionar que el cebador del Orden Rodentia fue el que presentó mayor problema con la especificidad a la secuencia de ADN, por lo que fue excluido del estudio para evitar datos falsos. Además el protocolo de PCR fue modificado en su totalidad para el cebador de tacuazín, pero debido a la cantidad de experimentos para lograrlo, no fue posible evaluar los triatominos estipulados. Con respecto a la positividad a *T. cruzi*, ésta fue causada en un 100% por el hospedero perro, esto debido a su gran participación en las actividades humanas. Es importante que estos estudios continúen evaluando un mayor número de muestras y evaluando un mayor número de hospederos que aportarían datos importantes para el desarrollo de metodologías de erradicación del vector para eliminar la enfermedad en humanos.

1. INTRODUCCIÓN

Una de las enfermedades parasitarias más importantes a nivel Latinoamericano es la Tripanosomiasis americana o enfermedad de Chagas. Fue nombrada en reconocimiento al médico e infectólogo brasileño Carlos Chagas, quien en 1909 la describió por primera vez. Esta enfermedad es la cuarta causa de mortalidad por enfermedades infecciosas en América Latina, provoca un estimado de 43,000 muertes por año (Ayau, 1998).

La enfermedad se transmite por medio de insectos hematófagos pertenecientes a la subfamilia Triatominae, especialmente por los géneros *Rhodnius* y *Triatoma*, ya que éstos al alimentarse de la sangre de su hospedero, liberan heces infectadas con el parásito *Trypanosoma cruzi* sobre la piel del mismo, luego estas son introducidas por el mismo hospedero al rascarse por la molestia de la picadura del vector. Éste padecimiento está relacionado a las áreas rurales y a la pobreza socioeconómica de los países latinoamericanos, debido a que las casas en estas áreas paupérrimas proporcionan el ambiente favorable para que el vector habite entre las grietas, hojas de palmeras y las piedras que las conforman (Landaverde, 2004).

En Guatemala se han realizado muchos trabajos encaminados al conocimiento de esta enfermedad especialmente por parte del Laboratorio de Entomología Aplicada y Parasitología (LENAP), los cuales han sido pauta para el desarrollo de metodologías de control y erradicación del vector. Sin embargo, el conocimiento sobre la preferencia de la fuente alimenticia del vector es un aspecto que hasta la fecha no se ha trabajado en Guatemala, aunque en otros países como Bolivia se han efectuado estudios de esta índole que han revelado patrones de preferencia importantes para el conocimiento del comportamiento del vector (Pizarro *et al.*, 2008). Con el presente estudio se pretendió recolectar información básica sobre los patrones de preferencia en cuanto a fuente alimenticia de *Triatoma dimidiata* y su relación con el positivismo del *T. cruzi*. Para esto se analizó la sangre del tracto digestivo de las chinches y se hizo un análisis con la técnica de PCR especie específico. Además se efectuó una identificación de *T. cruzi* mediante la misma técnica.

2. REFERENTE TEORICO.

3.1 Subfamilia Triatominae

Los Triatominos son una subfamilia de insectos perteneciente a la Familia Reduviidae del Orden Hemiptera e incluye aproximadamente 130 especies hematófagas. El género con mayor número de especies es *Triatoma* con un total de 70 especies. La mayoría están distribuidas a lo largo de América, con pocas especies distribuidas en África, Asia y Oceanía. Por su fisiología y comportamiento similar, todas estas especies tienen la capacidad de ser portadoras del protozoo *Trypanosoma cruzi*, por lo que son vectores potenciales de la enfermedad de Chagas en humanos (Lent & Wygodzinsky, 1979). Estos insectos encuentran un ambiente favorable en las grietas de las paredes de adobe en sectores pobres del área rural, de donde salen para alimentarse de los ocupantes en reposo, principalmente durante la noche.

Una de sus características principales es su aparato bucal especializado, que consiste en un labio segmentado en forma de canoa, que en los fitófagos es largo, mientras que en los hematófagos no alcanza el primer par de coxas, es decir, que no alcanza el primer segmento del primer par de patas de la chinche. Las mandíbulas ayudan a perforar la epidermis y los maxilares penetran en busca de un vaso capilar. El rostro de los depredadores se diferencia de los hematófagos ya que en los primeros es curvo, mientras que en los últimos es recto (Brusca & Brusca, 2003).

En las ninfas, las características del tórax dorsal permiten reconocer cualquiera de los cinco estadios y el aspecto de los últimos segmentos abdominales de 5to estadio permite determinar el futuro sexo del adulto (Zeledón, 1981).

3.2 Triatoma dimidiata

3.2.1 Clasificación

Reino: Animalia
Phyllum: Artropoda
Clase: Insecta
Orden: Hemiptera
Familia: Reduviidae
Sub Familia: Triatominae
Género: *Triatoma*
Especie: *T. dimidiata*

3.2.2 Biología

T. dimidiata es una especie variable, en cuanto a su talla, mide aproximadamente de 24.2 a 32 mm, el macho, y de 24.5 a 35mm la hembra. Es de color oscuro y el corion varía de un amarillo pálido a anaranjado o rojo, con una pilosidad corta y poco notoria. Es un organismo ovíparo, la oviposición comienza de 10 a 30 días después de la cópula, y puede continuar por varios meses (Landaverde, 2004). La totalidad de huevos puestos durante el ciclo de vida de la hembra varía de 500 hasta más de 1000 y las hembras vírgenes pueden oviponer pero sus huevos son infértiles.

La ingesta de sangre en promedio, aumenta con los estadios en un rango que va, desde 4.5mg en el primer estadio a 421.3mg en el quinto estadio, por lo que el tiempo que demora alimentándose está relacionado con el tamaño del insecto. Las hembras se alimentan más fácilmente y son más voraces que los machos. Asimismo la víctima puede no sentir dolor, ya que la saliva de la chinche posee un anestésico y después de alimentarse pueden pasar varios meses sin alimentarse reduciendo únicamente sus actividades durante las épocas frías del año (Lent & Wygodzinsky, 1979).

3.3 Distribución Geográfica

3.3.1 Guatemala

T. dimidiata presenta una amplia distribución en el territorio por lo que se le considera el vector más importante. Ha sido reportado en 21 de los 22 departamentos del país, y es clara su alta prevalencia en los departamentos de Chiquimula, Jutiapa, Jalapa, Santa Rosa y Zacapa. El departamento con mayor infestación, en el año 2000, era Jutiapa y era el segundo con mayor riesgo de infección por *T. cruzi* (Tabaru, 1999). Se ha trabajado con rociamiento selectivo, educación, promoción para mejoramiento de viviendas y vigilancia entomológica con participación de la comunidad (OPS, 2002).

3.4 Técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

En Abril de 1983, Karry Mullis dio a conocer la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (**P**olimerase **C**hain **R**eaction) que es una técnica para la síntesis in vitro de secuencias específicas de ADN con la cual la insuficiente cantidad de ADN ya no es un problema en los procedimientos de Biología Molecular ni en los procedimientos de diagnóstico basados en el estudio de ADN (Prescott, 1999). El desarrollo de esta aplicación ha abierto nuevas alternativas a los métodos de investigación en muchos campos científicos, lo que ha brindado una herramienta altamente sensible y específica para la distinción de grupos de animales.

El PCR permite un acceso directo y simple al genoma, hasta proveer una sensibilidad excepcional para la observación de características genotípicas y biomédicas en el diagnóstico de enfermedades (Black & DuTeau, 1997).

Esta técnica se fundamenta en la propiedad natural de las ADN polimerasas para replicar una hebra simple de ADN, para lo cual emplea ciclos de altas y bajas temperaturas alternadas, además de estar provista de un cebador o primer. Como las temperaturas fluctúan de una manera muy drástica, las polimerasas eran desnaturalizadas junto con el ADN, por lo que de debían agregar nuevas en cada ciclo. Hoy por hoy se utilizan polimerasas resistentes a altas temperaturas, específicamente a temperaturas de desnaturalización del ADN (95°C). Estas enzimas se obtienen a partir de bacterias termófilas, es decir, bacterias que están adaptadas a vivir en ambientes de temperaturas muy altas, y una de las más utilizadas es la bacteria *Thermus aquaticus* por lo cual la polimerasa es llamada *Taq* polimerasa.

Los primers que se utilizan consisten en segmentos de 20 pares de bases (pb), que corresponden a una fracción de ADN, para microsatélites o variantes de PCR específicas. Su función es la de iniciar la síntesis del fragmento de ADN deseado y esto se logra debido a que los primers poseen secuencias complementarias a la secuencia de ADN. Por razón de la repetición de los ciclos de la síntesis, se puede generar un número desmedido de copias de una secuencia específica de ADN.

Partiendo de estos principios, la Reacción en Cadena de la Polimerasa se basa en la repetición de un ciclo formado por tres etapas fundamentales:

1. Desnaturalización del ADN doble cadena por el calentamiento del mismo a 95°C.
2. Unión de los primers a las hebras simples de ADN, por enfriamiento entre el rango de 37°-50°C.
3. Extensión del cebador por actuación de la *Taq* polimerasa en donde se da la síntesis de ADN. Esto ocurre a 72°C.

Al finalizar los ciclos, la temperatura baja a -4°C para impedir que el ADN sufra el efecto de algunas enzimas que lo desnaturalicen o alteren.

Esta técnica se ha empezado a utilizar como herramienta para la identificación de especies en la sangre ingerida por los insectos hematófagos. Esto se logra haciendo una variación en los primers utilizados en los ciclos, ya que estos son mucho más específicos, ya que son diseñados especialmente para cada especie, a esta variante de la técnica se le llama, PCR especie-específico.

3.5 Trabajos realizados con la Técnica de PCR

En el Laboratorio de Entomología Aplicada y Parasitología (LENAP) se han realizado diversos estudios tanto en el área de Biología Molecular como Genética. Se ha utilizado la Técnica de PCR para la identificación del parásito *T. cruzi* en los vectores de la enfermedad de Chagas. En estos trabajos se ha logrado determinar que esta técnica es mucho más sensible (57.6%) que la técnica de microscopía (22.7%) para la detección de *T. cruzi* en *Rhodnius prolixus* (Dorn *et al.*, 1999). Asimismo estos estudios han sido llevados a cabo en Bolivia, en donde la Técnica de PCR también mostró una mayor sensibilidad que la técnica de microscopía (81.16% sobre 56.52%) en la detección de *T. cruzi* sobre *Triatoma infestans* (Pizarro *et al.*, 2007).

Uno de los trabajos destacados con PCR especie-específico fue el realizado en Bolivia, conjuntamente con la universidad de Vermont, en el cual se deseaba identificar a *Cavia porcellus* (Conejillo de Indias) en la sangre ingerida por *T. infestans*. Se demostró que mediante esta técnica se podría amplificar el ADN extraído incluso 40 horas después de ingerida la sangre, en los tejidos del abdomen del triatomino. El estudio también confirmó que el procedimiento puede detectar la fuente alimenticia de la sangre por lo menos 2 meses después de ingerida por éstos, lo que da pautas del movimiento que tienen estos insectos en sus hábitos alimenticios (Pizarro *et al.*, 2007). Conjuntamente existen otros estudios como los elaborados para la diferenciación de más especies en los tejidos del abdomen del vector, que utilizaron la misma técnica y que han permitido establecer indicios sobre el movimiento del insecto en función de la fuente alimenticia, ubicación (intra y peridomicilio), estadio y ubicación geográfica (Pizarro *et al.*, 2008).

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

La enfermedad de Chagas es una condición clínica seria con múltiples manifestaciones y constituye una de los problemas más importantes de salud pública en varios países de Centro y Sur América. Esta enfermedad es transmitida por los insectos de los géneros *Triatoma* y *Rhodnius* al depositar sus deyecciones infectadas con *T. cruzi* (Chagas 1909) sobre mucosas y áreas sensibles y expuestas de la piel (Lent & Wygodzinsky, 1979).

Puede ocurrir como una aguda, febril, infección generalizada o, más a menudo, como un proceso crónico que conduce a un fallo cardíaco o una dilatación segmental del tubo digestivo, especialmente el megaesofago y el megacolon. (Andrade, 1971)

Esta enfermedad es un problema importante de salud pública en la región, comprendida desde el istmo de Tehuantepec en México, hasta Colombia y Ecuador en América del Sur, debido a las condiciones de pobreza y desconocimiento de la enfermedad. El principal vector de la enfermedad en la región centroamericana es *T. dimidiata* (Latreille, 1811), especialmente en los países de El Salvador, Guatemala, Honduras y Nicaragua donde el vector está ampliamente distribuido (Landaverde, 2004).

El control del vector ha sido un tema de especial importancia para los biólogos, pero éste ha presentado algunas dificultades ya que se han encontrado de nuevo varios meses después del rociamiento con piretroides de efecto residual, lo que hace que su incidencia permanezca alta y por ende, los niveles de infección en seres humanos. Asimismo la interrupción de la transmisión es complicada debido a que el parásito causal, *T. cruzi*, tiene muchos hospederos mamíferos. Aunque los vectores se alimentan de una variedad de hospederos vertebrados, entre ellos mamíferos y aves, solo los mamíferos mantienen la infección (Pizarro *et al.*, 2007).

Igualmente, el positivismo de *T. cruzi* entre los hospederos varía entre las regiones geográficas, siendo influenciada por las poblaciones locales de vertebrados domésticos, peridomésticos, como también poblaciones silvestres de vertebrados hospederos. Es por ello que en la estrategia de control debe de considerarse los factores de la variación alimenticia por poder

erradicar los vectores. Para ello se debe hacer una correlación parásito-hospedero-vector, y así entender la dinámica que gobierna el contacto entre humanos y vectores.

4. JUSTIFICACIÓN.

La enfermedad de Chagas es uno de los problemas de salud más importantes en América Latina. Hoy por hoy las estimaciones indican que 13 millones de personas están infectadas con el agente causal, con 3.0 a 3.3 millones de casos sintomáticos y una incidencia anual de 200,000 casos en 15 países (Morel *et al.*, 2003). Este padecimiento se encuentra reciamente correlacionado con factores socioeconómicos de subdesarrollo y pobreza, que predominan en las áreas afectadas.

No existe una vacuna contra el *T. cruzi* y el tratamiento con medicación no es exitoso en todos los casos. En Centroamérica, la prevalencia de infección para Nicaragua, Honduras, El Salvador y Guatemala es del 7% (aproximadamente dos millones de personas infectadas). Únicamente en Guatemala se estima que existen setecientos treinta mil (730,000) personas infectadas (5.61% de la población) y cuatro millones de personas (30.76%) en riesgo a contraer la enfermedad (Nakagawa *et al.*, 2003).

La prioridad de la salud pública en Latinoamérica ha sido el control de la enfermedad debido a su fuerte impacto epidemiológico y social. Es por ello que actualmente existen distintos métodos para el control de la enfermedad que incluyen: 1. Control de los bancos de sangre. 2.- Eliminación de poblaciones de vectores domésticos por medio del mejoramiento de la infraestructura de los domicilios y 3.- Rociamiento de casas infestadas con insecticidas de efecto residual (Schofield *et al.*, 1999).

Se ha observado que después del rociamiento en los domicilios existe un cierto porcentaje de vectores que re infestan los domicilios tratados (Nakagawa *et al.*, 2003). Esto puede atribuirse en parte: 1.- A la falta de efectividad de los métodos de control o 2.- A la presencia de poblaciones silvestres de *T. dimidiata*, ya que se sabe que este vector no es estrictamente domiciliar (Monroy *et al.*, 2003).

Por lo tanto, los estudios centrados en la habilidad de los vectores para trasladarse entre hábitats y colonizar los mismos son elementos importantes del control de la enfermedad, ya que servirán para comprender el comportamiento entre vectores y humanos (Bossemo *et al.*, 2006) y determinar de esta manera la estrategia adecuada para la aplicación de insecticidas.

Es por ello que con el presente estudio se pretende identificar la fuente de la sangre en el tracto digestivo de *T. dimidiata* para proveer datos de patrones sobre la preferencia de hospederos por parte del vector, lo que aportaría información valiosa acerca de reservorios de la enfermedad epidemiológicamente significativos y contribuir al desarrollo de metodologías de prevención más específicas para la erradicación de la enfermedad.

5. OBJETIVOS.

5.1 General

- 5.1.1 Determinar si la fuente alimenticia de *Triatoma dimidiata* produce una variación en la presencia del parásito *Trypanosoma cruzi*.

5.2 Específicos

- 5.2.1 Identificar las fuentes alimenticias de *Triatoma dimidiata* mediante la técnica de PCR Especie-Específico.
- 5.2.2 Identificar la positividad de *Trypanosoma cruzi* en *Triatoma dimidiata* mediante la técnica de PCR Especie-Específico

6 HIPÓTESIS.

- La variación de la fuente alimenticia de *Triatoma dimidiata* afecta el positivismo del parásito *Trypanosoma cruzi*.

7 METODOLOGÍA

7.1 Diseño

7.1.1 Población

- Ejemplares de *T. dimidiata* presentes en las Aldeas de La Brea y El Tule, Municipio de Quezada, Departamento de Jutiapa, Guatemala.

7.1.2 Muestra

- 30 especímenes de *T. dimidiata* pertenecientes a la Aldea de La Brea, Municipio de Quezada, Departamento de Jutiapa, Guatemala.
- 30 especímenes de *T. dimidiata* pertenecientes a la Aldea de La Brea, Municipio de Quezada, Departamento de Jutiapa, Guatemala.

7.2 Técnicas a utilizar en el proceso de Investigación

Análisis de Datos

Se efectuará un análisis descriptivo.

Material Biológico

El material biológico, fue colectado en los meses de Enero y Febrero de 2008 por el personal del Laboratorio de Entomología Aplicada y Parasitología (LENAP).

Jutiapa, La Brea, Enero-Febrero 2008	(30 individuos)
Jutiapa, El Tule, Enero-Febrero 2008	(30 individuos)

Los ejemplares previamente colectados fueron introducidos a una base de datos, de la colección de referencia. Esta base de datos se encuentra clasificada según el país, y la especie del insecto triatomín.

7.2.2 **Procesamiento de muestras**

Se principió con el corte del abdomen del triatomino en donde se encuentra la sangre ingerida. Al abdomen se le agregó un buffer de lisis de tejidos, que actúa sobre las membranas de las células causando lisis en las mismas para poder liberar el ADN encerrado en el núcleo (especialmente el que se encuentra en los linfocitos de la sangre de cada animal ingerida por el triatomino). Seguidamente se capturó el ADN en el medio mediante una columna de afinidad que lo atrapó al momento de pasar por ella. Posteriormente se hicieron dos lavados de la columna para eliminar impurezas con buffers de lavado. Finalmente el ADN fue lavado de la columna obteniendo 200 µl de ADN en suspensión de buffer.

El ADN se cuantificó mediante la ayuda de un espectofotómetro, que proporcionó datos sobre la concentración del ADN en ng/µl. Seguidamente el ADN cuantificado se sometió a un proceso de dilución ya que un exceso del mismo puede provocar una inhibición en la técnica de PCR, por lo que fue diluido con H₂O de uso molecular hasta una concentración de 20/30 ng/µl.

Posteriormente se realizó la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en la que se hizo una mezcla maestra en cada tubo de PCR que incluyó: 0.5 µl de ADN, 0.5 µl del cebador forward, 0.5 µl del cebador reverse, 6 µl de la Red Taq (la que incluye la ADN polimerasa responsable de replicar el ADN) y 4.5 µl de H₂O. Debido a que se evaluaron un total de siete cebadores se agregaron por separado a la mezcla maestra (es decir que no se agregaron los 7 en un solo tubo sino que cada uno en su tubo correspondiente para evitar inhibiciones en el PCR y errores de lectura en geles). Los cebadores fueron diseñados para detectar secuencias específicas del ADN, por lo que si encontraban en el ADN la secuencia complementaria, se unirán y replicarán ese fragmento de nucleótidos. Cada cebador replicó un fragmento de ADN de diferente tamaño, por lo que al momento de revelarlo en gel su posición varió de distancia que fue medida mediante una escalera molecular que indicó las distancias relativas de las bandas.

Esto fue posible de revelarse debido a que se utilizó el Bromuro de Etidio (que fue agregado al gel) que se unió al ADN e hizo posible su visualización con luz ultravioleta.

De esta manera es como se supo cuáles fueron las fuentes alimenticias de *T. dimidiata*, incluyendo su positividad a *T. cruzi*.

7.2.3 Extracción de ADN

7.2.3.1 Parte 1

- Remover el abdomen de la chinche
- Agregar 180 μ l ATL tissue lysis buffer
- Moler uniformemente
- Agregar 20 μ l de Proteinase K
- Vortex
- Girar
- Dejar en baño de maría a 56 °C por 2 a 4 días.

7.2.3.1 Parte 2

- Agregar 2 μ l De Ribonucleasa A
- Vortex
- Spin
- Poner en baño maría a 37 °C por 15 minutos
- Agregar 200 μ l de Buffer AL
- Vortex
- Transferir (con una pipeta de 1000 μ l) de supernadante a un tubo de columna (mantener el tubo anterior para descartar después)
- Centrifugar a 8500 rpm por 1 min
- Descartar tubo, poner la columna en un tubo nuevo
- Agregar 500 μ l a W1 buffer
- Dejar reposar durante 5 min
- Centrifugar a 8500 rpm durante 1 min
- Descartar el tubo, poner la columna en un tubo nuevo
- Agregar 500 μ l AW2 buffer
- Dejar reposar durante 5 minutos
- Centrifugar a máxima velocidad durante 1 min
- Descartar el líquido y conservar el tubo
- Centrifugar a velocidad máxima durante 3 min
- Transferir la columna a un tubo eppendorf etiquetado de 1.5ml
- Agregar 200 μ l AE elution Buffer
- Dejar reposar durante 10 min
- Centrifugar a velocidad máxima durante 1 min
- Mantener el tubo eppendorf, descartar la columna

- Colocar los tubos en la centrifugadora Bill's vacuum a 45°C durante 60 min con las tapaderas abiertas.
- Nanodrop.

7.3 Amplificación por medio de PCR.

No.	Ejemplar	Desnaturalización	Unión/Síntesis		Extención	Hold
1	Perro	1 min a 95°C	30 ciclos	30seg a 95°C 30seg a 60°C 30seg a 72°C	5min a 72°C	4°C
2	Gallina	1 min a 95°C	30 ciclos	30seg a 95°C 30seg a 60°C 30seg a 72°C	5min a 72°C	4°C
3	Cerdo	1 min a 95°C	30 ciclos	30seg a 95°C 1 min a 63°C 30seg a 63°C	5min a 72°C	4°C
4	Ratón	1 min a 95°C	30 ciclos	30seg a 95°C 1 min a 55°C 30seg a 72°C	5min a 72°C	4°C
5	Rata	1 min a 95°C	30 ciclos	30seg a 95°C 1 min a 55°C 30seg a 72°C	5min a 72°C	4°C
6	Tacuazín	2 min a 94°C	35 ciclos	15seg a 94°C 15 seg a 55°C 1min 15 seg a 72°C	5min a 72°C	4°C
7	Humano	12 min a 95°C	40 ciclos	15 seg a 95°C 1 min a 61°C	5min a 72°C	4°C
8	T. cruzi	10 min a 94°C	30 ciclos	20 seg a 94°C 10 seg a 57°C 30 seg a 72°C 7 min a 72°C	5min a 72°C	4°C

7.4 Primers Utilizados.

Nombre común	Especie	Sequence 5' to 3'
Human Yd6-F Human Yd6-R	<i>Homo sapiens</i>	GAG ATC GAG ACC ACG GTG AAA TTT GAG ACG GAG TCT CGT T
Canine-F Canine-R	<i>Canis lupus familiaris</i>	AGG GCG CGA TCC TGG AGA C AGA CAC AGG CAG AGG GAG AA
Mouse-F Mouse-R	<i>Mus musculus</i>	AGA TGG CTC AGT GGG TAA AGG GTG GAG GTC AGA GGA CAA ACT T
Rat-F Rat-R	<i>Mus musculus</i>	CAA GAC GGA TGA TCA AAA TGT G ATT GGG TGG CTG TAT ATG TAT GG
Chicken-F Chicken-R	<i>Gallus gallus</i>	CTG GGT TGA AAA GGA CCA CAG T GTG ACG CACTGA ACA GGT TG
Pork-F Pork-R	<i>Sus scrofa</i>	GAC TAG GAA CCA TGA GGT TGC G AGC CTA CAC CAC AGC CAC AG
Walker Opossum-F Walker Opossum-R		TCC CCA ATT GAC ATG TCC CCA TGC TGC CAT ATT GGC CAG TCT
Teruzi-F Teruzi-R	<i>Trypanosoma cruzi</i>	CGA GCT CTT GCC CAC ACG GGT GCT CCT CCA AGC AGC GGA TAG TTC AGG

7.5 Montaje y Corrimiento de Geles

7.5.1 Preparación de los geles

- Se mezclan 1.5 g de agarosa y 150 ml de TBE (2% de agarosa)
- Se calienta hasta que la agarosa se disuelva.
- Se enfría más o menos a 60°C y se agregan 2 gotas de Bromuro de Etidio a una concentración de 10mg/ml para colorear las bandas.
- Se mezcla y se vierte en el molde.

7.5.2 Montaje de los geles por electroforesis

- Se colocan 9µl de muestra de ADN amplificado en cada pozo.
- Se corre el gel en la cámara de electroforesis, a 105 voltios por 90 minutos.

7.5.3 Lectura y Fotografía de Geles

- Se leen las bandas de ADN de los geles en un transiluminador a una longitud de onda de luz UV 256 nm.
- Se toma una fotografía digital.

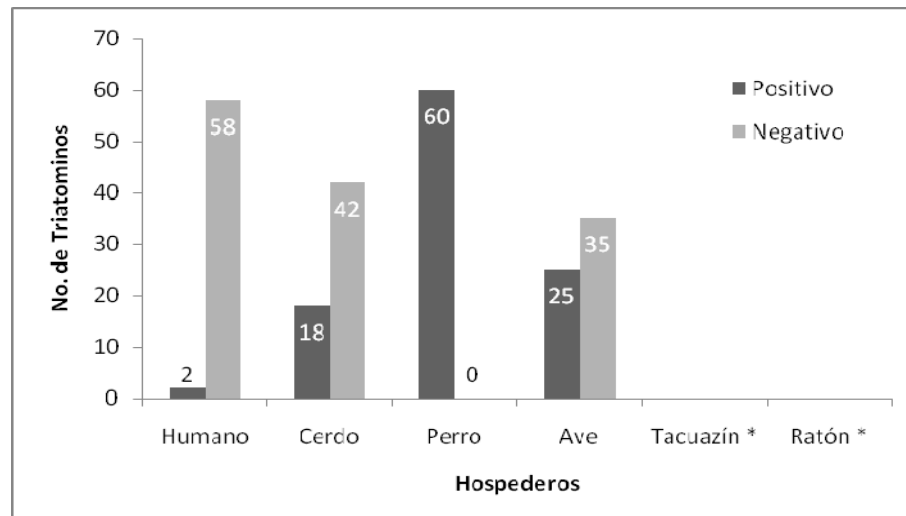
8 RESULTADOS.

Cuadro 1: Fuentes Alimenticias de *T. dimidiata* detectadas mediante la técnica PCR especie-específico.

Hospedero		PCR				
N.Común	N. Científico	Positivo	%	Negativo	%	Total
Humano	<i>Homo sapiens</i>	2	3.3	58	96.7	60
Cerdo	<i>Sus scrofa</i>	18	30	42	70	60
Perro	<i>Canis familiaris</i>	60	100	0	0	60
Ave	<i>Gallus gallus</i>	25	42	35	58	60
Ratón ¹	<i>Mus musculus</i>					
Tacuazín ¹	<i>Didelphis virginiana</i>					

¹ Cebador con problemas de especificidad

Fuente: Datos experimentales.



Fuente: Datos experimentales.

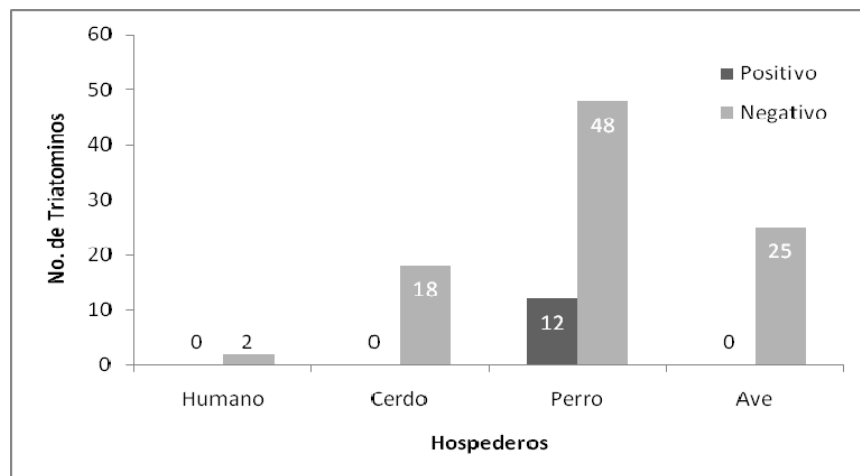
* Cebador con problemas de especificidad.

Figura 1: Fuentes Alimenticias de *T. dimidiata* detectadas mediante la técnica PCR especie-específico.

Cuadro 2: Variación de la positividad a *T. cruzi* según fuentes alimenticias detectadas en *T. dimidiata*.

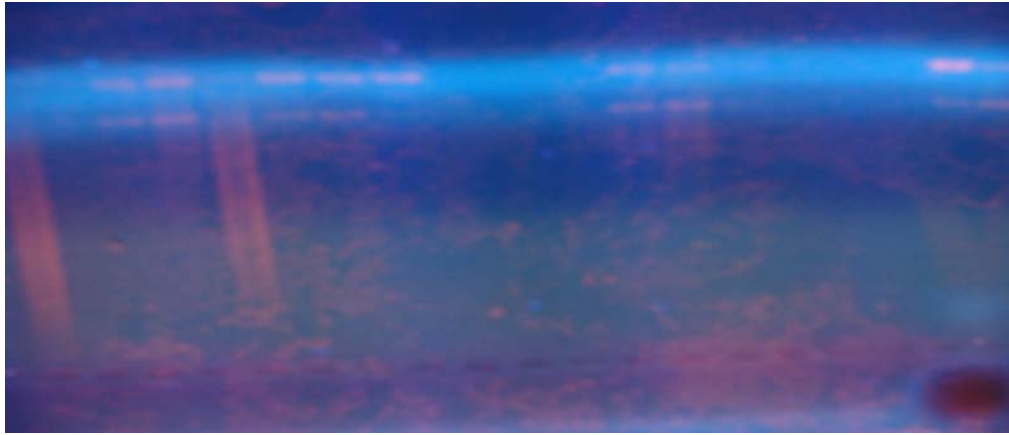
Hospedero	N	<i>T. cruzi</i>			
		Positivo	%	Negativo	%
Humano	2	0	0	2	100
Cerdo	18	0	0	18	100
Perro	60	12	20	48	80
Ave	18	0	0	18	100
Total de Insectos Analizados	60	---		---	

Fuente: Datos experimentales.



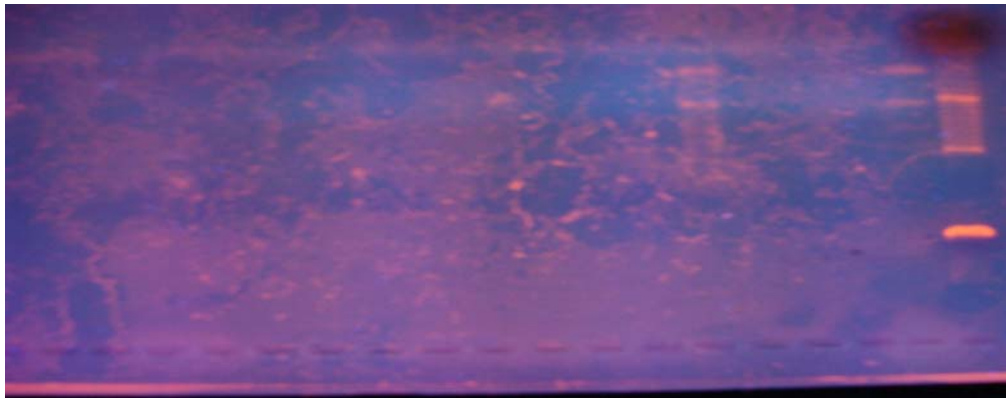
Fuente: Datos experimentales.

Figura 2: Variación de la positividad a *T. cruzi* según fuentes alimenticias detectadas en *T. dimidiata*.



tales.

Figura 3: ADN amplificado por el cebador de *Mus musculus*.



Fuente: Datos experimentales.

Figura 4: ADN amplificado por el cebador de *Mus musculus* producto de un segundo PCR.



Fuente: Datos experimentales.

Figura 5: ADN amplificado por el cebador de *Didelphis virginiana* para 10 muestras al azar de triatominos.

9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

9.1 Fuentes Alimenticias

En el Cuadro 1 y Figura 1, se observa que *Canis lupus familiaris* (Perro) fue el hospedero más detectado (100%), seguido por el ave *Gallus gallus* (42%) y *Sus scrofa* (cerdo) con 30%. *Homo sapiens sapiens* (Humano) fue el hospedero menos detectado (3.33%). Los cebadores de *Didelphis virginiana* (Tacuazín) y *Mus musculus* (Ratón) presentaron problemas de especificidad a la secuencia de ADN, por lo que fueron sometidos a experimentos para optimizar su especificidad, que evaluaron diferentes aspectos moleculares en torno a la Reacción en Cadena de la Polimerasa, como la temperatura de unión y concentración óptima del cebador, concentración del ADN detectable, amplificación de secuencias no deseadas, entre otros. Debido a la falta de tiempo para realizar la totalidad de los experimentos moleculares y optimizar los dos cebadores, se decidió no incluirlos en el estudio, ya que su utilización en las pruebas hubiera aportado datos falsos o comprometido la veracidad de los mismos.

Un factor interesante a discutir, es el resultado para el cebador de *Canis familiaris* que evidencia que el perro es el hospedero más frecuentado de todos los triatominos evaluados. Esto sugiere que el perro está muy asociado a los hábitats humanos, ya que al ser utilizados como complemento de sus actividades diarias (como la cacería, guardián, mascota, etc.) viven e interactúan con los humanos. Como son frecuentados para más de una actividad, es común que entre las familias exista dos o más de estos animales, por lo que los convierte en fuentes alimenticias abundantes y disponibles para los triatominos que viven en las casas. Esto no es un fenómeno nuevo, ya que estudios realizados en diferentes países, como Argentina y México, demuestran que el perro es una fuente alimenticia con alta incidencia entre los triatominos (Brenièr, *et al.*, 2004; Gürtler, *et al.*, 1997; Wisnivesky-Colli, 1987), por lo que los resultados

del cebador son lógicos y concuerdan con las condiciones que prevalecen en las aldeas evaluadas.

El cebador de ave fue el segundo en incidencia entre los triatominos (42%) y debido a las condiciones de vivienda en estas aldeas, es un dato que era de esperarse debido a que es común mantener gallineros en ellas. A diferencia de los demás hospederos, en las aves no se replica el parásito *T. cruzi* (Zeledón & Ravinovich, 1981), por lo que éstas funcionan únicamente como fuentes de sostenibilidad a poblaciones de triatominos dentro y fuera de las casas debido, no solo a la abundancia, sino también a su distribución y repartición dentro de las mismas. Esta condición tiene una implicación seria, ya que al sostener poblaciones de triatominos, fomentan su sobrevivencia y estancia dentro de las viviendas, lo que se traduce en vectores capaces de alimentarse de cualquier hospedero accesible, incluyendo al ser humano. Estudios anteriores realizados con anticuerpos evidencian a las aves como uno de los hospederos más frecuentados (Gürtler, *et al.*, 1998), por lo que en Guatemala se han formulado propuestas para mejorar la distribución de gallineros en las viviendas (Monroy, *et al.*, 2008), para disminuir la influencia de estos hospederos sobre los vectores.

El tercer patrón de alimentación lo presentó *Sus scrofa* (cerdo) con un 30% de incidencia. Este hospedero es parte de las condiciones de vivienda de estas aldeas también, ya que se mantienen corrales con cerdos (o incluso cerdos sueltos), por lo que los resultados de este hospedero concuerdan con las condiciones en las aldeas. Este dato sugiere que éste es un hospedero abundante y accesible como fuente de alimento, por lo que se debe de tener en cuenta en las mejoras de distribución de vivienda. Como un dato interesante, el cebador de este hospedero no presentó problema alguno en términos de especificidad a la secuencia de ADN, ya que desde el principio del estudio se comportó bajo los patrones de diseño esperados (Walker, *et al.*, 2004), como por ejemplo: El óptimo reconocimiento de secuencias, temperatura de unión adecuada, etc., por lo que no hubo necesidad de modificar su protocolo de PCR para Guatemala.

Finalmente el hospedero menos detectado fue humano (3.33%), sugiriendo que existen hospederos mucho más abundantes y accesibles que éstos (como gallinas o perros) y por esa misma condición de accesibilidad son preferidos en vez de los humanos. Se sabe que la variedad de hospederos en triatominos podría deberse a la carencia de agresividad en cuanto a la selección del alimento, por lo que si un hospedero es difícil de conseguir, buscan uno que sea de fácil acceso (Diotaiuti, *et al.*, 1987; Gonçalves, *et al.*, 1988). Bajo este supuesto, se puede afirmar que el humano, por su escasa accesibilidad (en relación a los demás hospederos), es poco frecuentado por los triatominos. Este es un dato ambiguo, ya que indica que el humano no es una fuente alimenticia principal, aunque a pesar de esta poca preferencia, la enfermedad de Chagas sigue siendo una enfermedad con alta incidencia de personas en este país (Nakagawa, *et al.*, 2003).

Ahora bien, los problemas en cuanto a los cebadores de *M. musculus* y *D. virginiana*, se debieron a que éstos fueron diseñados y probados en EE.UU. por Jerilyn Walker (Walker, *et al.*, 2004), por lo que al momento de ser utilizados en Guatemala bajo los protocolos originales (Pág. 12) presentaron resultados fuera de los parámetros esperados, verbigracia: Deficiencias en la detección del ADN control, amplificación de secuencias ajenas, problemas con la temperatura de unión de los cebadores, entre otros. Estos resultados nos dieron indicios de que los protocolos de estos dos cebadores deberían de ser modificados para poder ser utilizados en Guatemala.

Es posible que las variaciones en los protocolos de los cebadores se debieran a factores ambientales como la temperatura y humedad (ya que son distintos en EE.UU. que en Guatemala) y factores intrínsecos a los instrumentos del laboratorio, como los termocicladores utilizados para la técnica de PCR, ya que cada aparato funciona de una manera única. El termociclador utilizado por Jerilyn Walker fue un iQ real-time Bio-rad i-cycler, mientras que nosotros utilizamos tres termocicladores de casas distintas: Applied Biosystems, PerkinElmer y Bio-Rad. Se sabe que los termocicladores varían en cuanto a la realización de las fluctuaciones de temperatura, ya que un termociclador nuevo tarda menos en realizar estas fluctuaciones, mientras que uno ya usado va perdiendo esta capacidad. Esta variación en el tiempo de realización de fluctuaciones pudo haber afectado las reacciones del PCR, ya que como se trabaja a nivel molecular, existe mucha sensibilidad y cualquier tipo de variación es significativa sobre los resultados que se obtienen.

Específicamente, en el caso del cebador *M. musculus*, uno de los problemas presentados fue que las bandas reveladas en la cámara de luz UV fueron tenues (Ver Figura 3), y se degradaban antes de poder hacer una lectura correcta del gel (esto en cuestión de menos de 30 seg.). Este resultado sugería que la cantidad de ADN amplificado en el PCR no era el suficiente para poder formar una banda visible. Esto nos hizo establecer dos hipótesis:

1. La temperatura de unión original de este cebador era muy alta (y por lo tanto muy específica) y que por esa razón el cebador no se estaba uniendo al ADN para poder amplificar las secuencias deseadas.
2. La cantidad de ADN de ratón, en relación a otras secuencias de ADN en el medio contenidas en la mezcla del abdomen del triatomino, era muy baja para que el cebador pudiera amplificar la cantidad suficiente para poder ser revelado en la cámara de luz UV.

La primera hipótesis fue puesta a prueba con una serie de experimentos en los que se varió la temperatura de unión para determinar la temperatura a la cual hubiera mayor cantidad de ADN amplificado. Después de varios experimentos variando la temperatura de unión, se llegó a la conclusión de que la temperatura óptima era de 50°C (una variación de -5°C con respecto a la temperatura original) que produjo bandas claras al poner a prueba con el ADN control. Al tener establecida la temperatura correcta de unión del cebador se evaluaron 10 triatominos al azar. Luego de visualizar el gel en la cámara de luz UV, las bandas fueron aún muy tenues para poder ser apreciadas claramente.

Esto involucró la segunda hipótesis propuesta, por lo que se pensó que si ya se tenía la temperatura óptima de unión del cebador, la única razón lógica por la cual el cebador no estaba amplificando la cantidad de ADN deseada era debido a que la cantidad de ADN de ratón en la mezcla del abdomen del triatomino era muy bajo. Entonces se pensó en aplicar una técnica capaz de replicar más veces ese ínfimo ADN en la muestra: Un doble PCR. Esto funciona realizando un segundo PCR al producto de un PCR anterior, con la finalidad de obtener más cantidad de ADN deseado para que se formen bandas mucho más claras que si solo se revelaran con un solo PCR (Arnheim & Erlich, 1992). La técnica fue puesta a prueba y al momento de revelar el gel en la cámara de luz UV resultó ser que las bandas eran muy tenues y en algunos pozos ni siquiera había señales de banda alguna (Ver Figura 4). Se pensó en la posibilidad de que el cebador haya

sido inhibido por la cantidad de ADN en la muestra, por lo que al final se obtuvieron resultados incoherentes a comparación de los obtenidos con anterioridad (ADN amplificado producto de un solo PCR).

Debido a la falta de tiempo, los experimentos tuvieron que ser interrumpidos, por lo que no se llegó a identificar el problema de especificidad de este cebador. Por los aspectos anteriores, se decidió no incluirlo en el estudio.

El cebador de *D. virginiana* fue el último de los seis cebadores en evaluarse y al principio se decidió evaluarlo solamente en 10 triatomíneos al azar. De esta prueba resultó la conclusión de que la temperatura de unión era la adecuada, ya que la banda del ADN control fue clara y conspicua en el gel (Ver figura 5). Ninguno de los triatomíneos resultó positivo para esta prueba. A raíz de esto (y de la experiencia acumulada con los demás cebadores) se decidió realizar una serie de experimentos para averiguar la concentración del cebador en la cual detectara ADN de tacuazín en ínfimas cantidades, observando al mismo tiempo que la concentración no fuera tan alta que detectara secuencias ajenas a las deseadas.

En la metodología utilizada para realizar el PCR, la concentración utilizada normalmente para los cebadores es de 10 μM (Arnheim & Erlich, 1992). Esta concentración fue puesta a prueba diluyéndola, variando su concentración con el fin de obtener diferencias de concentración de 2 en 2 μM , es decir, que se pretendía obtener cinco concentraciones del cebador: 2.0, 4.0, 6.0, 8.0 y 10.0 μM . A cada concentración se le agregó tres tipos diferentes de ADN: Perro, Ave y Tacuazín, con el fin de determinar en qué rango de concentración la detección sería únicamente de ADN de tacuazín (el ADN de interés). Después de realizar las pruebas los resultados demostraron que el rango de 4 a 6 μM solo detectaba ADN de tacuazín. Este rango fue re-diluido a una escala más fina (de 1 en 1 μM) con el fin de determinar con mayor exactitud la concentración y se le agregó una nueva variante: La dilución de ADN de tacuazín. La concentración del ADN utilizada en la técnica de PCR varía de 20 a 30 ng/ μl , esto debido a que un exceso del mismo puede producir efectos inhibitorios en las reacciones del PCR (Arnheim & Erlich, 1992). Para poner a prueba la sensibilidad del cebador se decidió diluir el ADN en las siguientes proporciones: 1x, 1/10, 1/100, 1/1000, 1/1000000. Después de realizadas las pruebas se determinó que la concentración óptima del cebador en la cual sólo detecta ADN de Tacuazín y además tiene una alta sensibilidad por el ADN (es decir, que detecta pocas cantidades de ADN deseado en un medio con varias secuencias) es de 6.5 μM .

La duración de los experimentos fue de aproximadamente mes y medio, y debido a que este cebador fue el último en evaluarse, los experimentos terminaron el 29 de septiembre de 2008. Esta situación forzó a no poder evaluar a los triatomíneos restantes ya que no se contaba con el tiempo prudente para poder realizar la totalidad de las evaluaciones y aún incluir esta información dentro del informe. Por estas razones este cebador no fue evaluado.

9.2 Positividad a *Trypanosoma cruzi*

El séptimo y último cebador evaluado de este estudio es considerado el más importante de todos: *T. cruzi*. Los datos obtenidos muestran que el único hospedero que presentó positividad para este cebador fue *C. familiaris* con 20% de los triatomíneos infectados (Ver Cuadro 2; Figura

2), los demás hospederos mostraron pruebas negativas al ser evaluados con este cebador. La baja prevalencia de *T. cruzi* en *T. dimidiata* alimentados con estos hospederos sugiere que, aunque no son reservorios directos del parásito, lo son potencialmente ya que siguen siendo fuente alimenticia en proporciones significativas (Ver Cuadro 1; Figura 1 y 2). Los únicos reservorios no potenciales son las aves, ya que el parásito no se replica en ellas (Zeledón & Ravinovich, 1981), mas sin embargo, es claro que su presencia es dañina, por fomentar la supervivencia de los triatomos dentro de las viviendas y aumentar las probabilidades de que se alimenten de un hospedero en el cual el parásito si se pueda replicar (e. g. mamíferos).

En estudios anteriores se evidencia al cerdo y humano entre los hospederos responsables de la incidencia de *T. cruzi* en *T. infestans* y *Triatoma vitticeps* (Gürtler, *et al.*, 1998; Gonçalves, *et al.*, 2000) lo que manifiesta su función como potenciales reservorios, aun no siendo responsables de la positividad en *T. dimidiata* en el presente estudio.

El hecho de que los únicos triatomos en mostrar positividad a *T. cruzi* fueran los que se alimentaron de perro, sugiere que este hospedero reúne las condiciones necesarias para la replicación y difusión del parásito, ya que por ser de fácil acceso para los triatomos (esto consecuencia de su uso en actividades humanas), es una fuente alimenticia con alta incidencia. A esto se le aúna el hecho de que pertenece a la Clase Mammalia, en la cual se sabe que el parásito puede completar su ciclo de vida y pasar a otro hospedero vía estos vectores (Zeledón & Ravinovich, 1981). Esto no significa que otros hospederos no reúnan estas condiciones, más sin embargo bajo las condiciones de vivienda en estas aldeas, este hospedero es favorecido, convirtiéndose en la única fuente viable de transmisión del parásito a los vectores.

Finalmente, es importante destacar que el cebador de este hospedero tampoco presentó problema alguno en términos de especificidad a la secuencia de ADN, ya que desde el principio se comportó, junto al cebador de *S. scrofa*, bajo los patrones de diseño esperados (Walker, *et al.*, 2004).

10. CONCLUSIONES.

1. *Canis lupus familiaris*, *Gallus gallus* y *Sus scrofa* fueron las fuentes alimenticias detectadas más frecuentes de *Triatoma dimidiata* con 100, 42 y 30 por ciento de incidencia respectivamente.
2. La elevada incidencia alimenticia en el perro sugiere que el hospedero es abundante y de fácil acceso en las viviendas para los triatomíneos. Es factible que el favorecimiento de esta accesibilidad provenga de la relación entre el uso del perro en las actividades humanas y a su falta de agresividad hacia los vectores.
3. La presencia de las aves en las viviendas, como parte de las condiciones de las aldeas estudiadas, tiene un efecto positivo en la supervivencia de los triatomíneos, ya que su tasa de preferencia alimenticia es una de las más altas en este estudio, por lo que se les debe de catalogar como hospederos cruciales en el mantenimiento de poblaciones y coadyutores de las tasa de infección en vectores.
4. La baja incidencia en la preferencia alimenticia de *Triatoma dimidiata* sobre el humano radica en la mayor accesibilidad de otras fuentes alimenticias en las viviendas, por lo que éstos son relegados a un segundo plano al momento de la selección del alimento. Posiblemente este resultado fue influenciado por el tamaño limitado de la muestra, por lo que no se puede concluir categóricamente que el humano no sea un patrón de alimentación principal en los triatomíneos hasta re-evaluar las variables con un tamaño de muestra mayor.
5. A pesar de haber sido diseñado para la identificación del Orden Rodentia (lo cual le resta complejidad a su diseño) el cebador de *Mus musculus* fue el que presentó mayor problema con la especificidad a la secuencia de ADN. No fue posible determinar la causa de esta complicación, por lo que la evaluación de este cebador quedó excluida del estudio para evitar datos falsos que pudieran alterarlo.
6. Los experimentos llevados a cabo con el cebador de *Didelphis virginiana* afinaron completa y satisfactoriamente su protocolo de PCR para Guatemala. Debido a la inversión de tiempo en estos ensayos no fue posible la evaluación de las muestras para su discusión en el estudio.
7. Existe una alta probabilidad de que una chinche se infecte con *Trypanosoma cruzi* si llega a alimentarse de sangre de perro, debido a que este hospedero fue el responsable del 100% de positividad en *Triatoma dimidiata* en el estudio. Debido a su estrecha relación con los humanos, este hospedero representa una fuente directa de infección en sus viviendas (ya que reside en ellas), por lo que conviene tomar en cuenta a este hospedero para el fomento de programas de prevención de la Tripanosomiasis Americana.

11 RECOMENDACIONES.

1. Desarrollar el estudio con un tamaño de muestra mayor para ampliar el rango de evaluación en las aldeas de la Brea y el Tule.
2. Ampliar el rango de hospederos para obtener mayor información acerca de los reservorios más importantes para *Trypanosoma cruzi*.

12. BIBLIOGRAFÍA.

1. **Andrade, Z. & Andrade, S.** 1971. Chagas' Disease (American Trypanosomiasis). The Williams and Wilkins Company. Pathology of protozoal and Helminthic diseases with Clinical correlation.
2. **Arnheim, N. & Erlich, H.** 1992. Polymerase chain reaction strategy. *Annu. Rev. Biochem.* 61, 131-156.
3. **Ayau Milla, O.** 1998. Enfermedad de Chagas. Experiencias personales y revisión Bibliográfica. 145 págs.
4. **Bamshad, M. & Wooding, S.P.** 2003. Signatures of natural selection in the human genome. *Nat. Rev. Genet.* 4, 99A-111A.
5. **Black, W., & DuTeau, N.** 1997. RAPD-PCR and SSCP analysis for insect population genetic studies. *Molecular Biology of insect of Disease vector: A method manual* Chapman and Hall ISBN. Págs 361-363.
6. **Bosseno, M., García, L., Baunaure, F., Magallón, G., Soto, M., Lozano, F., Dumonteil, E., Brenière, F.** 2006. Identification in triatome vectors of feeding sources and *Trypanosoma cruzi* variants by heteroduplex assay and a multiplex miniexon polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg* 2006, 74:303-305.
7. **Brenière, S.F., Pietrokovsky, S., Gastélum, E.M., Bosseno, M., Soto, M.M., Ouaisi, Ali., Lozano, F., Wisnivesky-Colli, C.** 2004. Feeding patterns of *T. longipennis* Usinger (Hemiptera, Reduviidae) of Peridomestic Habitats of a Rural Community in Jalisco State, Mexico. *J. Med. Entomol.* 41 (6): 1015-1020.
8. **Diotaiuti, L., Bronfen, E., Perilo, M.M., Machado, G.B.N., Loiola, C.F.** 1987. Aspectos do comportamento do *Triatoma vitticeps* na transmissão da doença de Chagas. *Rev Soc Bras Med Trop* 987;20Supl:87.

9. **Dorn P, Engelke D, Rodas A, Rosales R, Melgar S, Brahney B, Flores J, Monroy, C.** 1999. Utility of the Polymerase Chain Reaction in detection of *Tripanosoma cruzi* in Guatemalan Chagas vectors. *Am J Trop Med Hyg* 1999, 60:740-745.
10. **FitzHugh, W., Lander, E.S., Linton, L.M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M.C., Baldwin, J., Devon, K., Dewar, K., Doyle, M.** 2001. Initial Sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409, 860-921.
11. **Gürtler, R.E., Cohen, J.E., Cecere, M.C., Chuit, R.** 1997. Shifting host choices of the vector of Chagas disease *Triatoma infestans* in relation to the availability of hosts in houses in north-west Argentina. *J Appl Ecol* 34: 699-715.
12. **Gürtler, R.E., Cohen, J.E., Cecere, M.C., Lauricella, M., Chuit, R., Segura, E.** 1998. Influence of humans and domestic animals on the household prevalence of *Trypanosoma cruzi* in *Tryatoma infestans* populations in northwest Argentina. *Am. J. Trop. Med Hyg.* 1998, 58 (6):748-758.
13. **Gonçalves, T.C.M., Victório, V.M.N., Jurberg, J., Cunha, V.** 1988. Biología do *Triatoma vitticeps* (Stal, 1859) em condições de laboratório (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). I - Ciclo evolutivo. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1988;83:519-23.
14. **Gonçalves, T.C.M., Rocha, D., Cunha, R.** 2000. Feeding patterns of *Triatoma vitticeps* in the state of Rio de Janeiro, Brazil. *Rev Saúde Pública* 200 34 (4): 348- 52.
15. **Landaverde P.** 2004. Comparación de poblaciones silvestres y domésticas de *Triatoma dimidiata* (Latreille 1811) de México y Centroamérica por medio de la técnica de amplificación aleatoria del ADN polimórfico (RAPD-PCR). Informe de Tesis. Escuela de Biología, Universidad de San Carlos de Guatemala. 108 págs.
16. **Lent, H., & Wygodzinsky, P.** 1979. Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae) and their significance as vectors of Chagas disease. *Boletín del museo de historia Natural de América.* 163 (3): 123-520.
17. **Monroy, C., Bustamante, D., Rodas, A., Enriquez, E., Rosales, R.** 2003. Habitats, dispersion and invasion of sylvatic *Triatoma dimidiata* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) in Petén, Guatemala. *Journal of Medical Entomology.* Vol. 40, no. 6. 2003. Pp. (800-806)
18. **Monroy, C., Pellecer, M., Castro, X., Vásquez, M., Menes, M.** 2008. Fuentes alimenticias de *Tiatoma dimidiata* y su relación con *Trypanosoma cruzi*. Pendiente de publicación.
19. **Morel, C. & Lazdins, J.** 2003. Decease watch focus chagas' disease. *Nature Reviews Microbiology* 2003, 1: 14-15.

20. **Nakagawa, J., Cordón-Rosales, C., Juárez, J., Itzep, C., Nonami, T.** 2003. Impact of residual spraying on *Rhodnius prolixus* and *Triatoma dimidiata* in the department of Zacapa in Guatemala. *Memb. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro* 2003.98 (2): 277-281.
21. **Norusis, M.J.** 2007. SPSS for Windows. Advanced Statistics. 2007. Release 16. Chigago: SPSS Inc.
22. **OPS-Organización Panamericana de la Salud.** 2002. Taller para el establecimiento de pautas técnicas en el control de *Triatoma dimidiata*. Documento OPS/HCP/HCT/214/02. Organización Panamericana de la Salud. 35 págs.
23. **Pizarro J, Lucero D, Stevens L.** 2007. A method for the identification of guinea pig blood meal in the Chagas disease vector, *Triatoma infestans*. *Kinetoplastid Biology and Disease* 2007, 6:1.
24. **Pizarro J, Lucero D, Stevens L.** 2007. (a) PCR reveals significantly higher rates of *Tripanosoma cruzi* infection than microscopy in the Chagas vector, *Triatoma infestans*: High rates found in Chuquisaca, Bolivia. *BMC infectious Diseases* 2007, 7:66
25. **Pizarro J, Stevens L.** 2008. (b) Vector movement and feeding revealed by forensic DNA analysis of the blood meal in the Chagas disease vector *Triatoma infestans* in Chuquisaca, Bolivia. *Kinetoplastid Biology and Disease* 2008, 7:2.
26. **Schofield, C., Dias, D.** 1999. The southern cone initiative against Chagas' disease. *Adv Parasitol* 1999, 42:1-27.
27. **Tabaru Y, Monroy C, Rodas A, Mejia M, Rosales R.** 1999. The geographical distribution of vectors of Chaga's disease and populations at risk of infection in Guatemala. *Med. Entomol. Zool.* Vol 50 No. 1 Págs 9-17.
28. **Walker, J.A., Hughes, D.A., Hedges, D.J., Anders, B.A., Laborde, M.E., Shewale, J., Sinha, S.K., Batzer, M.A.** 2004. Quantitative PCR for DNA identification based on genome specific interspersed repetitive elements. *Genomics* 83 (2004) 518-527.
29. **Wisnivesky-Colli C.** 1987. Feeding patterns of Triatominae in relation to transmission of American Trypanosomiasis. RR Brener, AM Stoka (eds), *Chagas Disease Vectors*, Vol. 1, CRC Press, Boca Raton, Fl. p. 99-117.
30. **Zeledón, R.** 1981. El *Triatoma dimidiata* (Latreille, 1811) y su relación con la enfermedad de Chagas. EUNED. San José, Costa Rica. 147 págs.
31. **Zeledón, R., Rabinovich, J.E.** 1981. Chagas' disease: an ecological appraisal with special emphasis on its insect vectors. *Annu Rev Entomol* 26: 101–133.

Resumen de Investigación

Efecto de la variación de la fuente alimenticia sobre la positividad a *Trypanosoma cruzi* en *Triatoma dimidiata* en las aldeas de la Brea y el Tule, Quezada, Jutiapa, Guatemala.

Laboratorio de Entomología Aplicada y Parasitología. Lenap.

Br. Allan Urbizo. urbiology@gmail.com

Asesora de Investigación: Ph.D. Carlota Monroy

La Tripanosomiasis Americana, es una enfermedad parasitaria con gran incidencia en los países de América Latina, la cual es catalogada como la cuarta causa de mortalidad por enfermedades infecciosas en humanos. Es por ello que la prioridad de la salud pública en Latinoamérica ha sido su control debido a su fuerte impacto epidemiológico y social. Dicho control se ha basado en los estudios centrados en la habilidad de los vectores para trasladarse entre hábitats y colonizar los mismos, ya que esta información aporta datos para la comprensión de la relación entre vectores y humanos y así se utiliza para la determinación de las estrategias adecuadas para combatir la enfermedad. Con la presente investigación se pretende identificar las fuentes alimenticias de *Triatoma dimidiata* para determinar patrones de preferencia de los hospederos por parte del vector y la presencia del parásito *Trypanosoma cruzi* para así conocer los reservorios epidemiológicamente significativos en las aldeas estudiadas. Para poder evaluar esto, se puso a prueba a 60 triatominos (30 de cada aldea) y al contenido sanguíneo del abdomen de cada Triatomo se le extajo el ADN. Se evaluó cada muestra utilizando la técnica de la Reacción en cadena de la polimerasa, en la cual se probaron cebadores especie-específico diseñados por Jerylin Walker de la Universidad estatal de Louisiana, que evaluaron seis hospederos del parásito *T. cruzi*: Perro, gallina, ratón, cerdo, tacuazín y humano. Asimismo las muestras fueron evaluadas con el cebador de *T. cruzi* para su posterior comparación. La utilización los cebadores especie-específico, radicó en su capacidad para detectar secuencias específicas del ADN, por lo que a partir de la detección del mismo, se replicaron los fragmentos que diferían en tamaño. Las muestras replicadas se colocaron en una cámara de electroforesis que, mediante las propiedades de tamaño del fragmento replicado, migraron con diferente velocidad, por lo que se pudo conocer a que especie pertenecía ese fragmento. Los resultados obtenidos indicaron que las fuentes alimenticias más frecuentadas fueron: Perro, cerdo y ave con 100, 30 y 42 % respectivamente. También es importante mencionar que el cebador del Orden Rodentia fue el que presentó mayor problema con la especificidad a la secuencia de ADN, por lo que fue excluido del estudio para evitar datos falsos. Además el protocolo de PCR fue modificado en su totalidad para el cebador de tacuazín, pero debido a la cantidad de experimentos para lograrlo, no fue posible evaluar los triatominos estipulados. Con respecto a la positividad a *T. cruzi*, ésta fue causada en un 100% por el hospedero perro, esto debido a su gran participación en las actividades humanas. Es importante que estos estudios continúen evaluando un mayor número de muestras y evaluando un mayor número de hospederos que aportarían datos importantes para el desarrollo de metodologías de erradicación del vector para eliminar la enfermedad en humanos.