

**MADUREZ OVÁRICA Y PROTEÍNAS DEL VITelo EN
HEMBRAS DE *TRiatOMA BARBERI* USINGER, 1939
(HEMIPTERA: REDUVIIDAE, TRIATOMINAE) INFECTADAS
EXPERIMENTALMENTE CON *TRYPANOSOMA CRUZI* (CHAGAS, 1909)
(PROTOZOA: TRYPANOSOMATIDAE)**

**Arturo Ramírez Cruz¹, Benjamín Noguera Torres², Ricardo
Alejandre Aguilar², Imelda Martínez Morales³.**

¹ Departamento de Morfología.

² Departamento de Parasitología.

Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional.

Prolongación de Carpio y Plan de Ayala s/n. Colonia Santo Tomás.

C.P. 11340. México, D.F., MÉXICO

³ Departamento de Biodiversidad y Ecología Animal.

Instituto de Ecología, A.C. km. 2.5 Antigua Carretera a Coatepec No. 351

Congregación El Haya. C.P. 91070. Xalapa, Veracruz. MÉXICO

aramirezc@ipn.mx.

RESUMEN

Hembras de *Triatoma barberi* fueron infectadas experimentalmente con *Trypanosoma cruzi* a partir del segundo estadio ninfal, con el fin de detectar posibles alteraciones en los ovarios y en las proteínas del vitelo del huevo. En las hembras infectadas y en las hembras testigo, se tomaron en cuenta los cambios morfológicos que se presentaron en los ovarios durante su maduración, así como los patrones electroforéticos de las proteínas del vitelo del huevo. La morfología de los ovarios de *Triatoma barberi* no fue afectada por la infección con *Trypanosoma cruzi*; los patrones de crecimiento de los ovarios hasta su madurez fueron los mismos en las hembras testigo y en las infectadas. Las proteínas del vitelo del huevo, en ambos grupos de hembras, no presentaron diferencias en los patrones electroforéticos.

Palabras Clave: *Trypanosoma cruzi*, *Triatoma barberi*, infección, ovarios, proteínas del vitelo.

ABSTRACT

Triatoma barberi females were experimentally infected with *Trypanosoma cruzi* at the second ninfal instar. The effect of the infection on the ovaries and in yolk proteins eggs were evaluated. The morphological changes in ovaries during their maturation as well as electrophoretic patterns of the yolk proteins eggs in infected and uninfected females were studied. There was no significant difference in the growth patterns of the ovaries between both females groups. None difference in electrophoretic patterns of yolk proteins in the eggs between infected and uninfected females, was observed.

Key Words: *Trypanosoma cruzi*, *Triatoma barberi*, infection, ovaries, yolk proteins.

INTRODUCCIÓN

La infección provocada experimentalmente con *Trypanosoma cruzi* (Chagas 1909) (Protozoa: Trypanosomatidae) puede provocar una reducción de la fecundidad en *Triatoma infestans* (Klug 1834) (Hemiptera: Triatominae) (Schaub 1989) y de la fecundidad y la

fertilidad en *Panstrongylus megistus* (Burmeister) (Hemiptera: Triatominae) (Lima et al. 1992).

Triatoma barberi Usinger, 1939 (Hemiptera: Triatominae) es considerada la especie endémica más importante transmisora de la enfermedad de Chagas en México (Schofield & Días 1995) por sus hábitos totalmente domiciliados (Zárate 1984) y su amplia distribución en nuestro país (Velasco & Salazar 1995). Sin embargo, a pesar de la importancia de esta especie como vector, se ha estudiado poco sobre su biología reproductiva y no existe información sobre posibles alteraciones en los ovarios causadas por la infección con *Trypanosoma cruzi*.

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la infección con *Trypanosoma cruzi* sobre la maduración de los ovarios y sobre las proteínas del vitelo en el huevo recién puesto.

MATERIAL Y MÉTODOS

Dos cohortes de ninfas de *Triatoma barberi* del primer estadio se mantuvieron a 26 °C y 28% de humedad relativa, obscuridad continua y alimentación semanal hasta repleción sobre ratón por el método de Ryckman (Ryckman 1951). Una cohorte se usó como testigo y la otra fue infectada a partir del segundo estadio ninfal con *Trypanosoma cruzi* de la cepa Nayarit, mediante su alimentación sobre ratones albinos NIH infectados con dicha cepa, que habían alcanzado un máximo de parasitemia de alrededor de 10×10^4 tripomastigotes/ml de sangre. Las ninfas infectadas y las testigo, desde el tercer estadio ninfal hasta que emergieron como adultos, fueron alimentadas sobre conejo, con la misma frecuencia y por el método ya mencionados.

Se analizaron 80 hembras adultas de *Triatoma barberi*, 40 hembras testigo y 40 hembras infectadas, de diferentes edades. Ambos lotes de hembras se separaron en 8 grupos de edad, desde la emergencia (día 0) hasta los siete días de edad, conteniendo 5 hembras cada grupo. La maduración de los ovarios se evaluó mediante la técnica descrita en Ramírez et al. (2003). Se midieron la longitud y ancho de los ovarios y la longitud del folículo basal de las hembras testigo e infectadas de cada grupo de edad. Para cada una de las tres variables consideradas, las comparaciones entre tratamientos se realizaron mediante el análisis de varianza (ANOVA) con $\alpha = 0.05$

Para determinar posibles variaciones en los constituyentes proteínicos del vitelo del huevo recién ovipositado, se aplicó la técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) utilizando el método de Lagerblad et al. (1989) con modificaciones, principalmente en la concentración de los geles. Para ello se colectaron huevos de hembras testigo e infectadas, de 0 horas (recién ovipositados) a 6 horas de oviposición que se guardaron en tubos de Eppendorf de 1.5 ml para congelarlos a -70 °C hasta su utilización. Se procesaron en total 30 huevos: 16 procedentes de hembras sin infectar y 14 de hembras infectadas.

Después de descongelarlos, se homogeneizó un solo huevo dentro de un tubo de Eppendorf de 0.5 ml. junto con una solución de 10ml de inhibidores de proteasas (ácido p-hydroximercuribenzoico (PHMB) 1 nM; fenil-metil-sulfonil-fluoro (PMSF) 0.33 nM); sal disódica del ácido etilen diamino tetra-acético (EDTA 1 nM); se sometieron a centrifugación en frío a 14000 rpm durante 2 min. Se separó el centrifugado de los restos del corion presente en los tubos, determinando posteriormente la concentración de proteínas de la

muestra del huevo mediante el método de Bradford (Bollag & Edelstein 1992). Se aplicaron 4 ml de la muestra en geles de poliacrilamida a 7.5% con SDS (dodecil sulfato de sodio), usando como marcadores de peso molecular: miosina (200 kDa), β galactosidasa (116 kDa), fosforilasa B (97.4 kDa), albúmina sérica bovina (66.2 kDa) y aldolasa (39.2 kDa). Se usó una corriente alterna de 120 voltios y 49-50 mA. Los geles se tñeron con azul de Coomassie R-250 al 0.2% y se destiñeron con una mezcla de metanol, ácido acético y agua. El cálculo de los pesos moleculares de cada una de las proteínas se realizó graficando los Rf de los marcadores de peso molecular contra el logaritmo de su peso molecular (Bollag & Edelstein 1992).

RESULTADOS

Madurez de los Ovarios

Tanto en las hembras testigo como en las infectadas, desde la emergencia hasta el segundo día de edad, la longitud y ancho de los ovarios fueron los más pequeños registrados (Cuadro 1). Sus ovariolas presentaron el germario y el vitelario bien definidos y casi todas presentaban un folículo basal de pequeña longitud (Cuadro 1), conteniendo el ovocito basal que iniciaba la vitelogénesis.

Cuadro 1

Crecimiento de los ovarios y los folículos ováricos basales en *Triatoma barberi* testigos e infectadas con *Trypanosoma cruzi*, desde la emergencia hasta los siete días de edad. En cada edad n=5 hembras.

Edad (días)	Ovario		Ovario		Folículo basal	
	Longitud (mm) O \pm es		Ancho (mm) O \pm es		Longitud (mm) O \pm es	
	Testigos	Infectadas	Testigos	Infectadas	Testigos	Infectadas
Emergencia	1.9 \pm 0.09	2.1 \pm 0.08	1.5 \pm 0.07	1.7 \pm 0.14	0.49 \pm 0.02	0.48 \pm 0.02
1	2.3 \pm 0.11	2.2 \pm 0.12	1.6 \pm 0.08	1.7 \pm 0.10	0.62 \pm 0.03	0.50 \pm 0.03
2	2.4 \pm 0.13	2.6 \pm 0.18	1.7 \pm 0.07	1.7 \pm 0.11	0.63 \pm 0.04	0.65 \pm 0.09
3	2.6 \pm 0.17	2.7 \pm 0.20	1.7 \pm 0.10	1.8 \pm 0.18	0.79 \pm 0.09	0.84 \pm 0.10
4	3.2 \pm 0.23	3.4 \pm 0.24	2.1 \pm 0.17	2.1 \pm 0.24	1.08 \pm 0.12	1.12 \pm 0.12
5	3.6 \pm 0.28	4.0 \pm 0.13	2.6 \pm 0.34	3.0 \pm 0.16	1.30 \pm 0.10	1.40 \pm 0.07
6	3.8 \pm 0.28	4.3 \pm 0.17	2.8 \pm 0.26	3.2 \pm 0.06	1.69 \pm 0.16	1.92 \pm 0.08
7	4.0 \pm 0.31	4.0 \pm 0.09	3.0 \pm 0.27	3.0 \pm 0.22	1.70 \pm 0.17	1.75 \pm 0.08

Entre el tercero y el cuarto día postemergencia, en ambos grupos de hembras, la longitud y el ancho de los ovarios aumentó considerablemente (Cuadro 1). En el vitelario de cada ovariola la longitud del folículo basal también aumentó apreciablemente (Cuadro 1). En estas edades el ovocito se encontraba en plena vitelogénesis.

Al quinto día de edad los ovarios y los folículos basales en ambos grupos de hembras alcanzaron un gran tamaño (Cuadro 1). Además en algunas hembras se observaron los primeros ovocitos basales con corion, indicando que la vitelogénesis había terminado, alcanzando con ello la talla de puesta y la madurez. De las 5 hembras testigo de esta edad,

sólo 2 de ellas (40%) tenían ovocitos basales maduros: una (20%) con 2 ovocitos y la otra (20%) con 6 ovocitos. Por otra parte, el 100% de las 5 hembras infectadas de esta edad, presentaban entre 1 y 3 ovocitos con corion, de un total de 14 ovocitos basales por hembra.

Entre los seis y siete días de edad, los ovarios de las hembras testigo y de las infectadas alcanzaron el máximo tamaño y los folículos basales la máxima longitud observada (Cuadro 1). En el grupo testigo, el número de hembras con ovocitos que habían completado la coriogénesis fue mayor con relación a la edad anterior. De las 5 hembras de 6 días de edad, 3 de ellas (60%) presentaron entre 4 y 5 folículos basales con ovocitos con corion, de un total de 14 folículos basales por hembra. De las 5 hembras de 7 días de edad, el 100%, tuvo entre 1 y 4 ovocitos basales con corion. En el grupo de las hembras infectadas, el 100 % de las hembras presentaron entre 2 y 6 ovocitos con corion de un total de 14 ovocitos basales por hembra.

Los folículos ováricos basales de las hembras testigo tenían ovocitos maduros con una longitud promedio de 1.88 ± 0.10 mm. (n= 21). En las hembras infectadas, los folículos ováricos basales con ovocitos maduros alcanzaron una longitud promedio de 1.89 ± 0.07 mm. (n= 23).

Comparando los resultados obtenidos en las hembras testigo y las hembras infectadas, no se encontraron diferencias significativas entre la longitud promedio ($F_{(1, 64)} = 3.46$; $p > 0.05$) ni el ancho promedio de los ovarios ($F_{(1, 64)} = 3.65$; $p > 0.05$). Tampoco hubo diferencias significativas en la longitud promedio del folículo basal ($F_{(1, 64)} = 1.01$; $p > 0.05$) entre ambos grupos de hembras. Aparentemente el crecimiento de los ovarios y de los folículos basales no son afectados con la infección de *Trypanosoma cruzi*.

Proteínas del Huevo

Los patrones electroforéticos encontrados revelaron que tanto en los huevos ovipositados por las hembras testigo como en los ovipositados por las hembras infectadas, el vitelo está formado principalmente por 7 fracciones proteínicas, con un peso molecular aproximado que va de los 45 kDa hasta los 158 kDa (Fig. 1). Por otra parte, es posible apreciar tres subunidades proteínicas muy anchas e intensas: una banda de aproximadamente 158 kDa, otra de alrededor de 145 kDa y otra más de alrededor de 138 kDa. La gran intensidad de estas bandas, junto con otras tres subunidades proteínicas poco menos intensas de aproximadamente 48, 45 y 40 kDa, respectivamente, al representar todas una mayor concentración de proteína, indicarían que corresponden posiblemente a las vitelinas de *Triatoma barberi*. En ambos grupos de huevos sus fracciones proteínicas mostraron patrones electroforéticos prácticamente idénticos (Fig. 1). No se observaron diferencias en el bandeo que pudieran sugerir alguna alteración en las proteínas del vitelo, que fuera causada por la infección de las hembras con *Trypanosoma cruzi*.

DISCUSIÓN

El crecimiento de los ovarios y de los folículos basales hasta su maduración en *Triatoma barberi*, no se afectó por la infección con *Trypanosoma cruzi* de la cepa Nayarit, durante los primeros siete días del primer ciclo gonadotrófico.

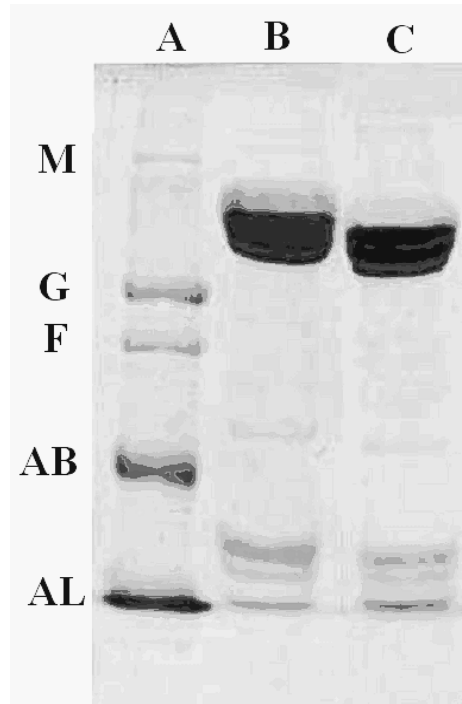


Figura 1

Patrones electroforéticos de las proteínas del vitelo de huevos de *Triatoma barberi* recién ovipositados a máximo 6 horas después de la oviposición. A, marcadores de peso molecular; B, hembras testigo; C, hembras infectadas con *Trypanosoma cruzi* (gel de poliacrilamida al 7.5 % con SDS). M, miosina (200 kDa); G, β galactosidasa (116 kDa); F, fosforilasa B (97.4 kDa); AB, albúmina sérica bovina (66.2 kDa); AL, aldolasa (39.2 kDa).

Schaub (1994) considera a *Trypanosoma cruzi* como una especie subpatogénica, ya que sólo produce efectos patológicos sobre el insecto huésped cuando éste se encuentra bajo condiciones adversas. Esto podría explicar al menos en parte, el que no se observara alteración en la madurez de los ovarios o de los ovocitos de *Triatoma barberi* infectadas, ya que éstas se mantuvieron en el laboratorio bajo condiciones óptimas de crianza.

De igual manera, Zeledón *et al.* (1970) trabajando con *Triatoma dimidiata* (Latreille, 1811) (Hemiptera: Triatominae) demostraron que la fecundidad y la fertilidad de las hembras mantenidas en laboratorio, tampoco son alteradas por la infección con *Trypanosoma cruzi*. Sin embargo, existen evidencias de que en *Panstrongylus megistus* infectadas con *Trypanosoma cruzi* y criadas bajo condiciones de laboratorio, la fertilidad y la fecundidad se ven disminuidas (Lima *et al.* 1992), lo que indicaría que efectivamente el flagelado puede afectar al insecto vector aun bajo condiciones óptimas de crianza.

Las hembras de *Triatoma barberi* fueron infectadas a partir del segundo estadio ninfal, lo cual posiblemente también influyó para que no se observará ningún efecto adverso sobre

la maduración de los ovarios, ya que hay evidencia de que existe una relación entre el efecto patológico sobre el insecto y la etapa del ciclo de vida en el cual es infectado experimentalmente con *Trypanosoma cruzi*. Por ejemplo, cuando se infectaron ninfas de todos los estadios ninfales, así como hembras adultas de *Triatoma infestans* con *Trypanosoma cruzi*, se determinó que en las hembras que habían sido infectadas en la etapa adulta, ocurría una reducción significativa en el número de huevos entre el 14 y 20%, mientras que ninguna reducción se observó en las hembras que habían sido infectadas en la etapa ninfal (Schaub 1989). Esto último podría sugerir que el insecto vector adquiriría cierta tolerancia o inmunidad a la infección con *Trypanosoma cruzi* mientras transcurre su etapa ninfal, lo que no lograría si la infección se adquiere en la etapa adulta.

En los patrones electroforéticos de las proteínas vitelínicas de los huevos de hembras de *Triatoma barberi* infectadas, tampoco se encontraron diferencias que sugieran algún efecto patológico por la presencia del flagelado. Al parecer las hembras infectadas tuvieron suficientes proteínas y otros metabolitos para la formación del vitelo, lo que permitió que algunas de ellas produjeran hasta seis ovocitos maduros durante los primeros siete días de edad.

Esto sugiere que *Triatoma barberi* al parecer no compite con *Trypanosoma cruzi* por la utilización de las proteínas que se incorporan al ovocito durante la vitelogénesis. Sin embargo, aunque no se determinó, las hembras infectadas pudieron haber consumido una mayor cantidad de sangre durante los estadios ninfales, para compensar la posible deficiencia de las proteínas necesarias para la producción de los ovocitos. Según Schaub (1988; 1989) los triatominos que son infectados con *Trypanosoma cruzi* y que son alimentados con regularidad, muestran sólo un leve o ningún efecto adverso; además es posible que no se observen efectos sobre los insectos infectados ya que éstos son capaces de ingerir una mayor cantidad de sangre para compensar el alimento presumiblemente usado por *Trypanosoma cruzi*, o también porque el requerimiento de metabolitos de este flagelado sea mínimo como para producir efectos adversos sobre el insecto vector.

AGRADECIMIENTOS

Al M. en C. Javier Osante V. por su apoyo en la parte estadística. A dos revisores anónimos por sus sugerencias. Este trabajo se realizó con apoyo del proyecto CGPI 980438 de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional, México.

LITERATURA CITADA

- Bollag, D. M. & S. J. Edelstein.** 1992. *Protein Methods*. Wiley-Liss, Inc. New York. 230 pp.
- Lagerblad, O. P., M. Dansa de Alencar P. & H. Masuda.** 1989. Vitellin processing and degradation during embryogenesis in *Rhodnius prolixus*. *Insect Biochem.* 19(5):489-498.
- Lima, M. M., J. Borges P., J. A. Albuquerque Do Santos, Z. Teixeira P. & M. Vianna B.** 1992. Development and reproduction of *Panstrongylus megistus* (Hemiptera: Reduviidae) infected with *Trypanosoma cruzi*, under laboratory conditions. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 85(4): 458-461.
- Ramírez C. A., B. Noguera T. & I. Martínez M.** 2003. Maduración ovárica en *Triatoma barberi* Usinger, 1939 (Hemiptera: Triatominae) bajo condiciones de laboratorio. *Folia Entomol. Mex.* 42(1):21-26.

- Ryckman, R. E.** 1951. Laboratory culture of Triatominae with observations on behavior and a new feeding device. *J. Parasitol.* 83(3):210-214.
- Schaub, G. A.** 1988. Developmental time and mortality of larvae of *Triatoma infestans* infected with *Trypanosoma cruzi*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 88:94-96.
- _____. 1989. Does *Trypanosoma cruzi* Stress its Vectors ? *Parasitology Today.* 5(6): 185-188.
- _____. 1994. Pathogenicity of trypanosomatids on insects. *Parasitology Today.* 10(12): 463-468.
- Schofield, C. J. & J. C. P. Días.** 1995. Introduction and Historical Overview. Pp. 11-16. In: *International Workshop on Population Genetics and Control of Triatominae*. Santo Domingo de los Colorados. Ecuador.
- Velasco, C. O. & P. M. Salazar.** 1995. Enfermedad de Chagas en México. Pp. 28-29. In: *International Workshop on Population Genetics and Control of Triatominae*. Santo Domingo de los Colorados. Ecuador.
- Zárate, L. G.** 1984. Comportamiento de los triatomíneos en relación a su potencial transmisor de la enfermedad de Chagas (Hemiptera: Reduviidae). *Folia Entomol. Mex.* 61:257-271.
- Zeledón, R., V. M. Guardia, A. Zúñiga & J. C. Swartzwelder.** 1970. Biology and ethology of *Triatoma dimidiata* (Latreille, 1811) II. Life span of adults and fecundity and fertility of females. *J. Med. Entomol.* 7(4):462-469.

Recibido: 2 de julio 2004

Aceptado: 11 de marzo 2005