

UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA

**COMPETENCIA ENTRE *Trypanosoma sp*, DURANTE EL
CRECIMIENTO EN MEDIOS DE CULTIVO *IN VITRO***

www.bdigital.ula.ve

Trabajo especial de grado presentad ante la Ilustre Universidad de Los Andes

Para optar al Título de:

Licenciada en Biología

POR: LEISBA MARY QUINTERO

MÉRIDA – VENEZUELA

1999

AGRADECIMIENTO

Al profesor Nelson López, maestro y guía en el asesoramiento de este trabajo.

A Ivón, por su colaboración en la redacción del mismo.

A Betty, por su ayuda Incondicional.

A la Profesora Cecilia Scorza y el Profesor Daniel Cabello por sus sugerencias.

www.bdigital.ula.ve

1. INTRODUCCIÓN

La Enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis Americana, es una parasitosis endémica de América Central y América del Sur. Su agente etiológico, el *Trypanosoma cruzi* (CHAGAS, 1909) es un protozoo flagelado hemático, digenético, con un hospedador vertebrado (numerosos mamíferos, incluyendo el hombre) y uno invertebrado (Reduviidae: Triatominae).

Este parásito infecta entre 10 y 20 millones de personas (MILES, 1982) constituyendo uno de los grandes problemas parasitológicos y de salud pública debido a los altos índices de mortalidad. La infección está asociada principalmente a los sectores poblacionales, rurales y suburbanos donde las condiciones socio - económicas y educacionales son deficientes (ZELEDON & RABINOVICH, 1981).

La posición sistemática de *T.cruzi* es la siguiente (Levine, 1980).

Reino: PROTISTA

Subreino: PROTOZOA

Phyllum: SARCOMASTIGOPHORA

Subphyllum: MASTIGOPHORA

Clase: ZOOMASTIGOPHOREA

Orden: KINETOPLASTIDA

Suborden: TRYPANOSOMATINA

Familia: TRYPANOSOMATIDAE

Género: TRYPANOSOMA

Desde su descubrimiento, se conocen sus formas evolutivas. La definición de esas formas está basada en: la morfología general de la célula, la posición del kinetoplasto en relación al núcleo y la región donde emerge el flagelo (HOARE, 1972).

Se definen las siguientes: 1) amastigote, de forma esférica u ovalada, kinetoplasto marginal sin flagelo libre y de 2 micras de diámetro, esta es la forma replicativa encontrada intracelularmente en el hospedador vertebrado, 2) epimastigote, tiene forma de hoja con kinetoplasto anterior al núcleo y flagelo libre, miden 20 micras de largo y representan la forma multiplicativa encontrada en el tracto digestivo del insecto vector y en medios de cultivo artificiales. 3) trypomastigote, tiene forma de “C” o “S”, con el kinetoplasto posterior al

núcleo, con flagelo libre y una larga membrana ondulante, mide 20 micras de largo, no son capaces de dividirse y representan la forma infectiva para el hospedador vertebrado.

En el hospedador invertebrado, el ciclo comienza con la ingestión de trypomastigotes sanguícolas que después de varias transformaciones se alojan en el lumen del tracto digestivo, aquí el parásito se multiplica (extracelularmente) como epimastigotes (DEANE, 1984), los flagelados penetran a los túbulos de Malphigi y luego van llegando a la ampolla rectal en forma de trypomastigotes metacíclicos, de donde son expulsados con las excretas (DE SOUZA, 1984).

La infección del vertebrado es por vía contaminativa, los trypomastigotes metacíclicos presentes en las heces y orina del invertebrado penetran por la piel intacta o lacerada. El parásito una vez dentro del sistema sanguíneo del hospedador vertebrado infecta diferentes tipos de células, transformándose en amastigotes, que luego de varias divisiones; se transforman de nuevo en trypomastigotes sanguícolas y son liberados por rompimiento de las células que los contienen (BRENER, 1973).

Junto con el *T. cruzi*, en su propio hábitat, se encuentra *Trypanosoma rangeli* (Tejera, 1920), el cual produce una tripanosomiasis de interferencia con la causada por *T. cruzi* (PIFANO & COLS, 1948). A diferencia del agente etiológico de la Enfermedad de Chagas, el *T. rangeli* no es patógeno para el hospedador vertebrado (HERNÁNDEZ DE PAREDES & PAREDES, 1949; GROOT, et al, 1951; PIFANO, 1954).

El *T. rangeli* es un protozooario digenético con una longitud del cuerpo que varía entre 12 - 72 μm en las formas sanguícolas, con un kinetoplasto pequeño puntiforme y subterminal situado a cierta distancia del extremo posterior del cuerpo, membrana ondulante bien desarrollada y un flagelo libre (HOARE, 1972).

HOARE (1968), considera que *T. rangeli* presenta características de salivaria y estercoraria, produciendo formas infectivas en la estación posterior y anterior del insecto vector, sin embargo, TOBIE (1964) señala que las formas epimastigotes presentes en el contenido intestinal no son formas infectivas para el hospedador vertebrado.

El ciclo biológico de *T. rangeli* en el hospedador invertebrado ha sido estudiado en su principal vector *P. prolixus*, se inicia cuando las formas sanguícolas presentes en el hospedador vertebrado son ingeridas por el triatomino, estas formas sanguícolas ingeridas y

establecidas en el tubo digestivo de los triatomíneos sufren una transformación y multiplicación, resultando un gran número de formas epimastigotes y tripomastigotes largas (D'ALESSANDRO, 1968; AÑEZ, 1981).

El *T. rangeli* se caracteriza por invadir la hemolinfa de los triatomíneos donde se multiplica tanto extra como intracelularmente produciendo enormes cantidades de epimastigotes, trypomastigotes y algunas formas metacíclicas; una vez invadida la hemolinfa los flagelados migran a las glándulas salivales en las cuales penetran activamente, aquí se producen grandes cantidades de formas metacíclicas que constituyen la forma infectiva para el hospedador vertebrado (ELLIS, et al, 1960; AÑEZ, 1982).

La transmisión del parásito al hospedador vertebrado se lleva a cabo por vía inoculativa (HOARE, 1964), en este hospedador el ciclo vital de *T. rangeli* se inicia cuando los insectos infectados en las glándulas salivales depositan a través de la saliva las formas metacíclicas infectivas durante la picadura, directamente en los capilares sanguíneos del hospedador vertebrado (TOBIE, 1961; D'ALESSANDRO, 1968; AÑEZ, 1981) o en la dermis de los animales expuestos a la picadura para migrar al torrente circulatorio transformándose en típicos tripomastigotes sanguíneos (D'ALESSANDRO, 1968; AÑEZ, 1981).

El *T. cruzi*, durante su ciclo de vida se encuentra compartiendo su hábitat con otros microorganismos, por ejemplo: cuando se encuentra en el tracto digestivo del chipo y en el intestino medio junto con simbiontes de *R. prolixus* entre lo que se conoce *Nocardia rhonii*. De acuerdo con Watkins (1971) quien elaboró estudios de patogenicidad de *T. rangeli* en *P. Prolixus*, encuentra que *T. rangeli* induce la inhibición de *Nocardia rhonii*, por ser antagónico a este simbiote, normalmente esencial, que se encuentra en el esófago e intestino medio del chipo. Así mismo, *T. cruzi* se puede encontrar en algunas ocasiones junto con *T. rangeli* con el cual aparentemente puede coexistir; esta relación de coexistencia sería un indicativo de que ambos *Trypanosomas* no tienen el mismo nicho en el intestino medio del chipo o que exista una competitividad, y si se quiere, una compensación semejante entre ambos.

En algunos países de América Latina se han demostrado infecciones humanas conjuntas entre *Trypanosoma* (*Schizotrypanum*) *cruzi* y *Trypanosoma* (*Nanomonas*) *rangeli*; donde este último parásito aparentemente no desarrolla patología en el hombre. En Argentina, se han realizado algunos aislamientos del *T. rangeli* aunque no pudieron ser confirmados.

Además, se han realizado estudios para verificar la presencia de *T. rangeli* en triatominos capturados en zonas endémicas y en insectos que se habían alimentado para xenodiagnóstico, no llegándose a demostrar la presencia de este parásito en los insectos estudiados; sin embargo, la ausencia del *T. rangeli* en este estudio no permite descartar la eventualidad de infecciones concomitantes. Los estudios antigénicos que se han realizado sobre ambos parásitos indican considerable parentesco antigénico entre ellos. Este hecho enfatiza la necesidad de encontrar método adecuado de diagnóstico en las zonas donde ambas parasitosis coexisten. (D'ALESSANDRO et al., 1980).

Trataremos terminología como nicho y competencia, por lo que debemos hacer referencia a las primeras pruebas provenientes de una serie de experimentos realizados por Gause (1934). Experimentó con poblaciones de dos especies *Paramecium*; a saber *P. aurelia* y otra especie más grande, *P. caudatum*, en el mismo tubo de ensayo y en tubos diferentes; sus resultados permitieron deducir que un conjunto de condiciones favorecía a una especie, y que una serie distinta favorecía a la otra. Sin embargo, dado que las dos especies eran similares, una u otra terminaría por vencer dando el tiempo suficiente causando la exclusión competitiva. El principio de exclusión competitiva entonces entabla; que a menos que los nichos de dos especies difieran ellas no pueden coexistir. De manera, que aquellas especies que genéticamente son muy similares con nichos prácticamente iguales, no pueden ocupar el mismo rango geográfico al mismo tiempo (WILSON & BOSSERT, 1971).

Este trabajo de investigación aporta nuevos conocimientos en ecología de parásitos. Se podrá conocer si la relación entre estos microorganismos puede ser usada para controlar el crecimiento de *T. cruzi*, y conocer el comportamiento de parásitos de la misma especie o especies diferentes cuando crecen en competencia en medios de cultivo como: LIT y NNN.

HIPÓTESIS

- 1) Las diferentes cepas de *Trypanosoma sp.*, pueden crecer juntas sin afectarse.
- 2) *Trypanosoma cruzi* y *Trypanosoma rangeli*, difieren en sus nichos.

OBJETIVOS

Cultivar y comparar el crecimiento de: *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma rangeli*, y aislado (106), en recipientes pares diseñados para estudiar el fenómeno de competencia, durante el crecimiento in vitro.

2.- MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Material biológico.

2.1.1. Cepas de *Trypanosoma* sp.

* *T. cruzi* “EP”, aislada en 1967, de un caso agudo de enfermedad de Chagas, por el Dr. J. W. Torrealba de la Cátedra de Parasitología, Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad de Carabobo, Valencia.

* *T. cruzi* “Y”, aislada por xenodiagnóstico de un caso humano en Brasil (Silva & Nussenzweig, 1953), y traída a Venezuela por el Dr. J. W. Torrealba.

* *T. sp.* “106”, aislada de triatomino silvestre, pasada a ratón, luego se aisló por medio de chipos y se mantiene en el Laboratorio de Biología de Protozoarios.

* *T. rangeli*, donada por el Laboratorio de Inmunología de Parásitos de la Facultad de Ciencias. Departamento de Biología de la Universidad de los Andes.

Estas cepas son mantenidas en el laboratorio de Biología de Protozoarios, siendo sembradas en medio LIT, NNN y en pases sucesivos de ratón a ratón.

2.1.2. Animales experimentales.

* Se utilizaron ratones albinos machos de 30 días de nacidos procedentes del Bioterio de la Universidad de Los Andes y mantenidos en el Bioterio de la Facultad de Ciencias con ratarina y agua “*ad libitum*”.

* Triatominos, para realizar la prueba de xenodiagnóstico, haciendo uso de un lote de ninfas del III estadio de *R. prolixus* del Insectario del Laboratorio “Herman Lent” de la Facultad de Ciencias, Departamento de Biología, Universidad de Los Andes (mantenidos a 26°C).

2.2. Medios de Cultivo.

2.2.1. Medio LIT (Camargo, 1964, modificado por Boiso, 1982).

Composición:

Extracto de levadura	5,0 g
NaCl	9,0 g
KCl	0,4 g
Na ₂ HPO ₄	7,5 g
Glucosa	4,0 g
Triptosa	15,0 g
Hemina	20,0 mg *
Extracto de hígado	50,0 ml
Suero de ternera	50,0 ml

* (Disueltos en 8 ml de NaOH, 0.1 N).

Disolvimos hasta completar 1 ml con agua destilada ajustado el pH a 7,2 con NaOH 0,1 N o HCl. El medio posteriormente se filtró y esterilizó, siendo recogido en fiolas de 100 ml y guarda a 4 °C.

2.2.2. Preparación del medio de cultivo.

2.2.2.1. Extracto de Hígado de Res.

Eliminamos el tegumento del hígado y lo cortamos en pedazos pequeños de no más de 2 cm., para lavarlos con solución salina al 0,3 % hasta eliminar toda la sangre, una vez pesado el material agregamos 130 ml. solución salina por cada 60 g. de hígado. Se calienta en baño de maría a 45 °C por 20 min. y seguidamente a 90 °C durante 5 min., filtramos a través de la gasa. Centrifugamos durante 15 min. a 5000 rpm. Se descartó el centrifugado y se guardó congelado a - 20 °C hasta su uso.

2.2.2.2. Suero de ternera.

El suero se obtuvo de la sangre de terneras sanas, de 8 a 10 meses de nacidas, en la Hacienda “El Joque” (Progal) del Estado Mérida. Una vez extraída la sangre de la yugular del ternero, se dejó en reposo dentro de los envases, los cuales fueron transportados al Laboratorio en una cava con hielo; para luego ser procesados por centrifugación para la obtención del suero y almacenados en congelador a - 20 °C.

2.2.3. Medio NNN.

Agar	15,0 g
Glucosa	6,0 g
Peptona	10,0 g
NaCl	5,0 g
Agua destilada	100 ml

En un beaker se disolvieron todas las sustancias y se esterilizaron en autoclave a 15 libras de presión.

2.2.3.1. Obtención de sangre de conejo.

La sangre fue extraída mediante punción cardíaca bajo condiciones estériles, recogidas en fiolas de 250 ml que contenían perlas de vidrio con la finalidad de desfibrinar la sangre.

2.2.3.2. Preparación del Agar - Sangre.

Se esterilizaron los "beakers" que contenían la base de agar mantenidos a una temperatura de 48 °C, en baño de maría, se agregó estérilmente sangre desfibrinada. Por cada 50 ml de base de agar 7,5 ml de sangre de conejo desfibrinada.

Se dejó a temperatura ambiente por 48 h. con el fin de probar su esterilidad.

2.2.4. Medio Salino (Fase líquida) para NNN.

Composición:

NaCl	14,63 g
KCl	0,45 g
CaCl ₃	0,50 g
NaHCO ₃	0,19 g

Se mezclaron las sales, se disolvieron agregando agua destilada hasta completar 100 ml; se llevó la solución a pH 7,2 y se esterilizó en autoclave por 20 min a 15 libras. de presión.

A cada fiola de agar - sangre se le agregó 50 ml de medio salino, se dejó por 48 h para comprobar su esterilidad.

2.3. Cultivo “in vitro” para *Trypanosoma* sp.

Los cultivos de *Trypanosomas*. son mantenidos en el Laboratorio a 28 °C, en agitación de 90 rpm. En estas condiciones se alcanzan poblaciones de parásitos superiores a 100 millones/ml de medio; en la fase estacionaria, independiente del inóculo inicial.

* Medio LIT

Con un volumen de 20 ml a ambos lados de los fajardines modificados (previamente esterilizados), se inocularon 0,5 ml de suspensión de parásitos (provenientes del cultivo anterior) cuya fase exponencial está comprendida entre 0,7 a 0,8 D.O a 560 nm.

* Medio NNN

Se colocan a ambos lados de los fajardines modificados (Figura 1), un volumen de 20 ml de fase sólida y 20 ml de fase líquida; en este medio se inoculan 0,5 ml de parásitos.

2.4. Medición del crecimiento “in vitro”.

* Para las experiencias realizadas en medio LIT; se midió diariamente la D.O a ambos extremos de los fajardines modificados, haciendo uso de un espectrofotómetro a 560 nm.

*En las experiencias de medio NNN, se extrajo alícuotas de parásitos provenientes del cultivo y se sometió al conteo de los parásitos por el Método de Pizzi (1953) y Brener (1962). A fin de construir las curvas de crecimiento para cada experiencia de los medios.

2.5. Determinación del Tiempo Generacional (Tg).

Se calculó los tiempos generacionales (Tg) y las velocidades de crecimiento en la fase exponencial de cada curva de crecimiento de las diferentes cepas, en medio LIT y NNN.

Haciendo uso de la expresión matemática:

$$N_t = N_0 \times 2^{kt}$$

Ecuación fundamental del crecimiento expresada en forma exponencial.

Para calcular la velocidad de crecimiento (k) se aplicó el logaritmo (log):

$$\log N_t = \log N_0 + k \times t \log 2$$

$$k = \frac{\log N_t - \log N_0}{t \log 2}$$

El tiempo generacional (Tg) es el inverso de la velocidad de crecimiento:

$$T_g = 1/k$$

N_0 = Densidad óptica en un tiempo inicial.

N_t = Densidad óptica en un tiempo dado.

t = Tiempo que tarda la población para aumentar de N_0 a N_t .

k = Velocidad de crecimiento.

T_g = Tiempo generacional.

Se midió la competencia por medio de índices obtenidos de los cocientes entre los T_g de las experiencias y los T_g de los controles respectivos.

2.6. Observación al microscopio.

Se tomaron muestra de las diversas fases de la infección y del crecimiento, provenientes de los medios de cultivo; para el estudio del comportamiento y morfología del parásito. Los frotis se fijaron con alcohol metílico y se colorearon con Giemsa en PBS (Buffer Fosfato de Sörensen, diluido al 10 % (v/v) durante un tiempo específico); lavando con agua corriente y dejando secar.

Posteriormente se examinó al microscopio.

2.7. Parasitemia.

Se utilizaron ratones albinos machos de un mes de nacidos; en los cuales se inocularon , por via intraperitoneal los trypomastigotes provenientes de los diferentes cultivos en fase estacionaria. Se tomaron muestras de sangre periférica, a cada ratón, al cortarle la punta de la cola a los tres días post - infección. Las muestras obtenidas fueron examinadas entre lámina y laminilla, para verificar la presencia de parásitos; aquellos ratones que resultaron negativos, se les realizó la prueba de xenodiagnóstico.

2.8. Infectividad en *Rhodnius prolixus*.

La infectividad en el vector se determinó alimentando ninfas del III estadio de *R.prolixus*, colocadas en frascos cubiertos con una malla de tul, sobre ratones infectados con las diferentes formas de *T.cruzi*, aislado 106 y *T.rangeli*. Las deyecciones de los insectos se examinaron 30 días después de la alimentación.

Para el estudio hemolinfático se procedió a cortar el tarso de una de las patas del insecto, dejando caer una gota sobre un portaobjeto.

Las glándulas salivales fueron obtenidas por desprendimiento de la cabeza de la primera porción torácica. Todas estas preparaciones fueron observadas al microscopio.

2.9. Cortes Histológicos.

Durante la fase crónica de la infección se sacrificaron los ratones inoculados con cada cepa de parásitos, extrayendo corazón, músculo esquelético e hígado, fijándolos en fórmol al 10 % durante de 48 h, para investigar la parasitosis tisular.

2.10. Montaje de los fajardines modificados.

Los microorganismos seleccionados que comprenden las diferentes cepas *T. cruzi*, *T. rangeli*, *aislado 106* , se colocaron en recipientes diseñados para estudiar la competencia, que consisten de dos fajardines modificados que se unen por un extremo y separados en esta unión por una membrana permeable a los nutrientes (0,22 micras), la cual se adhirió a dos empacaduras previamente pegadas al extremo de cada uno de los dos fajardines modificados, formando un sistema hermético que impide la entrada de contaminantes y el derrame de contenido. En el otro extremo posee un tubo de ensayo para la lectura en el espectrofotómetro. Además presenta en cada fajardin una boquilla lateral para suministrar el medio y los parásitos (Figura 1).

Antes de su uso, los fajardines modificados son esterilizados en autoclave por 35 min a 15 libras de presión.

2.11. Grupo control.

En las experiencias realizadas para estudiar la competencia, a través de la medición del crecimiento *in vitro* para *Trypanosoma sp.* en los medios LIT y NNN; los controles se establecieron colocando a ambos lados de los fajardines modificados el mismo parásito o cepa.

3. RESULTADOS

3.1. Cultivo “in vitro” de *Trypanosoma* en medio LIT (Control).

El cultivo “in vitro” (en medio LIT) de *Trypanosoma* sp. correspondientes a las curvas controles de parásitos en competencia de la cepa “Y”, “EP” y el aislado 106 crecidas en los fajardines modificados (Figura 1), nos permite observar en el Gráfico N° 1, representado por la cepa “Y”; el crecimiento simultáneo de Y_I y Y_{II} en donde ambas curvas desde su inicio exhiben un crecimiento muy parecido, alcanzando un máximo de densidad óptica de 1,5 a los 15 días de iniciada la experiencia (Tabla 1).

Para la cepa “EP” representada en el Gráfico 1 las curvas de crecimiento en competencia control muestran un comportamiento similar entre EP_I y EP_{II} , alcanzando una lectura máxima de densidad óptica de 1,5 a los 12 días aproximadamente post inoculación.

Por otra parte, el aislado 106 identificado en el Gráfico 1, nos permite observar curvas controles de parásitos en competencia similares para 106_I y 106_{II} , alcanzando un máximo de densidad óptica 1,5 a los 15 días aproximadamente de iniciada la experiencia.

Se extrajeron muestras de cultivo de ambos lados de los fajardines modificados y se observaron al microscopio encontrando al comienzo del crecimiento formas epimastigotes, con un movimiento viable. Cuando alcanza D.O de 0,7 se observan parásitos en constante división; apareciendo posteriormente formas trypomastigotes.

3.2. Cultivo “in vitro” de *Trypanosoma* sp. Cepa vs. Cepa (Medio LIT).

El crecimiento de parásitos en competencia de *Trypanosoma* sp. Cepa “Y” vs. Cepa “EP” representado en el Gráfico 2 muestra diferencias en sus puntos de partida, es decir, una D.O de 0,02 para “Y” y una D.O de 0,05 para “EP” a un tiempo inicial. Luego mantiene un comportamiento paralelo entre ambas cepas hasta llegar a interseptarse el día 10 a una D.O de 0,7 aproximadamente y posteriormente varía su comportamiento alcanzando un máximo de D.O de 1,2 para “Y” y una D.O de 0,80 para “EP” a los 16 días de iniciada la experiencia (Tabla 1).

Los resultados para la Cepa “Y” vs. aislado 106, presentes en el Gráfico 2 muestra un comportamiento similar para ambas curvas, manteniéndose el aislado 106 por debajo del

crecimiento de la Cepa “Y” alcanzando un máximo de D.O de 1,2 para la Cepa “Y” y una D.O de 0,75 para el aislado 106 a los 16 días después de la infección.

Las curvas de crecimiento de parásito en competencia “in vitro” para Cepas “EP” vs. aislado 106 muestra un inicio en común, seguido de un comportamiento muy parecido para ambas curvas; sin embargo, el crecimiento del aislado 106 es relativamente menor que el crecimiento de la Cepa “EP”. Alcanzando una D.O de 0,59 para el aislado 106 y D.O de 0,85 para la Cepa “EP” a los 16 días de inoculación.

3.3. Curvas Control de parásitos en competencia “in vitro” de *Trypanosoma* sp. (Medio NNN).

El crecimiento de parásitos en competencia para las cepas “Y”, “EP”, aislado 106 y *Trypanosoma rangeli* (Controles) crecidos en los fajardines modificados en medio NNN; muestra en el Gráfico 3 representado por la cepa “Y” cuya curva de crecimiento ha sido obtenida por el número de parásitos haciendo uso del método Pizzi (1953) y Brener (1962).

El crecimiento es simultáneo para Y_I y Y_{II} , con un máximo de 45×10^6 tryp/ml a los 7 días, seguido de una caída en su crecimiento hasta llegar de 17 a 20×10^6 tryp/ml a los 9 días a partir de su inóculo.

En el Gráfico 3 se observa la Cepa “EP” cuyas curvas de crecimiento en competencia son iguales para EP_I y EP_{II} comenzando desde su inóculo inicial hasta presentar un pico máximo de 49×10^6 tryp/ml a los 7 días y posteriormente una caída hasta 39×10^6 tryp/ml a los 9 días (Tabla 2).

Para el aislado 106, presentado en el Gráfico 9, cuyo comportamiento es similar entre 106_I y 106_{II} durante el crecimiento en competencia; observándose de igual manera que las cepas anteriores un pico máximo de 49×10^6 tryp/ml a los 7 días hasta descender a 22 a 25×10^6 tryp/ml a los 9 días de su inicio (Tabla 2).

Siguiendo con las curvas control de parásitos relacionadas al Gráfico 10, muestra a *T. rangeli* con un crecimiento lineal para r_I hasta llegar a un máximo de $5,2 \times 10^6$ tryp/ml a los 9 días de inoculado. Para r_{II} es prácticamente simultáneo con respecto a r_I a diferencia de un leve descenso a partir del día 7 hasta llegar a $3,6 \times 10^6$ tryp/ml a los 9 días.

3.4. Curvas de Crecimiento de parásitos en competencia “in vitro” de *Trypanosoma* sp. vs. *Trypanosoma rangeli* (Medio NNN).

El Gráfico 5, representado por el crecimiento en competencia “Y vs. *rangeli*”, se observa una diferencia drástica en el crecimiento para ambos *Trypanosomas*. La Cepa “Y” con una curva en ascenso hasta alcanzar un máximo de 21×10^6 tryp/ml a los 7 días y posterior caída con 13×10^6 tryp/ml a los 9 días. Sin embargo, para *T. rangeli* se mantiene prácticamente lineal con un leve ascenso a los 9 días con 3×10^6 tryp/ml post inóculo (Tabla2).

De igual manera en el Gráfico 5 “EP vs. *rangeli*”, las cuales mantienen comportamiento muy diferenciados. Para la cepa “EP” alcanza un máximo de 20×10^6 tryp/ml a los 7 días, manteniéndose constante, por otro lado, *T. rangeli* con muy poco crecimiento y un pequeño máximo alcanzado con $2,7 \times 10^6$ tryp/ml desde su inóculo inicial.

El Gráfico 5, representado por las curvas de crecimiento en competencia “aislado 106 vs. *rangeli*” nos muestra, un comportamiento muy parecido al del Gráfico 12. El aislado 106 cuya curva de crecimiento alcanza un pico máximo con 18×10^6 tryp/ml y posterior descenso a los 9 días con $9,8 \times 10^6$ tryp/ml y *T. rangeli* con un comportamiento lineal y un pico máximo a los 7 días con 3×10^6 tryp/ml representando posteriormente un leve descenso.

3.5. Determinación del Tiempo Generacional (Tg) y Velocidad de Crecimiento (k) para las diferentes experiencias.

La velocidad de crecimiento (k) que expresa la pendiente de la curva y el inverso de k, que constituye el tiempo generacional (Tg); pueden observarse en la Tabla 3 : Haciendo uso de dos pendientes para calcular dos tiempos generacionales. Estos valores nos permitirán diferenciar como ha sido el comportamiento durante el crecimiento en el tiempo.

En esta tabla los controles en medio LIT correspondiente a las diferentes cepas de *T. cruzi* y el aislado 106, nos muestra Tg muy similares (al menos para una de las dos pendientes) y con sus velocidades de crecimiento aproximadas, para cada uno de los fajardines modificados en estudio.

Para la Tabla 4: Correspondiente al crecimiento en competencia de *Trypanosoma* sp.(Cepa vs. Cepa) en medio LIT, los tiempos generacionales para la cepa “Y vs. EP” fueron

de 47,6 y 30,3 horas para la cepa “Y” y 47,6 y 30,3 horas para la cepa “EP” resultaron identico.

En cambio existe gran diferencia para los expresados en la “Cepa Y vs. aislado 106” cuyos tiempos generacionales son de 25,6 y 40,0 horas para la cepa “Y” y 62,5 y 47,6 horas correspondiente al aislado 106, implicando tiempos generacionales altos para este último.

También se observan en la representación de “Cepa EP vs. aislado 106” diferencia en los tiempos generacionales correspondientes a la cepa “EP” de 31,3 y 34,4 horas y de 28,5 y 47,6 horas para el aislado 106 con Tg más bajos para la cepa “EP”.

La Tabla 5: Correspondiente a los controles en medio NNN representados por *T. cruzi* “Y”, “EP”, aislado 106 y *T. rangeli*; cuyos tiempos generacionales fueron muy parecidos, a excepción de *T. rangeli* cuyo tiempo generacional de 76,9 y 62,5 horas para r_I y de 90,9 y 52,6 horas para r_{II} , cuyos tiempos generacionales altos, respecto a los anteriores.

Para la Tabla 6: Presentan los tiempos generacionales (Tg) y velocidad de crecimiento para *Trypanosoma* sp. vs. *T. rangeli* en medio NNN correspondiente a la cepa “Y vs. *T. rangeli*” en donde los tiempos generacionales de 27,7 y 30,3 horas para la cepa “Y” y de 142,8 horas para *T. rangeli*, el cual implica un tiempo generacional más alto que la cepa “Y”.

Para la cepa “EP vs. *T. rangeli*” en donde los tiempos generacionales de (26,3 y 37,0) horas para la cepa “EP” y 125,0 horas para *T. rangeli*; esto implica un tiempo generacional mayor para el *T. rangeli*.

En el crecimiento en competencia correspondiente al “aislado 106 vs. *T. rangeli*”, cuyos tiempos generacionales de 31,3 y 40,6 horas para el aislado 106 y de 66,6 y 38,4 horas para *T. rangeli*, observándose un tiempo generacional más alto que para el aislado 106.

3.6. Parasitemia.

La parasitemia en ratones albinos que han sido inoculados con parásitos provenientes de fajardines modificados conteniendo los respectivos medios LIT y NNN; presentaron en general parasitemias bajas (impidiendo la cuantificación de parásitos por el método Pizzi (1953), Brener (1962).

En la Tabla 7: Se puede observar la infectividad en ratones albinos de las formas de *T. cruzi* “Y”, “EP” y aislado 106, cuyos resultados positivos, nos permiten presenciar las formas observadas al microscopio al tomar muestras de sangre periférica a cada ratón; identificando

trypanosomas finos los cuales disminuyen progresivamente a medida que las formas gruesas se hacen presentes al final de la infección. En el caso del aislado 106 no se obtuvo parasitemia, sino negativa, en los exámenes de sangre.

Para la Tabla 8: Correspondiente a la infectividad en ratones albinos de las formas *T. cruzi* “Y”, “EP” y aislado 106. (Cepa vs. Cepa). Se observa como es la parasitemia en animales que han sido inoculados con los medios provenientes de fajardines modificados con cepas diferentes y trypanosomas distintos. Resultando parasitemias positivas para los ratones inoculados con Cepas “Y vs. EP”, presentando formas de trypomastigotes finos y trypomastigotes gruesos.

Para la Cepa (Y vs. aislado 106) y Cepa (EP vs. aislado 106) se observan parasitemias positivas, aunque relativamente bajas, presencia de trypomastigotes finos y gruesos para las cepas “Y” y “EP”; por el contrario ausencia de parasitemias en animales que han sido inoculados con parásitos del aislado 106.

Observándose mayor tiempo de sobrevivencia de los ratones infectados.

Para la Tabla 9: Nos muestra la infectividad en ratones de las diferentes cepas “Y”, “EP”, aislado 106 y *T. rangeli*. Controles en medio NNN.

La infectividad de las formas trypomastigotes delgados para *T. cruzi* cepas “Y” y “EP” en ratones albinos predominando al comienzo de la parasitemia seguida de las formas gruesas que comienzan a aumentar coincidiendo con la desaparición de las formas delgadas. El aislado 106 y *T. rangeli* no presentaron parasitemia en ninguno de los ratones inoculados.

La Tabla 10: Representa la infectividad en ratones albinos de las formas *Trypanosoma* sp. vs. *T. rangeli* en medio NNN.

La parasitemia en ratones inoculados con *T. cruzi* Cepa “Y vs. *T. rangeli*” y Cepa “EP vs. *T. rangeli*” se evidenció infecciones patentes al observar exámenes al fresco en ratones inoculados con las cepas “Y” y “EP”, no así, para *T. rangeli* y el aislado 106, cuyas muestras de sangre tomadas de los ratones inoculados intraperitonealmente fueron negativos.

3.7. Infectividad en deyecciones de *R. prolixus*.

Se observa infectividad en ninfas del III estadio de *R. prolixus* alimentadas con sangre de ratones albinos infectados con las diferentes formas de *T. cruzi* “Y”, “EP” y aislado 106. Controles representados en la Tabla 11; así como, la Tabla 12; correspondiente a la

infectividad en chipos de las formas *Trypanosoma* sp. Cepa vs. Cepa en medio LIT. En las cuales se visualiza a los 15 y 60 días luego de la infección la presencia de parásitos en las muestras de heces del aislado y las cepas, observándose formas epimastigotes (en su mayoría) y trypomastigotes.

Lo mismo sucede para las Tablas 13: representada por la infectividad en *R. prolixus* de las formas “Y”, “EP”, aislado 106 y *T. rangeli*. Controles en medio NNN y la Tabla 14: Infectividad de las formas de *Trypanosoma* sp. vs. *T. rangeli*.

En donde las cepas de *T. cruzi* y el aislado 106 resultaron negativos para las muestras de glándulas salivales y hemolinfa, pero positivas en muestras de heces. Para *T. rangeli*, contrariamente a lo que se esperaba, tanto en el control como para la relación “*Trypanosoma* sp. vs. *T. rangeli*” resultó negativo en heces, glándulas salivales y hemolinfa.

3.8. Parasitosis Tisular.

En los cortes histológicos de corazón y músculo esquelético los ratones inoculados con la cepa “Y” y “EP” de *T. cruzi* observaron pocos nidos de amastigotes, debido a la baja parasitemia presentada en los animales infectados. Con el aislado 106 y *T. rangeli* no evidenciaron parásitos en los tejidos.

Los cortes de hígado y bazo fueron negativos en los grupos experimentales.

Para el análisis de los resultados representados en las Tablas 1 y 2 colocamos las curvas de crecimiento *in vitro* de los parásitos en competencia, en un mismo gráfico, junto con las curvas de sus respectivos controles, con la finalidad de observar las diferencias entre ellos.

En los Gráficos N° 6 (a, b c) se puede observar, las curvas controles cepa Y (vs. Y) con las curvas de crecimiento en competencia Y (vs. EP) y Y (vs. 106) perteneciente al Gráfico 6ª en donde se observa un crecimiento para estas curvas más bajo que el control, a partir de inóculos iniciales diferentes. Presentando el mismo comportamiento el Gráfico 6b.

Así mismo, el control 106 (vs. 106) cuando se compara con las curvas 106 (vs. Y) y 106 (vs. EP) en el gráfico N° 6c, presentaron cierto paralelismo a partir del día 10 aproximadamente y variaciones en los puntos de inicio de cada curva (a excepción de los controles). Para los Gráficos N° 7 (a, b, c y d), las curvas controles de *T. rangeli* representadas

por r (vs. r) cuyo crecimiento es superior que las curvas de parásitos en competencia r (vs. 106), r (vs. EP) y r (vs. Y) en medio NNN, Gráfico N° 7^a, presenta una posible inhibición del crecimiento con relación al control, desde el inóculo inicial hasta el quinto día; a partir del cual se observa un aumento.

En el Gráfico N° 7b, las curvas controles EP (vs. EP) con un crecimiento muy similar a la curva EP (vs. *rangeli*) hasta el quinto día aproximadamente, luego se mantiene muy por debajo del crecimiento de las curvas controles.

Lo mismo ocurre para los Gráficos N° 7c y 7d, cuyos controles se mantienen muy por encima de las curvas que han sido expuestas a las diferentes experiencias en medio NNN.

www.bdigital.ula.ve

DISCUSIÓN

El crecimiento en competencia *in vitro* de las cepas de *T. cruzi*, aislado 106 y *T. rangeli*, realizado en los diferentes medios de cultivo como son: LIT y NNN, nos permitió observar curvas muy similares para cada par de control, crecidos en fajardines diseñados para tal fin.

Para hacer un mejor análisis se hace uso del tiempo generacional (Tg) como uno de los parámetros de las curvas de crecimiento (Tablas N° 3, 4, 5 y 6). Midiendo la competencia por medio de índices obtenidos de los cocientes entre los Tg de las experiencias y los Tg de los controles respectivos. Obteniéndose así, las Tablas N° 15, 16, 17 y 18.

En las cepas de *T. cruzi* no se encontró competencia, como era de esperarse, el índice de competencia (Ic) fue de 1. }Mientras que el Ic respecto a otros Tripanosomas sometidos a las experiencias de crecimiento en los fajardines modificados mostró un índice de competencia de $2 \geq$, esto nos indica que en las experiencias que demuestran este valor se produjo el fenómeno de competencia. En los medios de cultivo de LIT se observaron formas epimastigotes y trypomastigotes de *T. sp.* 106 y *T. rangeli*; mientras que en el medio NNN los epimastigotes resultaron de mayor longitud para *T. rangeli*. La morfología observada en las cepas de *T. cruzi* y *T. rangeli* son semejantes a las descritas por Brener (1973) y Pifano (1954).

La parasitemia observada por las cepas *T. cruzi* fueron semejantes a las descritas por Pérez (1993), encontrando al inicio de la infección formas delgadas y un predominio de formas gruesas al final. En las experiencias realizadas con parásitos diferentes, presentan mayormente bajas parasitemias producto de una infección tardía, las cuales pueden en algunos casos desaparecer; al infectar animales con formas en su mayoría epimastigotes Pérez (1993).

Ausencia de parasitemia para *T. rangeli* como para el aislado 106 resultando negativos los exámenes de sangre periférica y permaneciendo vivos los ratones infectados; así como lo indican los resultados de Marín (1976). El aislado presentó formas epimastigotes en las heces, no así, en glándulas salivales y hemolinfa. Por otro lado *T. rangeli* no presentó parásito en heces, hemolinfa ni glándulas salivales permaneciendo estos insectos vivos, debido a la baja o ausencia de parasitemia presentada en ratones albinos que al alimentar ninfas del III estadio no

son capaces de infectar al vector *T. cruzi* es considerado no patógeno al hospedador invertebrado, pero sí al vertebrado.

En nuestro trabajo se observa invasión de ciertos órganos como son corazón y músculo esquelético con presencia de formas amastigotas, como lo describe Brener (1973).

El diseño experimental tuvo como base la utilización de los denominados “Fajardines modificados” cuyo funcionamiento debemos perfeccionar. Se deben hacer nuevas experiencias y así clarificar aún más el problema; sometiendo a mayores pruebas el índice de competencia (Ic) que usamos en esta experiencia para comprobar su validez.

www.bdigital.ula.ve

CONCLUSIONES

- La pendiente de la curva, y por ende el tiempo generacional (T_g), puede usarse como un criterio para diferenciar “cepas” usando medios y condiciones previamente establecidas.
- Se obtuvo un índice de competencia (I_c), que permite medir la competencia entre cepas de trypanosomas de la misma especie y especies diferentes.
- No se encontró competencia entre las cepas de *T.cruzi* presentando un I_c de 1 ó aproximadamente 1.
- Encontramos ciertas diferencias entre la cepa 'EP' de *T. cruzi* y el aislado I06 con un $I_c > 1$ en 3 ó 4 decimas.
- En *T.rangeli* se produjo competencia con respecto a otros trypanosomas obteniendo valores de $I_c > 2$.
- Basándonos en los valores de I_c , se puede demostrar que *T.cruzi* y *T. rangeli* difieren en sus nichos. Así como sucede en la naturaleza, *T. cruzi* lo encontramos en la región posterior del tubo digestivo e intestino y *T.rangeli* en el intestino medio, hemolínfa y glándulas salivales durante el ciclo en el vector triatómino..
- Realizar mejoras en el aparato empleado para este trabajo (Fajardines modificados) que permita un manejo más sencillo para la elaboración de experiencias posteriores, e investigar otra membrana no atacable por los hongos.

Discusión

El crecimiento en competencia *in vitro* de las cepas de *T.cruzi*, *aislado 106* y *T.rangeli* realizado en los diferentes medios de cultivo como son: Lit y NNN, permitió observar curvas muy similares para cada par de control, crecido en fajardines diseñados para tal fin.

Para las cepas de *T.cruzi* no se encontró competencia el índice de competencia (Ic) fue de 1. En cambio, los Ic respecto a tripanosomas diferentes sometidos a las experiencias de crecimiento mostró un índice de competencia mayores a 1, esto nos indica que se produjo el fenómeno de competencia. (tablas 15,16,17 y 18)

Al aplicar este índice de competencia podemos observar que *T.cruzi* con respecto a *T.rangeli* presentan valores de 4 y 5 veces mayor, significando que ambas especies disminuyen sus velocidades de crecimiento al estar juntas compitiendo sin excluirse ó que existe una compensación entre ambas. Para el Ic de *T.cruzi* cepa “Y” con relación al *aislado 106* presentan competencia en menor grado que la observada para *T.rangeli*. En el caso del *aislado 106* y *T.cruzi* cepa “EP” cuyos Ic son menores a 1,5 nos dice que son especies diferentes.

Así mismo, en la naturaleza *T.cruzi* y *T.rangeli* se encuentra en diferentes hábitat en el insecto vector, pero ambos tripanosomas pueden coexistir en el intestino sin afectarse.

El *aislado 106* presenta un comportamiento muy similar a *T.cruzi* durante el crecimiento en competencia en medio de cultivo y se asemeja a *T.rangeli* con relación a la ausencia de parasitemia en ratones; coincidiendo con los resultados reportados por Martín (1996). Los insectos que recibieron el *aislado 106* presentaron epimastigotes en heces, no así, en glándulas salivales. Por otro lado en *T.rangeli* no se observaron parásitos en heces, hemolinfa ni glándulas salivales permaneciendo estos insectos vivos; debido a la ausencia de parasitemia en los ratones.

Los hallazgos de parásitos en corazón y músculos esquelético coinciden con los observados por Brener (1973).

Por ultimo consideramos que la metodología utilizando “fajardines modificados” resultó satisfactorio; Aun cuando debe ser perfeccionado para un mejor manejo.

Así mismo, el índice de competencia (Ic) debe ser sometido a mejores pruebas y así poder ser usado para la diferenciación de especies.

www.bdigital.ula.ve

