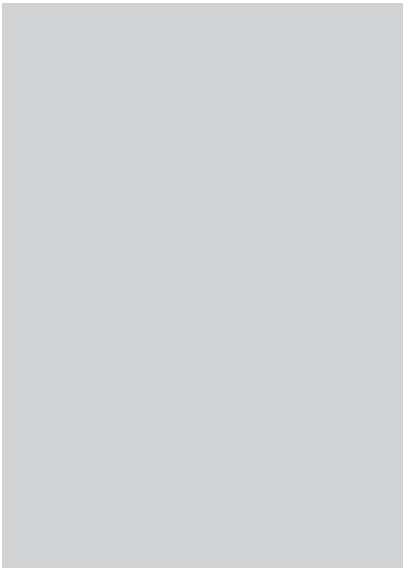




Boletín

de Malariología
y Salud Ambiental

Ministerio de Salud



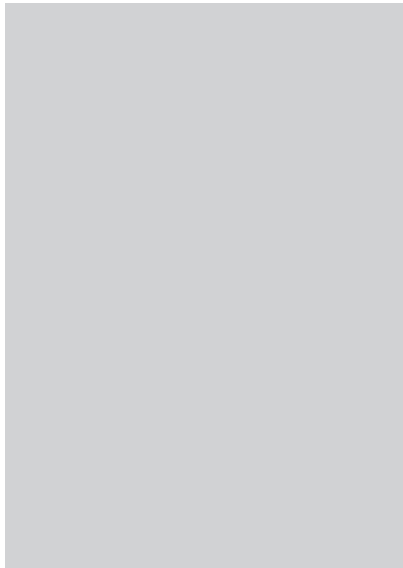
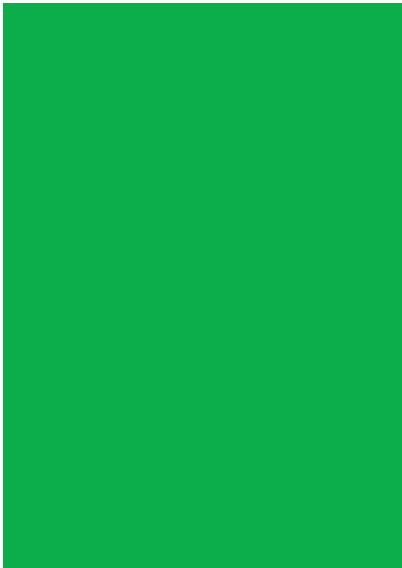
Ciencias

Físicas

Biológicas

Sociales

Vol. XLVI, N° 2, 2006



ISSN: 1690 - 4648
Depósito Legal: pp-200303AR314



Maracay - Aragua - Venezuela

BOLETÍN DE MALARIOLOGÍA Y SALUD AMBIENTAL

Vol. XLVI, N° 2, AGOSTO-DICIEMBRE, 2006

ISSN: 1690 - 4648 - DEPÓSITO LEGAL pp- 200303AR314

(antes Boletín de Malariología y Saneamiento Ambiental)

MINISTERIO DE SALUD

FRANCISCO ARMADA
MINISTRO

VICEMINISTERIO DE SALUD

JOSÉ MENDOZA
VICEMINISTRO

**DIRECCIÓN GENERAL
DE SALUD AMBIENTAL**

JESÚS TORO
DIRECTOR

**DIRECCIÓN GENERAL
DE CONTRALORÍA SANITARIA**

ERNESTO PERDOMO
DIRECTOR

**SERVICIO AUTÓNOMO
INSTITUTO DE ALTOS ESTUDIOS
“DR. ARNOLDO GABALDON”**

FERNANDO COLMENARES BOTTARO
DIRECTOR

Editores

José Vicente Scorza
M. Dora Feliciangeli

**Directora (E) de
Gestión de Información**
Wuilman Gómez

Secretaría Técnica
Wuilman Gómez

Diseño y Diagramación
Oswaldo Flores S.

Comité Editorial
Francisco Armada
Rafael Cásares
Rafael Borges
Oscar Feo
Oscar Noya
Omar Verde

Comité Honorario

José R. Coura
Philippe Desjeux
Oswaldo Forattini
Felipe Guhl
Santiago Mas Coma
Carlos Ponce
Christopher Schofield
Rodrigo Zeledón

Comité Asesor

Roberto Briceño León
Milady Guevara de Sequeda
Marcelo Mazzarri
Marcos Rondón
Yasmín Rubio-Palis

Para suscripciones: **publpeiaesp@yahoo.com**
Apartado de Correos N° 2171. Maracay 2101. Estado Aragua, Venezuela.

Revista indizada en **BIREME**, **GLOBAL HEALTH**, **LATINDEX** y **LILACS**, y registrada en **ASEREME**.

Publicada por el Servicio Autónomo Instituto de Altos Estudios “Dr. Arnoldo Gabaldon”, ubicado en el antiguo edificio de Malariología, Av. Bermúdez Sur, Maracay, Estado Aragua, Venezuela.

Esta revista está editada on line en la dirección: **www.iaesp.edu.ve**

Boletín de Malariología y Salud Ambiental

Vol. XLVI, N° 2

Maracay, Aragua, Venezuela

Agosto - Diciembre, 2006

CONTENIDO

REVISIONES

- Impacto de la biología molecular, genómica y proteómica en el estudio de los Kinetoplastida
Impact of molecular biology, genomics and proteomics in the study of Kinetoplastida
José Luis Ramírez.....93
- Revisión de la subfamilia Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) en Cuba
Review of the Triatominae subfamily (Hemiptera: Reduviidae) in Cuba
Yenin Hernández González & Raúl González Broche.....107

ARTÍCULOS ORIGINALES

- Una nueva especie de *Culicoides* originaria de Venezuela (Diptera: Ceratopogonidae)
A new species of Culicoides (Diptera: Ceratopogonidae) from Venezuela
Gustavo Perruolo.....115
- Acción patógena de una cepa venezolana de *Beauveria bassiana* para *Musca domestica*
(Diptera: Muscidae)
Pathogenic action of a Venezuelan strain of Beauveria bassiana on Musca domestica
(Diptera: Muscidae)
José V. Scorza-Dagert & Luis J. Cova O.119
- Control temporal de moscas caseras (*Musca domestica*) en galpones avícolas
mediante nebulizaciones con conidias de *Beauveria bassiana*
Temporal control of house flies (Musca domestica) in poultry sheds fogged with spores of
Beauveria bassiana
Luis J. Cova O. & José V. Scorza-Dagert131
- Presencia de *Trypanosoma cruzi* en tejidos de ratas Wistar infectadas experimentalmente
y sus fetos
Presence of Trypanosoma cruzi in tissues of experimentally infected Wistar rats and their fetuses
Maritza Alarcón, Ana Lugo de Yarbuh, Elio A. Moreno, Gilberto Payares,
Sonia Araujo & Melisa Colmenares137

Investigaciones sobre la transmisión vertical de *Trypanosoma cruzi* en ratas Wistar crónicamente infectadas

Research on vertical transmission of Trypanosoma cruzi in chronically infected Wistar rats

Elio A. Moreno, Arelis C. Quintero, Marítza E. Alarcón, Ana Lugo de Yarbuh, Stelliana C. Moreno, Sonia Araujo A. & Rafael Borges149

Evaluación de factores de reproducción para detectar posible contaminación genética en cepas consanguíneas de ratones

Evaluation of reproductive parameters for genetic contamination in mouse strains inbred

Rosa De Jesús & Elizabeth Torres161

Diagnóstico del sistema de recolección de desechos generados en el Hospital Ruiz y Páez, Ciudad Bolívar, estado Bolívar, Venezuela

Diagnosis of the medical waste management in the Hospital Ruiz y Páez, Bolívar state, Venezuela

Glacelidys Rodríguez, Neil Mago & Víctor Mora Arellano169

REVISTA DE REVISTAS.....181

REVISIÓN

Impacto de la biología molecular, genómica y proteómica en el estudio de los Kinetoplastida

José Luis Ramírez*

En este trabajo se presenta una visión de la evolución de la biología molecular en el estudio de la biología de los Kinetoplastida, orden de protozoarios que incluye especies patógenas al hombre, plantas y animales. El ensayo está centrado en los nuevos desarrollos generados a partir de los proyectos genoma de *Leishmania major*, *Trypanosoma cruzi* y *Trypanosoma brucei*, identificando aquellos puntos en donde se puede derivar información para luchar contra estos parásitos. Se discuten además las tendencias que predominarán en la parasitología moderna como son las aproximaciones sistémicas a la relación parásito-hospedador, tratando de desviar nuestra atención de la superficie de los parásitos en donde estos disponen de sistemas altamente evolucionados o surfomas que resultan difícil de atacar.

Palabras claves: genoma, proteómica, aproximaciones sistémicas, interacción parásito- hospedador.

INTRODUCCIÓN

Desde hace mas de 30 años se han venido aplicando las herramientas de la biología molecular en el estudio de protozoarios patógenos del Orden Kinetoplastida. En los primeros tiempos estos estudios estaban centrados en el análisis de ADN (o material genético) tanto nucleares como extra-cromosomales. Así se logró determinar que la mayoría de estos organismos presentan peculiaridades en la organización de sus genomas tales como la ausencia de condensación cromosomal durante los procesos mitóticos y genomas extra-cromosomales con organizaciones caprichosas como el kinetoplasto. Con el tiempo se logró clonar y producir in vitro un gran número de proteínas del metabolismo central y de la superficie de estos parásitos y se identificaron

secuencias repetidas que han brindado información sobre la heterogeneidad poblacional de los mismos. En 1984 se introdujo la técnica de electroforesis en campo eléctrico pulsado (Pulse Field Electrophoresis) (Schwartz & Cantor, 1984) la cual permitió visualizar por primera vez las bandas cromosomales de muchos protozoarios. En 1985 se incorpora la poderosa herramienta de la reacción en cadena de polimerasa o PCR (Saiki, *et al.*, 1985), como método de detección de agentes infecciosos en muestras biológicas. Mas recientemente se ha completado el secuenciamiento los genomas de tres tripanosomatidos patógenos, y se ha iniciado la era de estudios postgenómicos que incluyen: la genómica, la proteómica, el interactoma, el metaboloma y la biología de sistemas.

En esta breve revisión discutiré cada tecnología empleada, su evolución e impacto en las enfermedades causadas por estos protozoarios. La revisión no es exhaustiva sino didáctica y dirigida a trabajadores de la salud no especialistas en ciencias básicas.

He diseñado gráficos para las tecnologías menos convencionales, pasando por alto a aquellas que ya son de uso común en muchos laboratorios.

Centro de Biotecnología, Instituto de Estudios Avanzados Ministerio de Ciencia y Tecnología e Instituto de Biología Experimental, Facultad de Ciencias, UCV - Caracas, Venezuela.

Dirección postal Apartado 47525, Los Chaguaramos, Caracas 1041

*Autor de correspondencia: ramjose Luis@gmail.com

Las tecnologías mas usadas

Los primeros ensayos usando el material genético de protozoarios patógenos se remontan a los años 70 cuando se aplicaron técnicas de gradientes de flotación en cloruro de cesio que permitían determinar la composición de bases y contenido de ADN. Era común entonces, siguiendo estudios seminales en bacterias, el tratar de establecer correlaciones entre cantidad de ADN, contenido de bases y estatus taxonómico (Chance *et al.*, 1971). Para la misma época se examinaba el material genético de parásitos mediante técnicas de microscopia electrónica (Simpson & Da Silva, 1981) y electroforésis en geles. Aunque todos estos estudios tuvieron una utilidad práctica limitada, ayudaron a cimentar las bases para estudios posteriores. De estos tiempos han quedado conocimientos como: la gran variabilidad en contenido de ADN por genoma, aún dentro de miembros de una misma especie (Lanar *et al.*, 1978), la organización atípica de sus genomas mitocondriales con dos tipos de ADN circulares (Simpson & Da Silva, 1981) uno mayor o maxi-círculo el cual codifica para la mayoría de las proteínas y ARNs de origen mitocondrial, y otro pequeño en la forma de miles de pequeños círculos concatenados o mini-círculos que codifican para ARNs llamados guías (ver mas abajo); la fragmentación de los ARN ribosomales (Villalba & Ramirez, 1982), la ubicación telomérica o subtelomérica de genes de contingencia en *Trypanosoma brucei* (Johnson & Borst 1986) y el clonamiento de muchos genes básicos.

Concomitante a la aplicación de estas tecnologías comenzaron a aparecer los estudios de RFLP (restriction fragment length polymorphisms) (Botstein *et al.*, 1980). Las enzimas de restricción descubiertas en el año 1972 (Meselson *et al.*, 1972) son endonucleasas bacterianas que tienen la propiedad de reconocer sitios específicos dentro del ADN, y a diferencia de otras enzimas que degradan ADN, producen patrones específicos en vez de digestiones al azar. Siguiendo la tendencia en los estudios poblacionales en otros organismos, se comenzó a utilizar esta herramienta para distinguir entre especies, clones y variantes. Aún hoy en día, los RFLPs son empleados en conjunción con PCR para detectar e identificar parásitos. Uno de los logros mas importantes de esta tecnología junto con el uso de isoenzimas (Tibayrenc *et al.*, 1991), fue la de revelar que la estructura poblacional en la mayoría de los

protozoarios patógenos era de naturaleza clonal con poca o ninguna recombinación de tipo sexual. En paralelo al desarrollo de los RFLPs, investigadores de varias partes del mundo lograron clonar un alto número de genes de superficie, con miras a una posible inmunoterapia o inmunoprevención, o genes del metabolismo central en la búsqueda de blancos quimioterapéuticos específicos.

Estudios sobre la expresión de genes (transcripción) en los Kinetoplastida han revelado características únicas en estos organismos, por ejemplo el proceso de transcripción es poco regulado a nivel primario ya que todos los genes (exceptuando los genes PARP y variantes de superficie en *T. brucei*) se expresan como largos ARN policistrónicos (Martínez-Calvillo *et al.*, 2003) (conteniendo la información para muchas proteínas), los cuales posteriormente son procesados mediante un mecanismo de trans-empalme que logra fragmentar el ARN policistrónico en mRNAs mensajeros maduros añadiéndole una señal de entrada al ribosoma y una cola de poli adeninas (poliA). En otras palabras, probablemente la regulación de la expresión genética se ejerce a nivel postranscripcional y postraduccional (después de ser sintetizadas las proteínas). A fines de los 80 (Feagin, *et al.*, 1988) se descubre en kinetoplastidos un proceso de edición de ARN circunscrito al genoma mitocondrial con el cual los mensajeros primarios producidos a partir del maxi-círculo son editados mediante la adición o delección de uracilos para producir el mensajero final que será traducido a proteínas. La plantilla que sirve de base al proceso de edición está en los ARN guía producidos a partir de los mini-círculos. Desde esta época y dado lo exclusivo de este proceso, se ha tratado de desarrollar drogas contra el mismo.

A partir de los años 90 se perfeccionaron los protocolos de transformación de Kinetoplastida, y se desarrollaron vectores para clonamiento y expresión de genes. Estos vectores permitieron avanzar hacia estudios de lo que hoy se llama genética en reverso o búsqueda de la importancia de un gen mediante: disrupción (knock-out o reemplazamiento) (Fig. 1A); neutralización de su expresión (por ARN interferencia, sentido y antisentido) (Fig. 1B y 1C) y mutagénesis sitio dirigida (aislando un gen, cambiando su secuencia in vitro y re-insertándolo de vuelta en el parásito). Sin embargo dentro de las tecnologías mas importantes como el ARNi (ARN interferencia) y

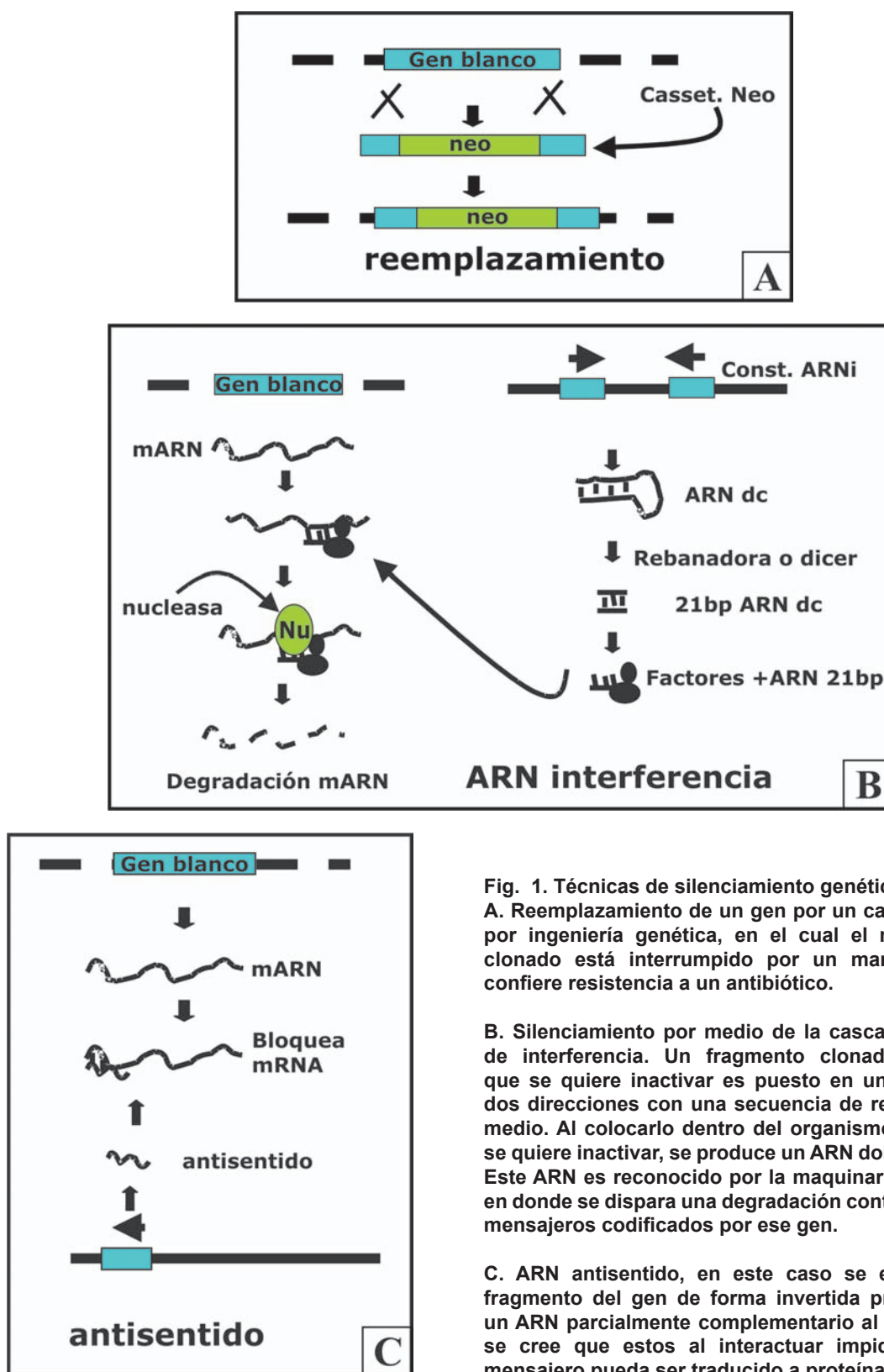


Fig. 1. Técnicas de silenciamiento genético.

A. Reemplazamiento de un gen por un casete hecho por ingeniería genética, en el cual el mismo gen clonado está interrumpido por un marcador que confiere resistencia a un antibiótico.

B. Silenciamiento por medio de la cascada de ARN de interferencia. Un fragmento clonado del gen que se quiere inactivar es puesto en un casete en dos direcciones con una secuencia de relleno en el medio. Al colocarlo dentro del organismo cuyo gen se quiere inactivar, se produce un ARN doble cadena. Este ARN es reconocido por la maquinaria de ARNi, en donde se dispara una degradación continua de los mensajeros codificados por ese gen.

C. ARN antisentido, en este caso se expresa un fragmento del gen de forma invertida produciendo un ARN parcialmente complementario al mensajero, se cree que estos al interactuar impiden que el mensajero pueda ser traducido a proteínas.

el ARN antisentido, nos encontramos con algunas sorpresas, la tecnología de ARNi solo opera en *T. brucei*, y no así en *Leishmania* o *Trypanosoma cruzi*, y el ARN antisentido se ha utilizado con éxito en *T. cruzi* y *T. brucei* pero no parece funcionar en *Leishmania*. Las explicaciones que se han dado para estas diferencias son parciales, en el caso de ARNi no funciona porque la maquinaria de procesamiento de esta ruta degradativa no existe en *Leishmania* y *T. cruzi*, mientras que sí existe en *T. brucei*. Para el ARN antisentido aún no se conoce la razón por la cual no ha funcionado en *Leishmania*.

La época de los genomas

Entre los días 14 y 15 de Abril de 1994 (Degraeve *et al.*, 1994) tuvo lugar una importante reunión en la Fundación Oswaldo Cruz (Fig. 2) destinada a coordinar varias iniciativas de secuenciación de los genomas de Kinetoplastida. En esta reunión se conciliaron las iniciativas del CYTED-D motorizada por un grupo de Latinoamericanos y Españoles, y las del National Institute of Health, el Instituto TIGR de los Estados Unidos, y el Sanger Center en el Reino Unido.

Al final de esta reunión fueron escogidos los genomas de *Leishmania major* Friedlin, *T. cruzi* CL Brener y *T. brucei*, para ser secuenciados. Las

estrategias asumidas para el genoma de *Leishmania* incluía transferir todos los marcadores genéticos que se habían mapeado (ubicar en los cromosomas del organismo) en las diferentes cepas o especies a *L. major*, y la tarea se ejecutó repartiendo un cierto número de cromosomas para cada uno de los centros participantes. Para *T. brucei* se decidió secuenciar solo los cromosomas mayores dejando a un lado los mini-cromosomas (pequeños cromosomas supernumerarios en donde residen copias extras de los genes de variantes de superficie). En el caso de *T. cruzi*, el cual contaba con menos recursos se optó por una estrategia de “salto de BACs” que consistía en secuenciar los extremos de los recombinantes obtenidos en cromosomas artificiales bacterianos (siglas en Inglés BAC), para luego tratar de ensamblar el genoma asumiendo una gran proximidad y un alto grado de sintenia (u orden lineal de los genes en los cromosomas) con *T. brucei* y *Leishmania*.

Los proyectos de *Leishmania* y *T. brucei* marcharon casi en paralelo, mientras que *T. cruzi* quedó rezagado hasta el año 2003 cuando el Instituto TIGR decidió aplicar una aproximación “Shot-gun” en la cual, a diferencia de la de secuenciar cromosoma por cromosoma, se fragmenta todo el ADN del parásito, se clonan estos fragmentos, se secuencian, y luego las computadoras se encargan de ensamblar todo el genoma.

Fig. 2. Fotografía de los investigadores participantes de la reunión preparatoria de la Red de Genoma de tripanosomatídeos. Fundación Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil del 14 al 15 de Abril 1994.



El día 15 de Julio del 2005 salieron publicados en el volumen 309 de la revista Science de ese año los resultados, en una primera lectura o borrador, de los tres genomas, siendo el resultado para *L. major* bien acabado y completo (Ivens *et al.*, 2005), en segundo lugar *T. brucei* (Berriman, *et al.*, 2005) al cual aún le faltan las secuencias de los minicromosomas, y finalmente *T. cruzi* (El-Sayed *et al.*, 2005) cuyas secuencias no pudieron ser organizadas en cromosomas individuales. El secuenciamiento del genoma de *T. cruzi* fue bastante difícil por: su alto contenido de ADN; presencia de un gran número de bandas cromosomales que no pueden ser bien resueltas por electroforesis PFG; alto contenido de secuencias repetidas que dificultan el ensamblaje in silico (mediante computadoras); y por último, pero no menos importante, la cepa CL Brener resultó ser un híbrido celular de dos linajes de *T. cruzi*, o también mal llamados haplotipos. Es decir en esta cepa coexisten dos genomas algo distintos los cuales no se han integrado.

Algunas de las conclusiones importantes de estos estudios son: i) el gran número de datos generados por los proyectos genoma permiten hacer un análisis global de todo el repertorio de proteínas de superficie, y en este sentido, las perspectivas para una vacuna para el mal de Chagas lucen remotas teniendo en cuenta que en *T. cruzi* se han descubierto nuevas y mas complejas familias de proteínas de superficie.; ii) se han revelado rutas únicas en la reparación del ADN, su replicación, y los procesos de segregación; iii) una ausencia de muchos de los receptores descritos para otras células eucarióticas; iv) una serie de fosfatasa y quinasas únicas que podrían servir como nuevo blancos quimioterapéuticos.

Para los países en vías de desarrollo los resultados de estos proyectos genomas proveen información de gran utilidad, por ejemplo en la actualidad para clonar cualquier gen o región del genoma solo basta con identificar la secuencia en las bases de datos, diseñar los cebadores o primers oligonucleotídicos alrededor de la secuencia, hacer su amplificación por PCR, e insertar el producto de amplificación en un plásmido vector. Las bases de datos también permiten hacer búsquedas focalizadas (datamining) de genes susceptibles a una droga en particular. En este sentido, es de suma importancia el preparar recursos humanos en bioinformática para llevar a cabo una investigación in silico la cual no solo

es barata, requiriendo computadoras y programas de libre acceso, sino que tiene un gran potencial.

Del genoma a las ómicas

Los proyectos genoma permitieron visualizar muchas características importantes de los Kinetoplastida, pero la gran cantidad de datos generados necesitaban ser examinados por tecnologías y programas de computación especiales. Esta aproximación usando técnicas de gran formato (en Inglés High Output) que permiten estudiar simultáneamente muchos genes o muchas proteínas es lo que da el nombre a las ómicas, en otras palabras en vez de estudiar gen por gen o producto por producto, se estudian todos en conjunto o cuerpo entero.

Genómica

La genómica es el estudio simultáneo de la expresión (o no) de todos los genes de un organismo en distintos estadios y condiciones. Tan pronto como comenzaron a salir las primeras secuencias completas de los proyectos genoma en el 2003, empezaron las primeras experiencias con las tecnologías de la genómica. El tipo de experimento mas común en genómica utiliza micromatrices, o también llamados microarreglos en los cuales se imprimen, mediante técnicas de microrrobótica, en un portaobjeto de vidrio todos los genes de un organismo, o los ADN copia producidos desde los mensajeros codificados por esos genes (Schena *et al.*, 1995). También se pueden arreglan puntos de proteínas o anticuerpos. El arreglo de estos puntos está registrado en la computadora, en donde también está almacenada la información de secuencia para cada punto. Un experimento típico de genómica, consiste en hibridar simultáneamente una micromatriz con los ADNc (sintetizados a partir de los ARN Mensajeros o ADN copia) de un estadio marcándolos previamente con un fluoróforo (rodamina), y los ADNc aislados de otro estadio marcados con verde CYBER. Luego de la hibridación, el microarreglo se lee en un lector láser que tiene varias longitudes de onda de excitación, y así podemos cuantificar la cantidad de un mensajero producido por un determinado gen, en un determinado estadio (Fig. 3).

En el caso de los Kinetoplastida este tipo de experimentación no ha dado buenos resultados, ya que como se ha mencionado anteriormente, los

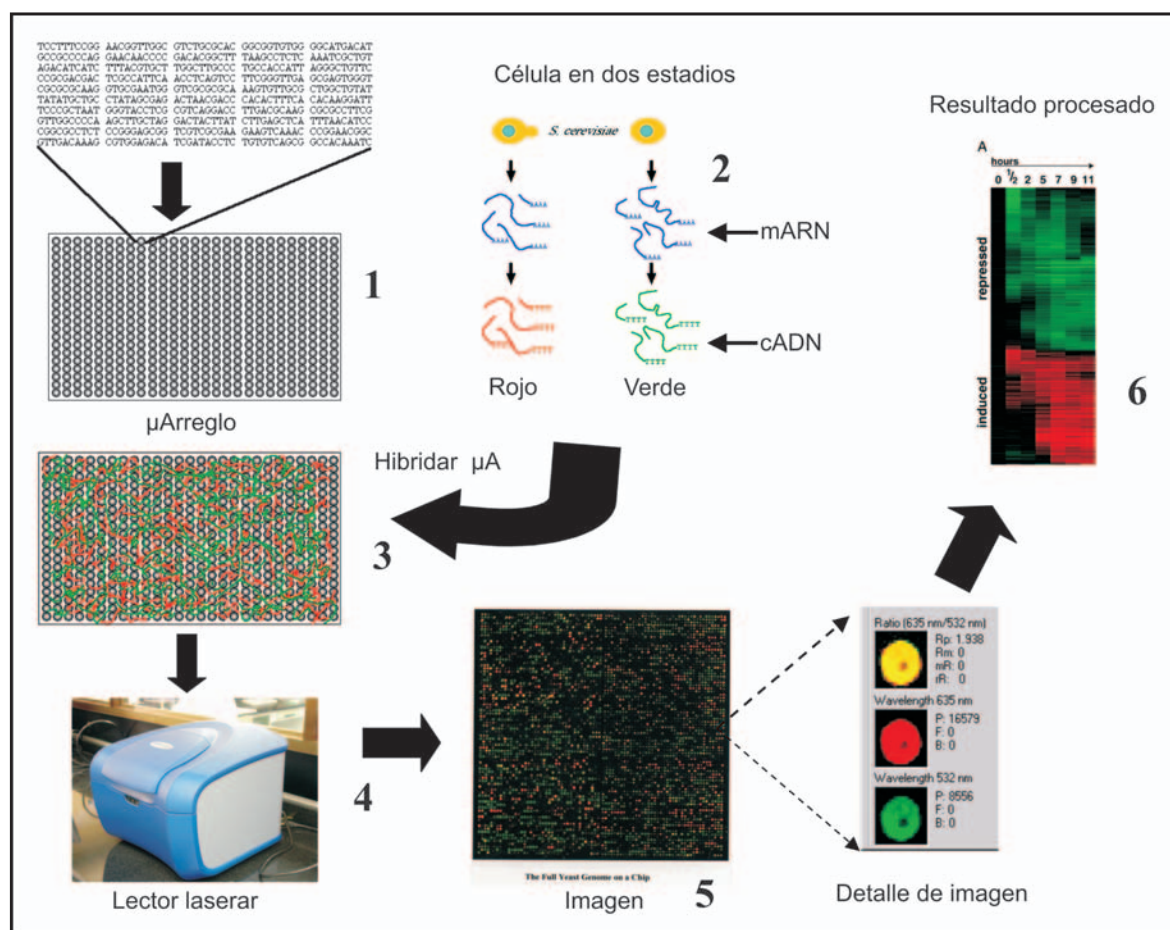


Fig. 3. Uso de Micromatrices en el estudio de la expresión génica: 1. Microarreglo de secuencias u oligonucleótidos de un organismo; 2. Preparación de ADN copia marcado con fluoróforos a partir de los ARN mensajeros de una célula en dos situaciones distintas; 3. Hibridación de los ADN copia a la micromatriz; 4. Lectura de la micromatriz hibridada con los ADN copia en un lector láser de varias longitudes de onda; 5. Conversión y agrupación de las señales en grupos de genes con igual nivel de expresión.

genes de un estadio son transcritos todos al mismo tiempo en largos mensajeros policistrónicos, de ahí que no se observen claramente en cuales genes sube o baja su expresión, y las diferencias entre estadios no han sido tan marcadas ni han conducido a ningún descubrimiento importante. Una alternativa que examina los productos post-transcripcionales es la de aislar polisomas (o ribosomas unidos a mensajeros) y hacer ADNc a partir de dichos mensajeros, así estaríamos estudiando mensajeros que han sido procesados (como se indicó arriba con su señal para el ribosoma y su cola de poliA) y que están

siendo activamente traducidos a proteínas. Usando esta aproximación Avila *et al.* (2003) han logrado observar diferencias estadio-específica importantes. El factor limitante para esta aproximación es la pequeñísima cantidad de mensajeros que se puede recuperar de las formas metacíclicas sanguíneas, y las formas amastigotas intracelulares, las cuales a su vez vienen contaminadas con los ARN mensajeros del hospedador vertebrado.

Existe otra modalidad de micromatrices en las cuales se sintetizan sobre un chip (un cristal

de germanio de aproximadamente 1 centímetro cuadrado) oligonucleótidos correspondientes a partes de los genes mediante un proceso de fotolitografía (www.affymetrix.com/) la detección se hace por vía electrónica. Sin bien las micromatrices no han sido de mucha utilidad en el estudio de la expresión génica en Kinetoplastida, prometen ser importantes instrumentos para el diagnóstico del futuro, de hecho ya existen técnicas y equipos aprobados por la FDA (Food and Drug Administration) de los Estados Unidos para detectar las distintas variantes alélicas de los genes de Citocromo P450 genes involucrado en la degradación de drogas. (http://www.rocche-diagnostics.com/media/pdf/presskit/final_technology_behind_cyp450.pdf).

Proteómica

Proteómica es el estudio a gran escala de las proteínas de una célula, particularmente sus estructuras y funciones. El término fue acuñado por analogía con la genómica, pero es mucho mas complicada que esta última. Mientras el genoma es una entidad mas bien constante, el proteoma difiere de célula a célula, y experimenta cambios a través de sus interacciones bioquímicas con el genoma y el ambiente. Así, un organismo tendrá un perfil de expresión de proteínas radicalmente diferente en diferentes partes de su cuerpo, en diferentes estadios del ciclo celular y bajo diferentes condiciones ambientales. Las técnicas de la proteómica se están aplicando ampliamente en Kinetoplastida.

La técnica mas utilizada en la proteómica es la electroforesis en dos dimensiones, separando mezclas de proteínas por tamaño molecular en la primera dimensión, y por carga en la segunda (Fig. 4). Las nuevas técnicas de 2D, como se abrevia esta tecnología, utilizan geles mas grandes con mayor poder de resolución, además de usar marcaje diferencial entre las proteínas que vienen de un estadio u otro o en presencia de una droga y su control. Los marcajes pueden hacerse con fluoróforos o con isótopos, los cuales son leídos y analizados por lectores especiales. La segunda tecnología de mas amplio uso es la espectrometría de masas acoplada a sistemas de ionización de péptidos producto de la digestión (Cristea *et al.*, 2004) de una proteína con proteasas específicas, y el análisis de estos péptidos, los cuales son ionizados y analizados hasta llegar a la determinación de su secuencia primaria. Con esta tecnología se están logrando identificar y validar la

mayoría de los genes putativos registrados en los proyectos genoma, permitiendo también identificar las distintas formas de una proteína que se producen luego de modificaciones post-traduccionales.

El interactoma

Recientemente se ha llegado a la conclusión que para poder entender como operan los sistemas complejos de los sistemas eucarióticos, no basta con conocer como se expresan los genes, o cuantas proteínas distintas se expresan bajo diferentes condiciones, si no que es necesario conocer como interactúan las proteínas entre si. Estas interacciones entre proteínas no son fáciles de predecir basándonos solamente en estructuras, modificaciones o secuencias. Por ejemplo a veces una proteína ejerce una influencia sobre otra no directamente sino a través de una tercera proteína. También una misma proteína interviene en procesos distintos asociándose con distintas proteínas.

Las tecnologías de uso mas frecuentemente para detectar interacciones entre proteínas son: i) cromatografía de afinidad en la cual se adhiere una proteína a una matriz insoluble, se hace pasar otra proteína y se determina si hay alguna asociación entre ellas por la retención de la segunda proteína; ii) técnicas de Resonancia Plasmón (nombre del aparato BIACORE, <http://www.biocore.com/lifesciences/index.html>), en las cuales la interacción entre proteínas se hace casi de la misma forma que en con cromatografía de afinidad, pero en este caso la proteína inmovilizada está adherida a un cristal, cuya parte posterior esta cubierta de oro. Un rayo láser que incide sobre la superficie del oro causa una onda llamada plasmón. Al pasar otra proteína que interactúa con la primera ocurren cambios en la onda plasmón que son detectadas por el instrumento de detección. Esta técnica es muy sensible y poderosa; iii) sistema de interacción dos híbridos (2H), esta prueba es de naturaleza genética y está basada en sistemas de expresión desarrollados para levaduras. En la misma un activador de la expresión génica (transcripción) ha sido dividido en dos partes. Para que este activador funcione se necesita que las dos partes estén juntas sobre la región promotora de un gen reportero. Las dos partes que han sido separadas se fusionan mediante técnicas de ADN recombinante a dos genes de proteínas que queremos probar. Cuando estas proteínas fusionadas son co-expresadas dentro de la célula de la levadura, si las partes fusionadas

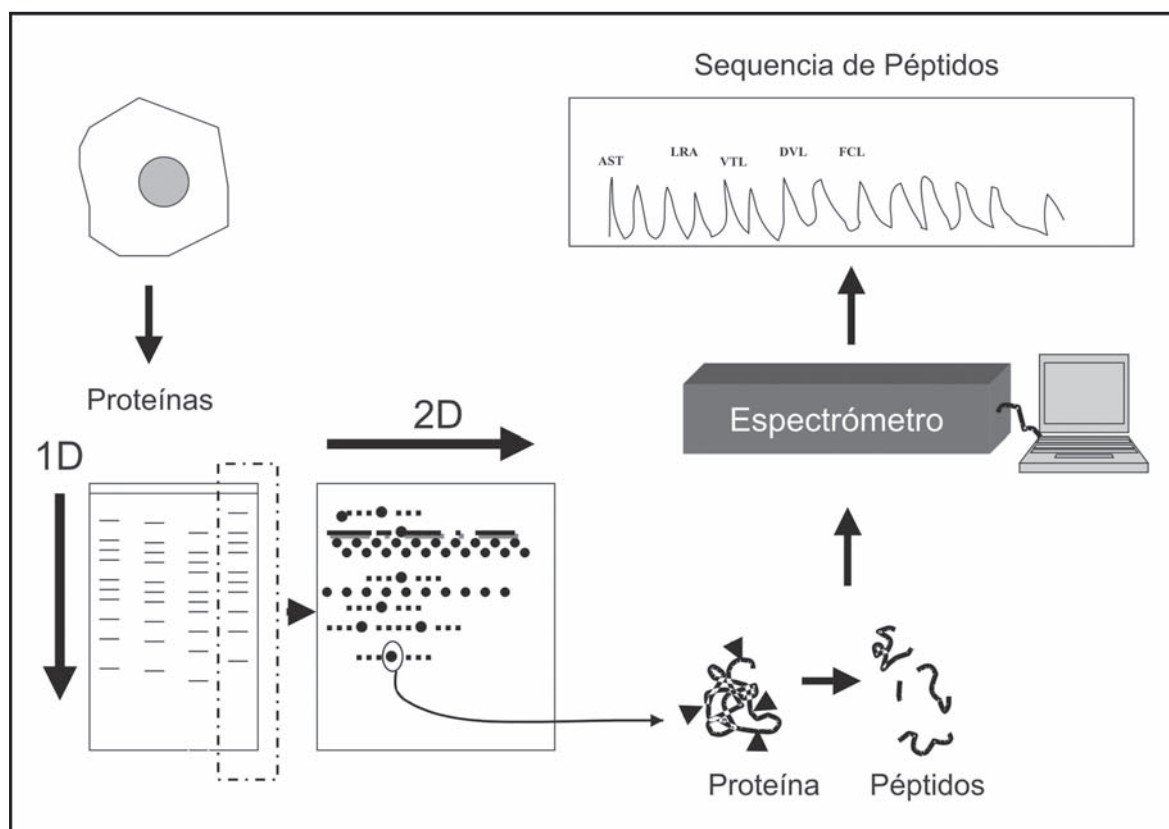


Fig. 4. Experimentos clásicos de proteómica. La mezcla de proteína se resuelve en una dimensión (por tamaño), luego se corta uno de los carriles y se corre en una segunda dimensión separando por carga. Los puntos de proteínas revelados por tinción pueden ser recuperados, digeridos con proteasas, y los péptidos producidos estudiados por espectrometría de masas hasta llegar a la secuencia de los mismos.

interactúan entre sí, se recompone el activador y se da la expresión del gen reportero acoplado a este activador (Fig. 5). Utilizando tecnología 2H se ha logrado hacer un primer borrador del interactoma de *Plasmodium falciparum* (La Count *et al.*, 2005) (Fig. 6); iv.) otra manera de descubrir interacciones múltiples entre proteínas es a través de la búsqueda bibliográfica masiva de artículos, a esto se le llama en Inglés “data mining” y para hacer este tipo de búsqueda existen varios programas de computación de libre acceso en la WWW (por ejemplo www.chilibot.net). Los resultados de los estudios de interactoma, nos permiten ver múltiples y novedosas interacciones que no son detectables por otras vías. Los resultados del interactoma son diagramas de redes complejas en las cuales se evidencian aquellas proteínas que son nodos importantes dentro de las redes. Este tipo de estudio puede ser de mucha importancia para

identificar blancos sobre los cuales deben diseñarse drogas o aproximaciones de regulación.

El metaboloma

Siguiendo las mismas pautas de las descripciones anteriores, en el caso del metaboloma se trata de descubrir a partir de los resultados de los proyectos genoma, del proteoma y el interactoma, aquellas relaciones entre genes y proteínas que tienen que ver con las rutas metabólicas de un organismo y las conexiones entre distintas rutas. Haciendo uso de importantes bases de datos públicas como la Kegg (<http://www.genome.ad.jp/kegg/pathway/map/map01100.html>), así como de programas de computación, puede llegarse a predecir nuevas rutas antes no detectadas, y determinar la ausencia de una enzima en una ruta metabólica. Estos estudios van

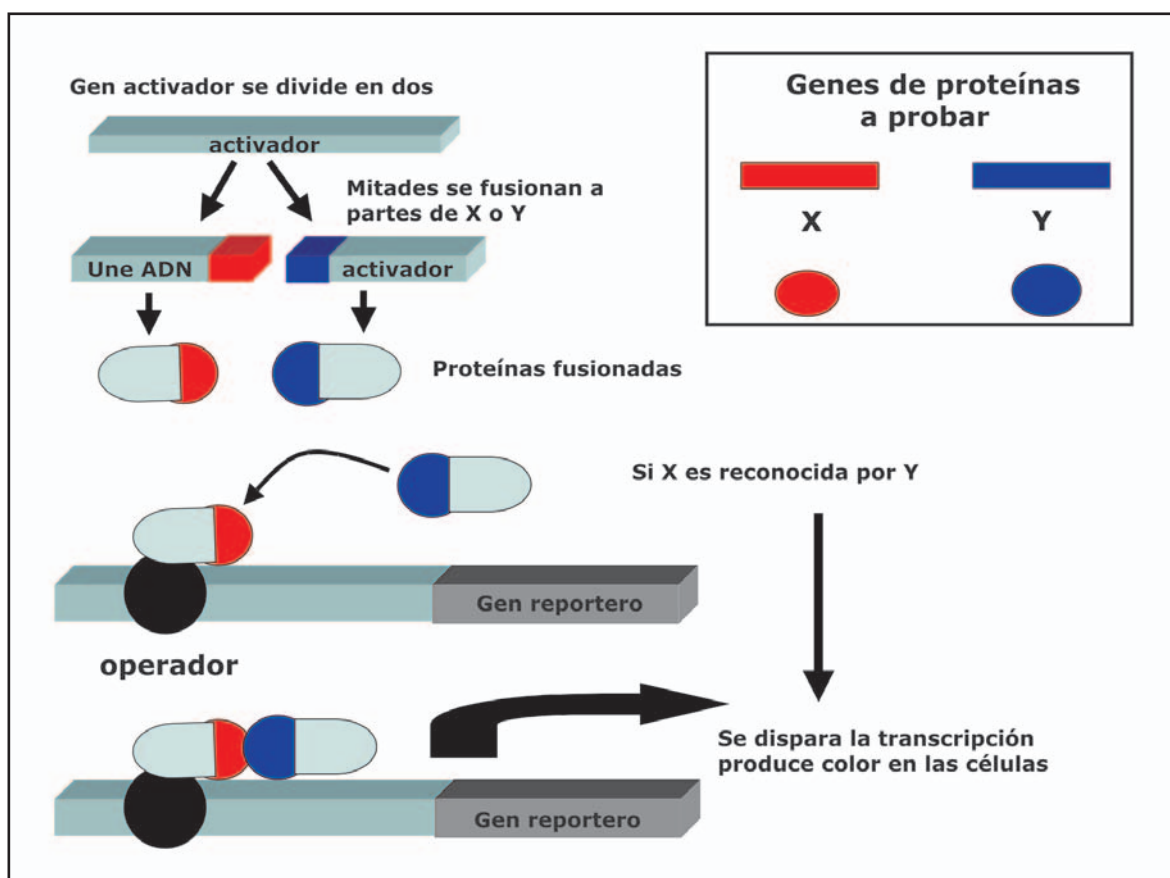


Fig. 5. Sistema de dos híbridos (2H) para estudiar interacciones entre proteínas. Los genes clonados correspondientes a dos proteínas que se quiere saber si interactúan entre si (X y Y) se fusionan con una parte de una proteína activadora que se une a un promotor de la transcripción de levadura. Para que ocurra la transcripción del gen reportero, es necesario que las dos proteínas (o partes de ellas) se reconozcan y ayuden así a reconstruir al activador, sobre la región operadora del gen. Usualmente se detecta esta interacción en la célula de levadura receptora por cambio de la coloración producida por el gen reportero.

acompañados de otros bioquímicos y estructurales. En Kinetoplastida se ha hecho un estudio comparativo de su metaboloma (Merriman *et al.*, 2005) en el mismo se confirman blancos quimioterapéuticos descritos en la era pre-genómica tales como: i) la síntesis de ergosterol en *Leishmania* y *T. cruzi*, ii) la ruta metabólica del tripanotión, iii) la ausencia de una ruta para sintetizar grupos hemo y iv) las enzimas de las vías glicolíticas. Pero aparecen nuevos y promisorios blancos como: i) los transportadores de hexosas fosfatos en *T. cruzi*; ii) la síntesis de aminoetilfosfonato, una alternativa al ancla GPI, exclusiva de *T. cruzi*. Aún es prematuro afirmar que la información del metaboloma de los Kinetoplastida proveerá una salida inmediata a la

quimioterapéutica de las enfermedades que ellos producen, pero los investigadores tienen en sus manos para estudiar alrededor del 50% de los genes putativos de los cuales aún no se les conoce ninguna función.

La biología de sistemas

Los métodos masivos de estudio usados en la actualidad hacen que la biología pase de ser una ciencia pobre en datos a una rica en ellos, tal como lo es la física. Por ello es necesario recurrir a nuevas aproximaciones integrales u holísticas para poder analizar esta enorme cantidad de información a fin de que se convierta en conocimiento útil.

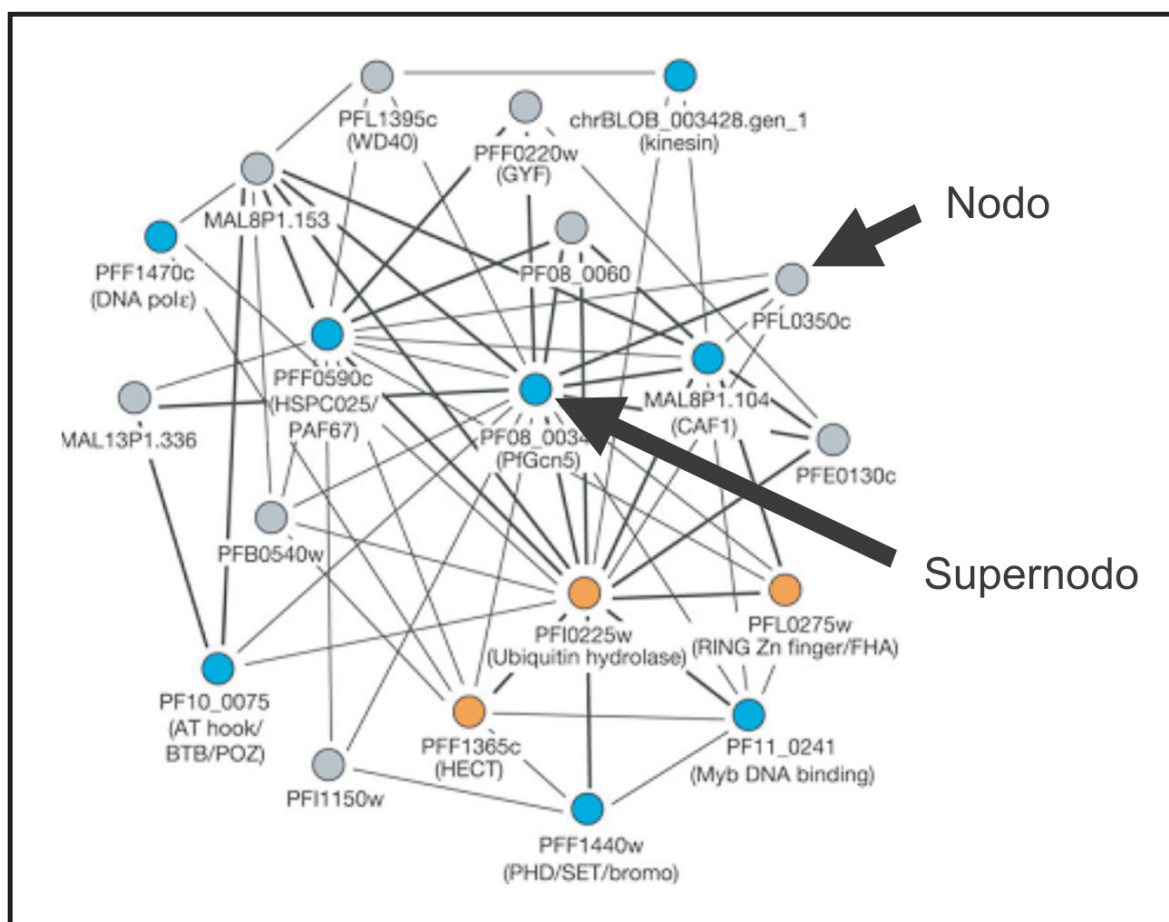


Fig. 6. Una red del interactoma de *Plasmodium falciparum* (La Count et al., 2005) correspondiente a genes que en su mayoría están asociados a remodelación de la cromatina, se indican los nodos muy bien conectados o Hubs y los nodos mas simples.

El área de la nueva biología que se encarga de desarrollar nuevos algoritmos y métodos de estudio para racionalizar y entender los datos generados por los distintos proyectos se le llama biología de sistemas o biología sistémica, término que fue acuñado en Inglés como “Systems Biology” (Kitano, 2001).

El conocimiento y manejo de sistemas complejos es familiar y común a los ingenieros, por ejemplo a aquellos que estudian y diseñan aeroplanos. Estos aparatos tienen muchos de los atributos de los sistemas biológicos tales como la de ser robustos, y la redundancia de funciones para alcanzar esta cualidad. La biología de sistemas nos permitirá abordar la relación parásito-hospedador en una forma integral, teniendo una visión no constreñida a ventanas de información que no se traducen a información útil o conocimiento.

Las distintas interacciones que se describen a partir de las ómicas pueden ser graficadas, como fue mencionado para el interactoma de *Plasmodium*, como conexiones entre un punto (nodos) (proteína o gen) y los demás (Fig. 6). La biología de sistemas analiza las estructuras de las redes para determinar su arquitectura organizándolas en redes o super-redes con distintos grados de jerarquía. También trata de descifrar las leyes que regulan su organización e identificar a los nodos mas ricos en conexiones, a los que se llaman Hubs o supernodos, estos supernodos constituyen puntos clave para la regulación de los sistemas biológicos, y por ello pueden ser de gran importancia para diseño de drogas, o como puntos de diagnóstico del funcionamiento de un determinado sistema. En el ejemplo del interactoma de *P. falciparum* una alternativa a la búsqueda de antígenos superficiales para desarrollo de vacunas,

sería la de atacar el super-nodo PfGcn5 que centra las actividades de remodelación de la cromatina de este parásito (Fig. 6). Si extrapolamos este mismo razonamiento a *T. cruzi*, los resultados del proyecto genoma revelan una complejidad en la organización, contenido, y composición de las proteínas de superficie que sugieren un sistema que podríamos llamar surfoma, en el cual se expresan de manera coordinada, dependiendo del estadio del ciclo celular y del ambiente, familias y subfamilias de genes cuya dinámica serían importante dilucidar. Este hecho nos lleva a pensar que al enfocarnos en la superficie de este parásito para tratar contrarrestarlo caemos en su juego de evasión, el cual es el producto de miles de años de evolución. Tal vez este tipo de investigaciones deberían de estar dirigidas hacia otros tantos blancos identificados y por identificar en el proyecto genoma.

CONCLUSIONES

Aunque aun resulta difícil medir el impacto de las tecnologías mas recientes en la lucha contra la *Leishmaniasis*, el mal de Chagas y la enfermedad del sueño, los proyectos genoma de sus agentes etiológicos han brindado un caudal de información que necesita ser sistematizado y aprovechado. En especial los países en vías de desarrollo deberíamos entrenar investigadores en como explotar y obtener información útil de estos proyectos los cuales son de dominio público. Por otro lado, el cúmulo de resultados también obliga a la aplicación de aproximaciones sistémicas para poder estudiar la complejidad de los datos, dando una visión biológica integral mas en consonancia con las complejas interacciones existentes en la relación parásito-hospedador. En algunos parásitos como *Plasmodium falciparum* (Gardner *et al.*, 2002) el ciclo de genomas interactuando se ha cerrado con la publicación del genoma humano; (Venter J.C. *et al.*, 2001), (Lander *et al.*, 2001) y el de *Anopheles gambiae* (Holt *et al.*, 2002), pero todavía no contamos con las herramientas bioinformáticas adecuadas para detectar a gran escala el diálogo genético que se establece entre el parásito y el organismo que lo alberga.

El abordaje sistémico nos lleva también a dejar de un lado el enfoque reduccionista de la biología molecular del siglo XX que nos permitía ver partes pero no el todo. El entender la dinámica

de las redes complejas de los componentes genéticos de estos parásitos, nos ayudarán a orientar nuestras investigaciones a la búsqueda de los puntos mas débiles de estas redes y así ejercer un control sobre ellos.

Impact of molecular biology, genomics and proteomics in the study of Kinetoplastida

SUMMARY

Kinetoplastida is an Order of Protozoa that includes important pathogens to humans, animals and plants. Here, a historical recounting of the impact of molecular biology on Kinetoplastida biology is made. This review is mainly focused on the new developments originated after the publication of the genome sequences of *Leishmania major*, *Trypanosoma cruzi*, and *Trypanosoma brucei*, emphasizing those subjects where useful information can be derived to fight these parasites. In addition, the new tendencies that may be relevant to parasitology in the near future are discussed, such as the application of systems biology to study the host-parasite interaction. Systemic considerations are made to direct the attention to new metabolic or genetic hubs, de-emphasizing the attack of the complex parasite system of surface proteins or surfome. This review is aimed to non-molecular biology specialists.

Key words: Parasite genome, proteomics, systemic approaches, host-parasite interaction

REFERENCIAS

- Avila A. R., Dallagiovanna B., Yamada-Ogatta S. F., Monteiro-Goes V., Fragoso S. P., Krieger M. A. & Goldenberg S. (2003). Stage-specific gene expression during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. *Genet. Mol. Res.* **31**: 159-68.
- Berriman M., Ghedin E., Hertz-Fowler C., Blandin G., Renauld H., Bartholomeu D. C. *et al.* (2005). The genome of the African trypanosome *Trypanosoma brucei*. *Science*. **309**: 416-435.
- Botstein D., White R. L., Skolnick M. & Davis R. W. (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.* **32**: 314-3.

- Chance M. L., Schnur L. F., Thomas S. C. & Peters W. (1971). The biochemical and serological taxonomy of *Leishmania* from the Aethiopian zoogeographical region of Africa. *J. Mol. Biol.* **56**: 443-473.
- Cristea I. M., Gaskell S. J. & Whetton A. D. (2004). Proteomics techniques and their application to haematology. *Blood*. **103**: 3624-3634.
- Degrave W., Levin M. J., Franco Da Silveira J. & Morel, C.M. (1994). Parasite Genome Projects and the *Trypanosoma cruzi* Genome Initiative. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. **92**: 859-862.
- El-Sayed N. M., Myler P. J., Bartholomeu D. C., Nilsson D., Aggarwal G., Tran A., *et al.* (2005). The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science*. **309**: 409-415.
- Feagin J. M., Abraham J. E. & Stuart K. (1988). Extensive editing of the cytochrome C oxidase III transcript in *Trypanosoma brucei*. *Cell*. **53**: 413-422.
- Gardner M. J., Hall N., Fung E., White O., Berriman M., Hyman R. W. *et al.* (2002). Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature*. **419**: 498-511.
- Holt R. A., Subramanian G. M., Halpern A., Sutton G. G., Charlab R., Nusskernet D. R. *et al.* (2002). The genome sequence of the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *Science*. **298**: 129-49.
- Ivens A. C., Peacock C. S., Worthey E. A., Murphy L., Aggarwal G., Berriman M. *et al.* (2005). The genome of the kinetoplastid parasite *Leishmania major*. *Science*. **309**: 436-442.
- Johnson P.J. & Borst P. (1986). Mapping of VSG genes on large expression-site chromosomes of *Trypanosoma brucei* separated by pulsed-field gradient electrophoresis. *Gene*. **43**: 213-220.
- Koza J. R., Myldlowec W., Lanza G., Yu J. & Keane M. A. (2001). *Automated reverse engineering of metabolic pathways from observed data by means of genetic programming*. 95-117. En: Foundations of Systems Biology. Ed. Kitano H. Primera edición. The MIT Press, USA y London, UK.
- LaCount D. J, Vignali M. , Chettier R., Phansalkar A., Bell R., Hesselberth J. R., *et al.* (2005). A protein interaction network of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature*. **438**: 103-107.
- Lanar D.E, Levy L.S & Manning J.E..(1978). Complexity and content of the DNA and RNA in *Trypanosoma cruzi*. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **72**: 533-42.
- Lander E., Linton L. M., Birren B., Nusbaum C., Zody M. C., Baldwin J. *et.al*, (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*. **409**: 860-921. .
- Martinez-Calvillo S., Yan S., Nguyen D., Fox M., Stuart K. & Myler P. J. (2003). Transcription of *Leishmania major* Friedlin chromosome 1 initiates in both directions within a single region. *Mol Cell*. **11**: 1291-1299.
- Meselson M., Yuan R. & Heywood J. (1972). Restriction and Modification of DNA. *Ann. Rev. Biochem.* **41**: 447-466.
- Saiki R. K., Scharf S., Faloona F., Mullis K. B., Horn G. T., Erlich H. A. & Arnheim N. (1985). Enzymatic Amplification of β -Globin Genomic Sequences and Restriction Site Analysis for Diagnosis of Sick Cell Anemia. *Science*. **230**: 1350-1354
- Schena M., Shalon D., Davis R. W. & Brown P. O. (1995). Quantitative Monitoring of Gene Expression Patterns with a Complementary DNA Microarray. *Science*. **270**: 467-470.
- Schwartz D. C. & Cantor C. R. (1984). Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell*. **37**: 67-75.
- Simpson L. & Da Silva A. (1981). Isolation and characterization of kinetoplast DNA from *Leishmania tarentolae*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **3**: 327- 41.
- Tibayrenc M., Kjellberg F. & Ayala F. J. (1991). The Clonal Theory of Parasitic Protozoa. *BioScience*. **41**: 767-774.

- Venter J. C., Adams M. D., Myers E. W., Li P. W., Mural R. J., Sutton G. G. *et al.* (2001). The sequence of the human genome The sequence of the human genome. *Science*. **291**: 1304-51.
- Villalba E. & Ramírez J. L.(1982). Ribosomal RNA of *Leishmania brasiliensis*: number of ribosomal copies and gene isolation. *J. Protozool.* **29**: 438-441.

Recibido el 14/07/2006
Aceptado el 08/08/2006

REVISIÓN

Revisión de la subfamilia Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) en Cuba Yenin Hernández González & Raúl González Broche

La subfamilia Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) agrupa a los vectores principales y potenciales de la Enfermedad de Chagas, presente en México, Centroamérica y Sudamérica, representando una grave amenaza para la salud de muchos países de la región. Con el objetivo de fomentar el estudio de estos insectos en nuestro país, se presenta una revisión bibliográfica sobre aspectos taxonómicos, biológicos, proceso de domesticación e importancia médica de los triatomíneos cubanos. Cuatro especies han sido reportadas hasta ahora en Cuba: *Bolboderia scabrosa*, *Triatoma rubrofasciata*, *Nesotriatoma flavida* y *Nesotriatoma bruneri*. En efecto, recientes estudios moleculares han revalidado el género *Nesotriatoma* Usinger 1944, representado en Cuba por las especies *N. flavida* y *N. bruneri*, las cuales se separan por características externas del cuerpo, morfología de las *genitalia* del macho y ADN mitocondrial. No existen evidencias del establecimiento de colonias de triatomíneos en las viviendas, ni reportes de *Trypanosoma cruzi* autóctono, por lo que el riesgo de transmisión vectorial es mínimo, aunque es de suma importancia la vigilancia clínica, serológica y sobre los posibles vectores.

Palabras claves: *Triatominae*, *Nesotriatoma flavida*, *Nesotriatoma bruneri*.

INTRODUCCIÓN

La subfamilia Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) comprende insectos hematófagos capaces de transmitir *Trypanosoma cruzi*, agente causal de la enfermedad de Chagas. Existen más de 130 especies de triatomíneos, de los cuales, solo 3 géneros agrupan a los vectores principales: *Triatoma*, *Rhodnius* y *Pastrongylus* (OMS, 2003). Sin embargo, más del 50% de las especies de esta subfamilia se han infectado natural o experimentalmente con el parásito, y debido a su comportamiento y fisiología similares, todas deben considerarse como vectores potenciales (Schofield, 1994).

En Cuba se encuentran 3 géneros y 4 especies: *Bolboderia scabrosa* Valdés, 1910, *Nesotriatoma flavida* (Neiva, 1911), *Nesotriatoma bruneri* Usinger, 1944 y *Triatoma rubrofasciata* (De Geer, 1773). Las tres primeras son endémicas y restringidas a

nuestro archipiélago (Usinger, 1944; Galvão *et al.*, 2003). *Bolboderia scabrosa* es considerada un “fósil viviente”, ya que se alimentaba de un perezoso que se extinguió en nuestro país, y sobrevivió adaptándose a un nuevo hospedero (Usinger, 1994; Alayo, 1967). Es poco abundante y endémica de Punta Maisí, se ha colectado en Guantánamo y Pinar del Río, en plantaciones de café y nidos de roedores (Alayo, 1967; Jiménez-Ozete, 1981; Llop *et al.*, 2001).

La primera especie de Triatominae que se describió fue *T. rubrofasciata*, identificada por De Geer en 1773, quien la nombró *Cimex rubrofasciatus*. En 1883, Laporte la designó especie tipo del género *Triatoma* y le dio el nombre actual (Galvão, 2003). Tiene una amplia área de dispersión en zonas de Asia, África y América, con origen en el antiguo continente (Alayo, 1967; Hernández-Pombo & Díaz-Canel, 1976). En nuestro país, se ha colectado en Santiago de Cuba y se supone que haya sido importada, pues se encontró cerca del puerto de dicha ciudad (Hernández-Pombo & Díaz-Canel, 1976).

Nesotriatoma flavida y *N. bruneri* fueron consideradas sinonimias desde 1946 hasta 1981, por lo que eran tratadas como una sola, *Triatoma flavida*.

Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri”. Autopista “Novia del Mediodía” Km 6. Apto postal 601. Marianao 13. Ciudad Habana, Cuba.

*Autor de correspondencia: yenin@ipk.sld.cu

Es por eso, que abordaremos su taxonomía de forma detallada. Jiménez y Fuentes (1981) se refieren a ella como la especie predominante de los triatomíneos cubanos, y ha sido colectada en lugares remotos y agrestes, en Pinar del Río, Topes de Collantes y Camagüey (Alayo, 1967).

En Cuba, se conoce de la existencia de estas especies y su importancia médica desde el inicio del siglo pasado. Sin embargo, las investigaciones realizadas se reducen a escasos trabajos sobre *N. flavida*, donde se abordan aspectos de su taxonomía, biología, distribución, epidemiología y cría en condiciones de laboratorio. Debido a la importancia que revisten las mismas y a la necesidad de tener un amplio conocimiento sobre ellas, nos propusimos revisar la información disponible sobre los triatomíneos cubanos, y brindarla como una reseña que permita incentivar su estudio.

TAXONOMÍA

Triatoma flavida fue hallada e identificada por Valdés en 1910 como *Rhodosia probixus* y corregido por el mismo autor en 1914, nombrándolo *Rhoduris prolixus* (Jiménez-Ozete, 1981; Carcavallo, et al., 1997). En 1911 fue descrita por Neiva como *Triatoma flavida*, basándose en ejemplares depositados en el Museo de Washington, probablemente colectados por Gundlach (Hoffman, 1938). La especie tipo de Neiva es un espécimen de pequeño tamaño y está depositado en el Museo Nacional de Historia Natural de Washington, Estados Unidos (Usinger, 1944).

En 1937 Bruner y Barber identificaron como *T. flavida* ejemplares de mayor tamaño colectados en dos provincias orientales. Posteriormente, examinaron una hembra muy pequeña procedente de Sierra Rangel (occidente), de 22 mm de largo, que no difería de las formas largas típicas del oriente del país (Usinger, 1944).

En 1944, Usinger describe un nuevo género, lo nombra *Nesotriatoma*, y en él coloca a *T. flavida*. Entre las características que definen este taxón, se encuentran: su gran tamaño, el cuerpo rugoso, disco del escutelo con un par de tubérculos en su base dirigidos hacia delante; mientras que, el género *Triatoma* agrupa especies más pequeñas, de aspecto mucho menos rugoso y disco del escutelo con una espina bien visible (Alayo, 1967).

En ese mismo año, a partir de los ejemplares de mayor tamaño procedentes de las zonas orientales del país, Usinger describe una nueva especie *Nesotriatoma bruneri*. Según la clave, los caracteres que la distinguen de *T. flavida* son el largo del primer segmento antenal, ancho de los ojos en relación a la distancia interocular y el desarrollo de las fosetas tibiales en las hembras. El holotipo hembra de *N. bruneri* se encuentra depositado en la Academia de Ciencias de California, Estados Unidos, y es un ejemplar de 28 mm de largo procedente de Camagüey.

En 1946, este autor estudia todos los ejemplares disponibles de *Nesotriatoma*, para determinar los límites de variación entre *N. bruneri* y *N. flavida*, y llega a la conclusión de que el tamaño de los ojos y el grado de desarrollo de las fosetas tibiales, son caracteres sin valor diagnóstico dentro de un grupo con cierta plasticidad. En una serie de 10 ejemplares procedentes de Camagüey, observó que el tamaño varió desde hembras largas del tipo *bruneri* hasta un macho de 22 mm de longitud, muy parecido al tipo *flavida*, lo que le permitió considerar a *Nesotriatoma bruneri* sinónimo de *Nesotriatoma flavida*.

Como habíamos visto, en 1981 *Nesotriatoma flavida* y *N. bruneri* vuelven a ser especies distintas, no solo por los caracteres de la morfología externa, sino por la comparación de las estructuras que conforman el falo: proceso del endosoma, vejiga, soporte del falosoma y proceso del gonoporo (Lent & Jurberg, 1981). Al separarlas, le dan el nombre genérico *Triatoma*, ya que el género *Nesotriatoma* no es reconocido por Lent & Wygodzinsky (1979), en la revisión que hacen de esta subfamilia.

Un estudio reciente basado en el análisis del ADN mitocondrial, apoya la decisión de Usinger (1946) de proponer para *flavida* y *bruneri* el nombre genérico *Nesotriatoma*, al cual pertenece además, *Nesotriatoma obscura* Maldonado y Farr, 1962 de Jamaica, conformando al grupo antillano que está bien caracterizado morfológicamente (Hypsa et al., 2002). A estas especies también se les conoce como complejo *N. flavida*, relacionado genéticamente con el género *Meccus* Stål, 1859 de México (Schofield, 2000; Galvão et al., 2003).

BIOLOGÍA

Ciclo de vida y hábitos

Los primeros estudios sobre la biología de *N. flavida* fueron realizados por Hoffman (1923, 1938) en la primera mitad del siglo XX, criándolos y alimentándolos con su propia sangre durante 15 años. Como resultado de sus investigaciones, llamó la atención sobre el peligro que representa que las ninfas succionen sangre del abdomen de otro individuo de su especie, ya que al vivir en nidos, un solo insecto infectado puede contaminar a toda la colonia.

Este autor reveló la probabilidad de que *N. flavida* se alimentara de roedores. En 1946, Usinger hace alusión a un planteamiento de Bruner sobre la jutía conga *Capromys pilorides* (Pallas), como el huésped nativo más probable de esta especie. Sin embargo, en la naturaleza solamente se ha comprobado su alimentación sobre cerdos (Jiménez-Ozete, 1981) y humanos.

Más tarde, en la década del 80 se observaron ejemplares de distintos estadios permitiendo conocer, que la temperatura influye en el período de incubación de los huevos, que fue de 28,67 días en invierno y 21,02 días en verano y se mantiene durante todo el año, siendo favorecido en verano. La ninfa I tiene una duración de 20-47 días y más, la ninfa II dura 38-49 días, ninfa III 49-83 días, ninfa IV 52-86 días, ninfa V 60-107 días. Todos los estadios ninfales son altamente viables (Jiménez-Ozete, 1981). También se realizó un estudio biométrico de las ninfas de esta especie, con el objetivo de obtener parámetros de talla y peso que aportaran datos a la biología de *N. flavida* (Jiménez-Ozete & Fuentes, 1981).

En otro estudio realizado en Venezuela, a partir de individuos obtenidos de una colonia de laboratorio, se midieron aspectos relacionados con la eclosión de los huevos, ciclo de vida, mortalidad y conducta de alimentación para cada estadio. El experimento se llevó a cabo en ausencia de competencia intraespecífica. El tiempo de desarrollo fue más largo que la mayoría de las especies de este género (230,4 días). El período de incubación de los huevos fue de 27,2 días en verano y 21 días en invierno. En otras especies de *Triatoma* fue de 17 a 29 días. También se obtuvo un patrón irregular de mortalidad que fue similar al observado en otras

especies. La menor mortalidad ocurre frecuentemente de IIIo a IVo, o de IVo a Vo estadio. La hembra pone una media de 283 huevos y su supervivencia fue de 201,8 días, y la de los machos fue de 344,8 días (Cabello & Lizano, 2001).

No existen trabajos que aborden la biología y hábitos de las otras especies que habitan en Cuba. Solo se conoce, que *B. scabrosa* no se alimenta de sangre humana (Fuentes *com. pers.*, 2005), sino de un roedor, probablemente la jutía *Capromys melanurus* (Usinger, 1946; Alayo, 1967). Con este insecto se realizaron intentos fallidos de criarlo en condiciones de laboratorio (Fuentes *com. pers.*, 2005).

Según reportes de la OMS (2003) *T. rubrofasciata* vive en las regiones costeras de todo el geotrópico, en íntima relación con la rata doméstica (*Rattus rattus*). Al parecer, no está asociada exclusivamente a mamíferos, puesto que se le halló en palomares y junto a lagartos, y a veces, asociada a animales silvestres encerrados en zoológicos (Llop *et al.*, 2001).

Proceso de domesticación

Los triatomíneos fueron originalmente silvestres, la mayoría son selváticos y están asociados a una amplia variedad de vertebrados huéspedes, otros se han ido adaptando gradualmente a la domesticidad humana, donde llegan a ser vectores de la enfermedad de Chagas (Schofield *et al.*, 1999; OMS, 2003). Este proceso puede ser considerado como una extensión de la ruta evolutiva, desde el depredador hasta el chupador de sangre del nido-vivienda, donde el hábitat doméstico representa simplemente un tipo particular de nido de invertebrado.

Los asentamientos y la colonización humana han cambiado el medio natural, en particular mediante una extensa deforestación. La respuesta de las poblaciones de triatomíneos a la escasez de fuentes alimentarias y abrigo natural fue la colonización de las viviendas humanas. Los factores que han llevado a este proceso de domesticación son: la naturaleza y calidad de los edificios, las condiciones de la vivienda, los hábitat domiciliarios y peridomésticos que crean microhábitat favorables y brindan protección contra los depredadores, el abundante suministro de sangre que proporcionan los seres humanos y la protección

que encuentra el vector en la superficie de las paredes de barro (OMS, 2003).

Algunas especies del género *Triatoma* son casi exclusivamente domésticas. Por consiguiente, los lugares que estos insectos escogen para vivir son las casas, gallineros, corrales de cabras, nidos, etcétera. Con respecto a las viviendas, elige aquellas que tengan las características favorecedoras de sus hábitos, refugiándose principalmente en las grietas de las paredes de barro u hormigón, las juntas entre los ladrillos de adobe, detrás de cuadros y adornos de pared, los espacios entre la leña o cañas, los tejados de hojas de palmera y los suelos de tierra (OMS, 2003).

En 1938 Hoffman planteó que *N. flavida* casi nunca se presenta en las viviendas y que todavía no se había domesticado como otras especies, en otros países. Según él este insecto vive en correspondencia a su costumbre natural y original, escondido en el campo, en las cuevas o en las palmas, chupando sangre de animales.

En la actualidad *N. flavida* vive en condiciones naturales en cuevas de animales silvestres, como ocurre en la península de Guanahacabibes, Pinar del Río. Sin embargo, en la misma provincia, pero en la región de Dimas, no habitan en cuevas y se encuentran en zonas de abundante vegetación. Durante la noche, son atraídos a las casas por la luz, aunque no se han encontrado evidencias del establecimiento de colonias en las mismas (Jiménez-Ozete, 1981).

Desde su descripción, se planteó que *N. bruneri* es típica de la zona de Oriente (Usinger, 1944), pero no existen reportes de su presencia en las viviendas, por lo que se hace necesario realizar nuevas colectas, sobre todo en el Oriente del país, para ver donde viven estos animales y de que se alimentan.

T. rubrofasciata se colectó en áreas cercanas al puerto de Santiago de Cuba, volando alrededor de las luces de la calle (Alayo, 1967; Hernández-Pombo & Diaz-Canel, 1976). También, se ha encontrado dentro de las casas en menor escala: en las paredes, pisos y debajo de los colchones de las camas; así como, volando en el exterior de las viviendas y al entrar en las mismas (Jiménez-Ozete, 1981). Actualmente, en otros países, este reduído puede considerarse como el único triatomineo estrictamente domiciliado (OMS, 2003). En nuestro país, no se han realizado estudios

sobre el proceso de domesticación. En la literatura consultada, solo existe una ubicación de las especies dentro de una clasificación según su hábitat, realizada por Lumsden (1979) (Jiménez-Ozete, 1981):

- Especies domésticas y selváticas: *T. rubrofasciata*.
- Especies selváticas con pequeñas colonias ocasionalmente encontradas en casas: no se han informado.
- Especies selváticas que presumiblemente son atraídas a las casas por la luz: *B. scabrosa* y *N. flavida*.

IMPORTANCIA MÉDICA

Los triatomineos son una subfamilia estrictamente hematófaga, capaces de chupar cantidades importantes de sangre, contribuyendo a la anemia crónica por carencia de hierro (Schofield, 1994). Sin embargo, su importancia principal viene dada por su capacidad de transmitir el parásito protozooario *Trypanosoma cruzi*. Las personas infectadas por este flagelado pueden padecer de lesiones cardíacas, gastrointestinales o neurológicas, aunque las manifestaciones de la enfermedad varían mucho de una zona endémica a otra. A pesar de que los programas de lucha contra esta dolencia, en varios países endémicos, han obtenido resultados notablemente positivos, en México, países andinos y centroamericanos, existen de 8 a 9 millones de personas infectadas y otros 25 siguen en riesgo de contraerla, lo cual destaca la necesidad de ampliar las estrategias de lucha contra la enfermedad (OMS, 2003).

Nesotriatoma flavida se puede alimentar del hombre y de los animales silvestres, causando daño directo por la succión de sangre y reacciones tóxicas por la inoculación de la saliva. Su picada no es dolorosa, aunque pueden producirse lesiones posteriores, de reacción alérgica inflamatoria locales, con enrojecimiento y prurito (Jiménez-Ozete, 1981).

Por otro lado, esta especie tiene características particulares que aumentan su peligrosidad como vector potencial, ya que sus hábitos alimentarios pudieran favorecer una rápida dispersión de la enfermedad, así como una brusca explosión de insectos infectados en la colonia. Además, el tiempo de deyección corto provoca un aumento de su eficiencia como vector potencial (Jiménez-Ozete,

1981), ya que el parásito es transmitido a través de las heces y defeca mientras se alimenta.

Desde 1909, a raíz del descubrimiento de la Tripanosomiasis Sudamericana o enfermedad de Chagas, Hoffman investigó si en Cuba existía esta enfermedad y sus vectores. En 1938 publica un trabajo donde plantea: "... con los *Triatomas* de mi cría, que mandé a varios institutos que están experimentando con los tripanosomas de la enfermedad de Chagas, se ha comprobado de forma indiscutible que *T. flavida* es efectivamente un transmisor de la enfermedad por tanto, si llegaran a Cuba los portadores de *Trypanosoma cruzi*, existe seguramente la posibilidad de una infección de los *Triatomas* del país."

Basado en lo planteado por Hoffman (1938) y por Romaña (1961), Hernández-Pombo afirmó en 1976 que tenemos en nuestro país, al menos, dos especies capaces de transmitir *Trypanosoma cruzi*, que son: *N. flavida* y *T. rubrofasciata* (Tabla I). Esta última, es un vector probado de este parásito (Carcavallo *et al.*, 1997) y al pertenecer al grupo que colonizan permanentemente las viviendas, marcadamente antroponómico, le concede una importancia epidemiológica primordial (OMS, 2003). Se desconoce si *B. scabrosa* y *N. bruneri* son capaces de transmitirlo.

Como parte de los estudios de Hoffman (1938), se encuentra el examen de las heces de sus ejemplares, sobre todo de los procedentes del campo, pero nunca encontró las formas flageladas de los tripanosomas. Posteriormente, Jiménez-Ozete (1981) colectó ejemplares de biotopos naturales y tomó muestras de heces, observándolas en gota fresca y en frotis con resultados negativos.

Cuba es considerada, junto a otras islas del Caribe, exenta de la enfermedad, no se conoce de *T.*

cruzi autóctono y los vectores detectados siempre han sido en muy baja densidad y vinculados a ecotopos silvestres. En este momento, se considera que el riesgo de transmisión vectorial es mínimo, pero la vigilancia clínica, serológica y sobre los vectores es siempre aconsejada (Schofield, 2000).

DISCUSIÓN

Desde la descripción de la primera especie de triatomineo hasta nuestros días, la clasificación de estos vectores se ha basado en el concepto morfológico tradicional, según el grado de similitud entre los organismos, por lo que las características fenotípicas fueron y continúan siendo las más utilizadas. Sin embargo, las especies más semejantes morfológicamente, no necesariamente son las más emparentadas (Galvão, 2003). La taxonomía de triatomíneos ganó una nueva herramienta, cuando las estructuras fállicas comenzaron a ser analizadas comparativamente, permitiendo la separación entre las especies (Carcavallo *et al.*, 1997).

Teniendo en cuenta que en 1946, Usinger señaló que el tamaño de los ojos y el grado de desarrollo de las fosetas tibiales carecen de valor diagnóstico para separar *N. flavida* de *N. bruneri*, recomendamos se estudien otros caracteres de su morfología externa, que permitan diferenciar sus poblaciones. Además, como parte de todo estudio taxonómico, debe realizarse el análisis de los genitales del macho, sobre todo, cuando existen especies muy parecidas o forman parte de un complejo, como es el caso que nos ocupa.

Los resultados de Hypsa (2002) constituyen la muestra de datos moleculares más representativa, que hizo resurgir la hipótesis del origen monofilético de los triatomíneos (Galvão, 2003). Consideramos

Tabla I. Infecciones de los triatomíneos cubanos por flagelados.

Triatomíneos cubanos	Infecciones		
	<i>Trypanosoma cruzi</i>	<i>Trypanosoma rangeli</i>	Otros
<i>N. flavida</i>	+ E	-	-
<i>N. bruneri</i>	-	-	- <i>Blastocrithidia</i> sp.
<i>B. scabrosa</i>	-	-	-
<i>T. rubrofasciata</i>	+ N	-	+ <i>Trypanosoma conorhini</i>

E: infección experimental; N: infección natural

Fuente: Carcavallo, *et al.*, (1997).

de suma importancia la reubicación de las especies del complejo *flavida* dentro del género *Nesotriatoma*, ya que están bien caracterizadas morfológicamente y corrobora la decisión de Usinger, quien describió dicho género y colocó a *T. flavida* dentro del mismo. Además, el análisis genético emplea un marcador muy utilizado en estudios taxonómicos y filogenéticos de insectos (Hernández, 1997).

Coincidimos con Jiménez-Ozete (1981) al plantear que *N. flavida* vive en condiciones naturales, en cuevas de la península de Guanahacabibes, Pinar del Río. Los ejemplares colectados en esa localidad, están depositados en la colección entomológica del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri" (IPK). Sin embargo, en la región de Dimas, Pinar del Río, su presencia en las viviendas fue algo ocasional, ya que se detectó posterior a la transformación del medio por el hombre, con fines agrícolas (Jiménez-Ozete, 1981), y en otras colectas no fueron encontrados. Esto debe tenerse en cuenta, porque en los países donde la enfermedad es endémica, las modificaciones medioambientales causadas por el hombre han originado la desaparición de los focos naturales, lo que ha propiciado la domiciliación de los triatomíneos, principal factor que aumenta el riesgo de transmisión de *Trypanosoma cruzi* (OMS, 2003).

Con respecto a *N. bruneri*, se colectó en Elia, Camagüey (Alayo, 1967), pero no se especifica si fue encontrado en condiciones naturales o en viviendas. Como esta especie era considerada sinonimia de *N. flavida*, se desconoce su hábitat, biología y ecología.

Es importante destacar, que en determinadas zonas de nuestro país, existen viviendas que reúnen las condiciones para que estos insectos se adapten, por lo que resulta de vital importancia determinar, si se mantienen en condiciones naturales o está ocurriendo su transición al hábitat doméstico, aspectos que deben ser objeto de futuras investigaciones.

Por otro lado, no podemos asegurar que *N. flavida* y *T. rubrofasciata* (Tabla I) transmitan *Trypanosoma cruzi* en nuestras condiciones. En el caso de *N. flavida* se reportó como una posibilidad, teniendo en cuenta resultados experimentales de 1930 (Hernández-Pombo & Díaz-Canel, 1976). Además, se desconoce si *N. bruneri* puede transmitirlo, tanto en condiciones experimentales como naturales. Razones que justifican la necesidad de estudiar a estos insectos

en relación con el parásito, debido al peligro que constituye el flujo de personas procedentes de áreas endémicas que visitan, estudian o residen en Cuba.

Review of the Triatominae subfamily (Hemiptera: Reduviidae) in Cuba

SUMMARY

The Triatominae subfamily (Hemiptera: Reduviidae) contains the principal and potential Chagas' disease vectors present in Mexico, Central America and South America and represents a serious threat for the public health of many countries of the region. With the aim of encouraging the study of these insects in our country, a bibliographical revision is presented about taxonomy, biology, domestication process, and medical importance of the Cuban triatomine. Four species of triatomine bugs have been so far reported in Cuba: *Bolboder scabrosa*, *Triatoma rubrofasciata*, *Nesotriatoma flavida* and *Nesotriatoma bruneri*. Recent molecular studies have revalidated the genus *Nesotriatoma* Usinger 1944, represented in Cuba by the species *N. flavida* and *N. bruneri*, which are separated by external characters of the body, the morphology of male genitalia and mitochondrial DNA. Evidence of the establishment of colonies of triatomine bugs does not exist in houses nor reports of autochthonous *Trypanosoma cruzi*, because of that the risk of vectorial transmission is low, although it is of supreme importance in clinical and serological surveillance and on possible vectors.

Key words: Triatominae, *Nesotriatoma flavida*, *Nesotriatoma bruneri*.

REFERENCIAS

- Alayo P. (1967). *Catálogo de la fauna de Cuba. Los Hemipteros de Cuba III. Familia Reduviidae*. Museo "Félix Poey" de la Academia de Ciencias de Cuba. Trabajos de Divulgación. No. 41.
- Cabello D. R. & Lizano E. (2001). Biology of *Triatoma flavida* Neiva, 1911 (Hemiptera: Reduviidae) under laboratory conditions. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. **96**: 879-881.
- Carcavallo R. U., Galíndez-Giron I., Jurberg J. & Lent H. (eds.), (1997). *Atlas of Chagas disease vectors in the Americas*. Vol. I. FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brasil.

- Galvão C. (2003). A sistemática dos triatomíneos (Hemiptera: Reduviidae), de De Geer ao DNA. *Entomol. Vect.* **10**: 511-530.
- Galvão C., Carcavallo R., Rocha D. S. & Jurberg J. (2003). A checklist of the current valid species of the subfamily Triatominae Jeannel, 1919 (Hemiptera: Reduviidae) and their geographical distribution, with nomenclatural and taxonomic notes. *Zootaxa*. **202**: 1-36.
- Hernández Y. (1997). Aplicación de las técnicas moleculares en la identificación de insectos. *Rev. Protección Veg.* **12**: 79-84.
- Hernández-Pombo L. & Diaz-Canel O. (1976). Triatomíneos capaces de transmitir *Trypanosoma cruzi* en Cuba. *Rev. Cubana Med. Trop.* **28**: 101-104.
- Hoffman W. H. (1923). Observaciones biológicas sobre la reduviida cubana llamada *Triatoma flavida*. Reimpreso de la *Rev. Med. & Cir. La Habana*. **35**: 299-305.
- Hoffman W. H. (1938). Experiencias biológicas sobre los *Triatomas* de Cuba. *Rev. Med. Trop. Parasitol.* **5**: 267-272.
- Hypsa V., Tietz D., Zrzavy J., Rego R. O., Galvão C. & Jurberg J. (2002). Phylogeny and biogeography of Triatominae (Hemiptera, Reduviidae): molecular evidence of a New World origin of the asiatic clade. *Mol. Phyl. Evol.* **23**: 447-457.
- Jiménez-Ozete H. (1981). Observaciones sobre la biología de *Triatoma flavida* Neiva, 1911 en Cuba. *Rev. Cub. Med. Trop.* **33**: 42-50.
- Jiménez-Ozete H. & Fuentes O. (1981). *Triatoma flavida* (Hemiptera, Reduviidae) I. Estudio biométrico de larvas. *Rev. Cub. Med. Trop.* **33**: 195-200.
- Lent H. & Jurberg J. (1981). As espécies insulares de Cuba do gênero *Triatoma* Laporte (Hemiptera, Reduviidae). *Rev. Brasil. Biol.* **41**: 431-439.
- Lent H. & Wygodzinsky P. (1979). Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae) and their significance as vectors of Chagas disease. *Bull. Am. Mus. Nat. Hist.* **163**: 125- 520.
- Llop A., Valdés-Dapena V. & Zuaso J. (2001). *Microbiología y Parasitología Médicas*. La Habana: Editorial Ciencias Médicas.
- OMS (2003). *Control de la Enfermedad de Chagas*. Serie de informes técnicos 905.
- Schofield C. J. (1994). *Triatominae, biología y control*. Eurocommunica Publications. West Sussex, U.K.
- Schofield C. J. (2000). Listado de mensajes del foro. Foro del 1er Simposio de Enfermedad de Chagas-FAC. [en línea] Disponible en: <<http://www.fac.org.ar/cvirtual/llave/chagas/so10.htm>>
- Schofield C. J., Diotaiuti L., Dujardin J. P. (1999). The process of domestication in Triatominae. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* [en línea] **94**, suppl. I: 375-378. Disponible en: <<http://www.dbbm.fiocruz.br/www-mem/94sup1/170ft.html>>
- Usinger R. L. (1944). The Triatominae of North America and the West Indies and their Public Health significance. *Pub. Health Bull.* **288**: 38-41.
- Usinger R. L. (1946). Notes on Cuban Triatominae. *The Pan-Pacific Entomologist*. **22**: 19-20.

Recibido el 24/04/2006
Aceptado el 21/06/2006

Una nueva especie de *Culicoides* originaria de Venezuela (Diptera: Ceratopogonidae) Gustavo Perruolo*

Una nueva especie de *Culicoides*, *C. tamaensis* es descrita e ilustrada sobre la base de ejemplares hembras colectadas con trampa de luz en la región andina del estado Táchira, Venezuela.

Palabras claves: Díptera, Ceratopogonidae, Región Andina, Venezuela, *Culicoides tamaensis* n. sp.

INTRODUCCIÓN

El género *Culicoides* Latreille está representado en Venezuela por 52 especies (Ramírez Pérez 1984), de las cuales en la región andina se han citado 29 (Perruolo 1987, 1988, 1991). En el municipio Córdoba del Estado Táchira Perruolo (1991) recolectó ejemplares de las especies *C. elutus*, *C. foxi*, *C. insignis*, *C. pusillus* y *C. rostratus*. La propuesta de este trabajo es la descripción e ilustración de una nueva especie para esta región andina de Venezuela, sobre la base de ejemplares hembras capturadas con trampas de luz.

MATERIALES Y METODOS

Los 6 ejemplares hembras utilizados sirvieron de base para la descripción de esta nueva especie fueron recolectados con una trampa de luz de succión tipo CDC entre las 18:00 y 06:00 horas en un área boscosa caracterizada por ser una zona de vida tipo bosque húmedo premontano (Bh-pm) (Ewel *et al.*, 1968), con una precipitación anual de 2000 a 3000 mm, una temperatura media anual de 20 a 25 °C y una altitud de 680 m.s.n.m. de la región de “Media Libra” dentro del Parque Nacional “El Tama” (72° 15' O, 7° 29' N) en el Municipio Córdoba del Estado Táchira, Venezuela, el 14 de Julio de 2004.

La terminología usada es la publicada por Spinelli *et al.* (2005). Todas las medidas están en micras excepto las de las alas que están en milímetros.

RESULTADOS

Culicoides tamaensis Perruolo, n. sp.. (Fig. 1) Diagnóstico: Unica especie del grupo *eublepharus* con relación antenal 1,63 (1,42 – 1,70); sensilas coelocónicas en los segmentos antenales 3, 8, 10 – 14; relación palpal 0,77 - 0,90 (0,83); relación proboscis / cabeza 0,99 – 1,19 (1,09); mandíbula con 20 dientes y celda anal con dos áreas claras separadas.

Hembra: Largo del ala 1,00-1,25 (1,16) mm, ancho del ala 0,48-0,64 (0,52) mm, relación costal 0,59-0,71 (0,65).

Cabeza: 210 µm de largo por 260 µm de ancho, ojos separados por la anchura de ½ omatideo en la parte media, con pilosidad entre los omatideos. Proboscis con una longitud de 230 µm y una relación proboscis/cabeza de 0,99-1,19 (1,09). Antenas con los flagelómeros del tamaño medio siguiente: 37,5- 27,5- 27,9- 27,8- 30,0- 28,1- 27,7- 30,0- 62,5- 70,0- 77,5- 80,0- 92,5 µm; Relación antenal 1,42 – 1,70 (1,63); sensilas coelocónicas en los segmentos antenales 3, 8, 10-14. Palpos claros con los artejos con las siguientes longitudes: 12,5 - 37,5 - 55 - 17,5 - 12,5 µm; tercer segmento palpal con una anchura máxima de 30 µm, lo que da una relación palpal 0,77 - 0,90 (0,83). Órgano sensorial del tercer segmento palpal presente, en la región distal, con el fondo y la abertura externa irregular, casi cuadrangular. Mandíbula con 20 dientes.

Universidad del Táchira. Centro de Estudios de Vectores de Enfermedades (C.E.V.E). Decanato de Investigación. San Cristóbal. Venezuela.

*Autor de correspondencia: perruolo@unet.edu.ve

Tórax: Pardo, pleura más clara.

Patas: Peine tibial del tercer par de patas con cuatro cerdas espiniformes desarrolladas.

Alas: Celdas radiales de diferentes tamaños, manchas oscuras estigmáticas cubren totalmente la segunda celda radial. Celda r3 con dos áreas claras, la distal es grande alargada en sentido transversal y no llega al borde del ala. Celda m1 con dos áreas blancas ovaladas, la distal separada del borde del ala. Celda m2 con un área clara ovalada pegada al borde del ala. Celda cua1 con un área clara que llega al borde del ala. Celda anal con dos áreas claras separadas, la distal pegada al borde del ala. Vena transversal radio-mediana (r-m) clara. Venas M1, M2 sin áreas claras que las abraza. Halterios claros con ápice oscuro

Abdomen: Pardo: dos espermatecas ovoides con una longitud de 52,5 µm

Macho: Desconocido.

Localidad tipo: "Media Libra", Parque Nacional "El Tama", (72° 15' O, 7° 29' N) 680 m.s.n.m, Municipio

Córdoba, Estado Táchira, Venezuela; 14. VII. 2004, Colector: Gustavo Perruolo.

Material examinado: Una hembra holotipo depositada en la colección del Museo Entomológico "Dr. Pablo Cova García" en el Instituto de Altos Estudios "Dr. Arnoldo Gabaldon" de la ciudad de Maracay. Paratipos: cinco hembras depositadas en la colección del "Centro de Estudios de Vectores de Enfermedades" (CEVE) de la Universidad del Táchira y en "Museo de Entomología del Táchira", San Cristóbal, Venezuela, en láminas microscópicas registradas con los números 485-d, 686-d, 687-d, 688-d y 689-d, colectadas con trampas de luz en la misma localidad tipo.

DISCUSION TAXONOMICA

Esta nueva especie pertenece al grupo *Eublepharus*, denominado anteriormente por Wirth y Blanton 1959 como grupo *Transferrans*. En este grupo se encuentran 11 especies (Borkent & Spinelli 2000), de estas *C. tamaensis* se asemeja a *C. caucaensis* Wirth y Lee, 1967 y a *C. tamboensis* Wirth y Lee, 1967. Se puede separar de *C. caucaensis* por el ala que es mas pequeña en *C. tamaensis* y presenta dos áreas claras en la celda m1 y celda anal, la relación antenal y palpal es mas pequeña en *C. tamaensis*, las sensilas coelocónicas están en los segmentos 3, 8, 10-14 en *C. tamaensis*, mientras que en *C. caucaensis* se encuentran en 3, 9-14. El tercer segmento palpal es mas largo y estrecho en *C. caucaensis*. Con la especie *C. tamboensis* la relación antenal es mas grande en *C. tamaensis* y las sensilas coelocónicas están presentes en segmentos diferentes (3, 11-14). La mandíbula de *C. tamboensis* tiene 11 dientes mientras que *C. tamaensis* tiene 20. En el ala *C. tamaensis* tiene dos áreas claras en celda m1 y celda anal.

Etimología: Esta especie de *Culicoides* se denomina por la zona donde se colectó el Parque Nacional "EL TAMA", importante parque nacional situado en la región andina Venezolana, frontera con la Republica de Colombia.

A new species of *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) from Venezuela

SUMMARY

A new species of *Culicoides*, *C. tamaensis* is described and illustrated based on female specimens

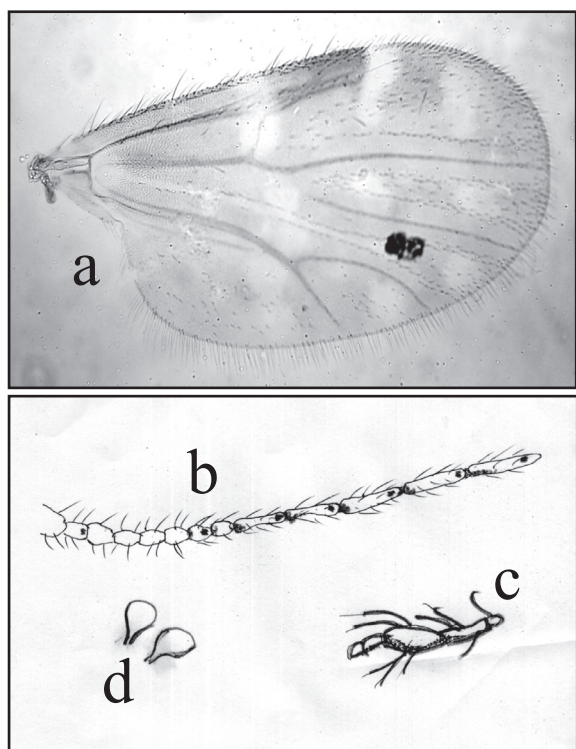


Fig. 1. a) Ala, b) antena, c) palpo y d) espermateca de *C. tamaensis* n.sp.

collected with light traps in the state of Táchira, in the Venezuelan Andes.

Key words: Diptera, Ceratopogonidae, Venezuela, Andean, *Culicoides tamaensis* n.sp.

REFERENCIAS

- Borkent A. & Spinelli G. R. (2000). Catalogue of the New World biting midges South of the United States of America (Diptera: Ceratopogonidae). *Contr. Ent. Inter.* **4**: 1-107.
- Ewel J., Madriz A. & Tosi J. (1976). Zona de vida de Venezuela. Ediciones del Fondo Nacional de Investigaciones Agropecuarias, Ministerio de Agricultura y Cría. Ed. Sucre (Caracas).
- Perruolo G. J. (1987). *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) de Venezuela. I. Redescrípción de cinco especies nuevas para el país. *Bol. Malariol y San. Amb.* **27**: 59-64.
- Perruolo G. J. (1988). *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) del estado Táchira, Venezuela. Parte I. *Rev. Cient. UNET.* **2**: 17-20.
- Perruolo G. J. (1991). Distribución geográfica de *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) en el estado Táchira, Venezuela. *Bol. Dir. Malariol. y San. Amb.* **31**: 9-21.
- Ramírez Pérez J. (1984). Revisión de los dípteros hematófagos del género *Culicoides* en Venezuela. *Bol. Div. Malariol. y San. Amb.* **24**: 49-70.
- Spinelli G. R., Rondero M. M., Diaz F. & Marino P. I. (2005). The bloodsucking biting midges of Argentina (Diptera: Ceratopogonidae) *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **100**: 137-150.
- Wirth W. W. & Blanton S. (1959). Biting midges of the genus *Culicoides* from Panama (Diptera: Heleidae). *Proceedings of the United States National Museum* **109**: 237-482.
- Wirth W. W., Dyce A. L. & Spinelli G. R. (1988). An atlas of wing photographs, with a summary of the numerical characters of the neotropical species of *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae). *Contr. Am. Ent. Inst.* **25**: 1-72.

Recibido el 24/03/2006
Aceptado el 14/07/2006

Acción patógena de una cepa venezolana de *Beauveria bassiana* para *Musca domestica* (Diptera: Muscidae)

José V. Scorza-Dagert & Luis J. Cova O.

En localidades de la Región Neotrópica andino-venezolana se generan contradicciones económico-sanitarias por el incremento sustentable de producción avícola y el consumo de estiércol de pollo como abono hortícola con la generación de poblaciones de *Musca domestica*. Frente a la resistencia cosmopolita de las moscas sinantrópicas a los insecticidas sintéticos, planteamos el uso de hongos entomopatógenos de existencia local, como controladores biológicos. En este ensayo se investiga las dosis de esporas patógenas para moscas silvestres y los tiempos 50 y 95% de mortalidad con el hallazgo de 10^7 conidias/mL de *Beauveria bassiana*, para inducir 95% mortalidad en 6,23 días de exposición. Se especula la posibilidad de nebulizar una similar concentración de esporas para reducir la población de moscas sinantrópicas en una granja avícola.

Palabras claves: *Beauveria bassiana*, *Musca domestica*, control en el laboratorio

INTRODUCCIÓN

El estiércol de pollo o gallinaza, utilizado como abono en horticultura, es un excelente medio de cultivo para las larvas de moscas domésticas (Moon *et al.*, 2001), siendo por ello *Musca domestica* una especie abundante y dominante en granjas avícolas (Avancini & Silveira, 2000). En localidades hortícolas de Los Andes de Venezuela, el uso de la gallinaza como abono ha generado preocupación sanitaria por la proliferación de moscas obligando a un Concejo Municipal prohibir su almacenamiento y uso como abono (véase Anexo 1: Gaceta Municipal, de Timotes, Estado Mérida, Venezuela, Año XI. N° 2). Este problema no es nuevo por cuanto Ascher (1961), en Israel, lo había destacado, advirtiendo la inutilidad del uso de insecticidas sintéticos para el control de las moscas en granjas avícolas.

La resistencia de la mosca doméstica a casi todos los grandes grupos de insecticidas ha sido bien documentada y constituye un grave problema por su

relevancia en salud pública (Georghiou & Mellon, 1983). Un reciente ensayo en las Filipinas (Nazni *et al.*, 1998) reveló una elevada resistencia en la generación F1 de moscas colectadas en una granja avícola, contra cinco insecticidas de uso común que incluyó un clorado, un fosforado, un carbamato y un piretroide, confirmando resultados que son generales para las moscas sinantrópicas. Por otro lado el uso extensivo de estos plaguicidas sintéticos no es recomendable en la explotación avícola, donde las intervenciones de control debieran hacerse con medios biológicos, los cuales son más específicos y sin riesgo para los productores y consumidores de aves.

Recientemente Steinkraus *et al.* (1990) han reportado la infección natural de *M. domestica* con *Beauveria bassiana*, hongo imperfecto cuyas esporas permanecen viables e infectantes tras dos años de almacenamiento a temperatura ambiental.

El Laboratorio de Control de Plagas del Núcleo "Rafael Rangel" de la Universidad de Los Andes, cedió lotes de conidioesporas de una cepa de *B. bassiana* (LF 08) para su evaluación contra adultos de *Musca domestica*, excesivamente abundantes en granjas avícolas de la localidad de Isnotú, cercana a la ciudad de Betijoque del municipio Rafael Rangel (25° C y 600 m.s.n.m.) en el estado Trujillo, Venezuela.

Universidad de los Andes: ¹ Instituto de Investigaciones "José Witremundo Torrealba", NURR- Trujillo, Venezuela.

*Autor de correspondencia: jvscorz@yahoo.com

Se evaluó la actividad entomopatógena de esta cepa de *B. bassiana* para ensayar el control de la mosca casera en unidades de producción de pollos, determinando los tiempos letales 50 y 95% (TL 50 y TL 95) a diferentes dosis para luego proceder a los ensayos de campo. En este trabajo se reporta resultados en condiciones de laboratorio mediante la contaminación individual por contacto, con conidias de *B. bassiana* en moscas inmovilizadas por anestesia con éter etílico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de la cepa de B. bassiana para el biocontrol de moscas domésticas.

Conidias de *B. bassiana*, aislado LF 08, obtenido de infección natural de *Hypothenemus hampei* en frutos de café de una finca en San Cristóbal de La Casas, en el estado Mérida, Venezuela en 2003, fueron propagadas en el medio de cultivo en agar-papa-dextrosa y luego en arroz semicrudo esterilizado.

Para la propagación en masa, a partir de colonias desarrolladas sobre medio sólido de agar papa con dextrosa, durante dos semanas, se utilizaron fragmentos de agar con desarrollo fúngico, suspendidos en agua desionizada con 1:10.000 de Tween-80 e inoculados en arroz descascarado, previamente humedecido al 30% y esterilizado dentro de bolsas de polietileno a (115°C) durante 15 minutos. El arroz inoculado se incubó a temperatura ambiente (25°C) en penumbra, durante dos semanas. Tamizando el desarrollo fúngico a través de organdi, se cosecharon las esporas para recogerlas en envases secos de papel de aluminio esterilizado. Ensayos de germinación de las esporas con la técnica de Milner *et al.* (1991) revelaron más de 90% de eclosión.

Obtención de moscas F1 a partir de moscas silvestres para investigar los TL50 y TL95 a diferentes dosis de conidias de B. bassiana.

La Fig. 1 muestra el dispositivo para la obtención de moscas F1 a partir de especímenes silvestres capturados con malla en una granja de cría avícola. El equipo fue constituido por pares de frascos de 4,8 litros de 27 cm de longitud, 15 cm de diámetro, y boca de 95mm de diámetro interno, conectados

mediante un tubo de PVC de 40cm de longitud y 7.6 cm de diámetro externo, ajustado apretadamente dentro de las bocas de los frascos, mediante un suplemento de bandas elásticas. En la cara superior del tubo de PVC se hicieron 60 huecos de 20mm de diámetro, dispuestos en hileras, cubiertos por nylon adherido con pegante, como ventanas de ventilación (Fig. 2). Dentro de uno de los frascos se introdujeron las moscas silvestres junto con dos vasitos plásticos, uno con azúcar granulada y otro con leche en polvo. En el otro frasco, como medio para la postura de las moscas, se echaron 250gr. de gallinaza humedecida extraída del lecho de una granja de cría de pollos, precalentada a 60°C durante una hora para eliminar huevos, larvas o pupas contaminantes. Se colocaron los sistemas a temperatura ambiente (25°C) en un lugar sombreado y protegido de la acción directa de la luz solar. Se cubrieron los huecos del tubo de PVC con tiras de tela gruesa humedecidas por capilaridad, con el otro extremo sumergido en un frasco con agua. Tan pronto aparecieron larvas de moscas de primero o segundo estadio de desarrollo en la gallinaza de cultivo, se extrajeron las mismas, para obtener la generación F1, ocho a doce días más tarde.

Determinación del tiempo de anestesia con éter y del porcentaje de sobrevivencia de moscas eterizadas.

Debido a dificultades logísticas para disponer de cilindros con dióxido de carbono, se utilizó éter etílico como anestésico para las moscas, único modo para aplicar individualmente las concentraciones de conidias sobre las coxas y piezas bucales de moscas adultas.

La dosificación del éter para las moscas no fue fácil de precisar. Las expusimos en lotes de diez hasta cuarenta, en frascos de 4,8 litros, a los vapores de éter, midiendo como tiempo de anestesia, desde el momento en que se dormía la última mosca, hasta que se despertara la primera.

Para eterizar las moscas, se colocaron en un frasco de 4,8 litros tapado con malla de nylon asegurada con una banda elástica y un círculo de papel Whatman No.1 en el fondo. Invertimos sobre la boca del frasco, otro de menor tamaño de 55mm de diámetro externo y 11cm de longitud (Fig. 3), conteniendo una torunda de gasa impregnada con 3mL de éter. Los gases difunden desde el frasco pequeño hacia el mayor. Con un cronómetro se midió el tiempo que tardó en caer la última mosca y seguidamente



Fig. 1. Dispositivo para cría de moscas silvestres.

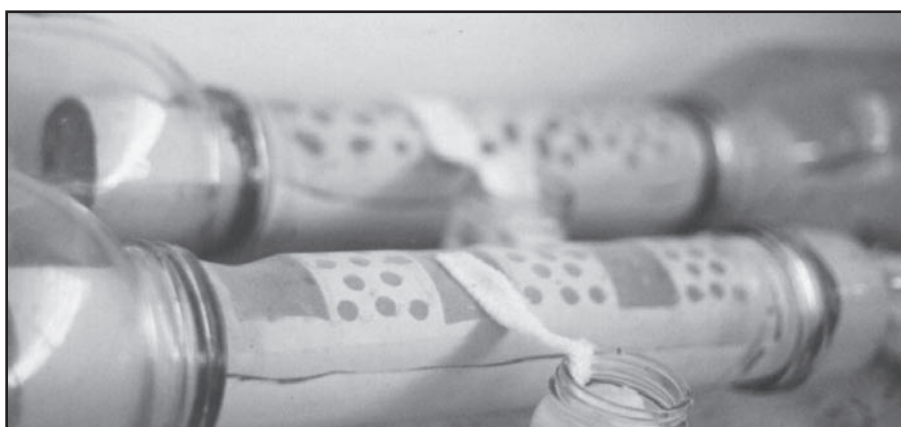


Fig. 2. Ventanas de ventilación para dispositivo de cría de moscas.



Fig. 3. Eterizador de moscas.

se transfirieron los insectos a otro frasco limpio con azúcar y leche en polvo, para medir el tiempo que tomó despertar la primera de las dormidas. Las moscas activas así tratadas, se contaron diariamente para registrar su mortalidad en un lapso de seis días, que según (Barson *et al.*, 1994), es el periodo de alta mortalidad de hembras de *M. domestica* infectadas por *B. bassiana*, cuando se las contamina con 50 conidias por insecto.

Evaluación de la patogenicidad de la cepa LF 08 de B. bassiana para moscas domésticas adultas.

Micelio y conidias de *B. bassiana* en cultivo por 21 días fue separado por tamizado y suspendido en agua desionizada con Tween 80 al 0,01% , agitada suavemente durante un minuto, para romper las conidias. Luego, se realizó una suspensión de densidad de 1×10^8 conidias por mL. contadas con un hemocitómetro Neubauer en 4x16 cuadraditos equivalentes a $0,1 \text{ mm}^3$, ajustando el recuento por centrifugación a 3000 rpm y resuspensión. A partir de esta suspensión con 1×10^8 / mL se hicieron diluciones seriadas en agua con Tween al 0,01% para preparar suspensiones con 1×10^7 hasta 1×10^3 por mL en volúmenes de 10 mL y refrigerarlas (5°C) hasta su uso, no más de doce horas más tarde.

Moscas bajo anestesia con éter, en lotes de 25, fueron contaminadas con 0.5 microlitros de la suspensión de conidias depositando la gotita contaminante, bajo aumento de 5X, entre la trompa y las coxas anteriores. Con cada suspensión de conidias se contaminaron cien moscas que fueron confinadas en cuatro frascos de 4,8 litros con círculos de papel Whatman No.1 de 14 cm de diámetro humedecido y sendos vasitos con azúcar refinada y leche en polvo. Se prepararon así frascos, de cuatro en cuatro, para cien moscas contaminadas con las respectivas concentraciones de conidias (10^7 /mL hasta 10^3 /mL) y además, frascos controles con 100 moscas sanas que, se sometieron únicamente a la anestesia con éter. Los frascos se colocaron en penumbra, para contar diariamente las moscas caídas y aparentemente muertas por su inmovilidad a la agitación del frasco. No se separaron los cadáveres para evitar el estrés en las sobrevivientes. El recuento de las moscas caídas, tanto en los frascos experimentales, como en los controles, se hizo hasta el día 22. Se prestó especial atención, en las moscas caídas, a la aparición en los cadáveres de micelio blancuzco o rosado pálido con aspecto de palomitas o cotufas de maíz.

Para el análisis de los resultados se corrigieron las mortalidades con respecto al control, utilizando la fórmula de (Abbott, 1925):

$$\% \text{ mortalidad corregida} = ((X-Y)/X) \times 100$$

X= moscas vivas del control

Y= moscas vivas en el tratamiento

Luego se aplicó la metodología Probit del paquete estadístico Minitab®. 2003. Statistical Software, Release 14. Minitab. Inc.

RESULTADOS

Tiempo de exposición al vapor de éter etílico y el porcentaje de mortalidad en la post-anestesia de moscas adultas.

En el Tabla I se muestran los resultados de anestesia en 160 moscas adultas de 3 días de edad, distribuidas en 8 lotes con 17 hasta 40 moscas por frasco de observación. El periodo promedio máximo de aplicación fue 4 minutos y el promedio de la duración de la anestesia fue de 12 minutos con mínimo de 6 y máximo de 23 minutos.

Porcentaje de mortalidad post-anestésica de moscas adultas.

En el Tabla II, se presentan los resultados sobre mortalidad producida por eterización en 68 moscas adultas, registrados diariamente durante seis días, en cinco envases de 48 litros con 7 hasta 24 moscas. Solamente 8 moscas murieron, lo que representa el 11,8% del total de moscas expuestas al éter.

Patogenicidad de conidias de la cepa LF 08 de B. bassiana, para moscas adultas F1 del estado Trujillo, Venezuela.

En el Tabla III, transcribimos la data sobre la mortalidad acumulada corregida hasta los 22 días, en seis lotes de 100 moscas contaminadas respectivamente con 0, 06, 6, 60, 600 y 6.000 conidias de *B. bassiana* por mosca.

En el Tabla IV transcribimos, los tiempos letales TL50 y TL95 calculados mediante el analisis probit, para las diferentes dosis de conidiosporas infectantes.

Tabla I. Exposición de moscas adultas y duración de la anestesia con éter.

Frasco No.	Numero de moscas	Tiempo de aplicación	Duración de la anestesia en minutos
1	24	08'	23'
2	13	03'	23'
3	07	02'	20'
4	11	04'	08'
5	12	04'	05'
6	18	03'	06'
7	25	03'	06'
8	40	04'	06'
Promedios	20	04'	12'

Los tiempos letales TL50 a concentraciones de $1,2 \times 10^3$ y $1,2 \times 10^4$ esporas de *B. bassiana* no difirieron sustancialmente respecto a los controles. A dosis de $1,2 \times 10^5$ y $1,2 \times 10^6$ esporas, las moscas tratadas presentaron TL50 que fueron aproximadamente dos tercios del TL50 de los controles, bajando aun mas (4,6 días) a una dosis de $1,2 \times 10^7$. Los TL95 mostraron un patrón similar; hubo poca diferencia entre los controles y TL95 a una concentración de $1,2 \times 10^3$ esporas, pero las moscas sometidas a una dosis de $1,2 \times 10^4$ esporas murieron a un promedio de 4,13 días antes de las moscas controles; y las moscas tratadas con $1,2 \times 10^5$ y $1,2 \times 10^6$ esporas murieron en la mitad del tiempo necesario para producir mortalidad en los controles. Para la dosis de $1,2 \times 10^7$ esporas, el TL95, al igual que TL50, fue tres veces más corto que en los controles. Las eficiencias de *B. bassiana* (TL95/TL50) no cambiaron con la dosis aplicada.

En el Fig. 4 se muestran los valores de las rectas de las regresiones lineales ($y=a+bx$), donde claramente se establece una respuesta dosis dependiente a la acción entomopatogena del hongo y es de hacer notar que el TL50 y TL95 establecido

para cada concentración en la recta de regresión se asemejan a los calculados por el método PROBIT.

DISCUSIÓN

Existe abundante información sobre el papel de la mosca doméstica como transportadora de agentes patógenos que incluyen virus, bacterias, protozoos y huevos de helmintos de importancia sanitaria (Greenberg, 1973). Más recientemente se ha demostrado que ese transporte no es simplemente mecánico, por contaminación, sino también interno, por excreción como acontece con *Escherichia coli* 0157:117 (Kobayashi *et al.*, 1999; Sasaki *et al.*, 2000). A la par de estos conocimientos, se ha confirmado el creciente desarrollo de resistencia de *Musca domestica* contra casi todos los insecticidas de uso común (Nazni *et al.*, 1998). Simultáneamente por otro lado, el aumento de la producción avícola, con excesiva producción de estiércol, ha conducido al incremento poblacional de moscas domésticas (Axtell & Arends, 1990) y al riesgo de su mayor distribución a distancia, por el consumo de la misma gallinaza como abono en localidades hortícolas (Peter & Zarchada, 1997).

Tabla II. Mortalidad de moscas adultas inducida por un tiempo medio de anestesia con éter.

Frascos	No. de moscas en frascos	Mortalidad diaria							Mortalidad	Sobrevivientes
		0	1	2	3	4	5	6	total	total
1	12	0	0	1	1	0	0	0	2	10
2	12	0	0	2	0	1	0	0	3	09
3	13	0	1	0	0	0	0	0	1	12
4	24	0	0	1	1	0	0	0	2	22
5	07	0	0	0	0	0	0	0	0	07
Total	68	0	1	4	2	1	0	0	8	60

Tabla III. Mortalidad acumulada corregida de *M. domestica* producida por diferentes concentraciones de conidias de *Beauveria bassiana* por mL.

Conc.	107	106	105	104	103	100
Días						
1	4	0	--	--	1	2
2	6	2	--	--	3	3
3	7*	1	--	--	2	4
4	22*	1	--	--	3	4
5	61*	1	--	--	5	4
6	96*	5*	2*	2	7	4
7	100	47*	20*	2	7	5
8		80*	55*	1	3	9
9		93*	80*	17	3	12
10		100	91*	17*	5*	19
11			100	38*	9*	23
12				52*	12*	33*
13				68*	32*	34*
14				78*	37*	46*
15				85*	46*	59*
16				89*	71*	72*
17				95*	79*	81*
18				93*	93*	85*
19				100	100	90*
20						99*
21						99
22						100

* datos utilizados para el cálculo de Probit.

-- datos en donde la mortalidad del testigo es mayor que la del tratamiento.

Tabla IV. Tiempos letales TL50 y TL95 , en días, para *M. domestica*, producidas por distintas concentraciones de conidias de *Beauveria bassiana*.

Dosis Conidias/mL	Mortalidad 50%	Error Standard	Límites de confianza		Mortalidad 95%	Error Standard	Límites de Confianza	
			Inferior	Superior			Inferior	Superior
Control	13.8762	0.169510	13.5493	14.2166	20.8446	0.392778	20.1321	21.6831
1.2 X 10 ³	14.7123	0.131846	14.4568	14.9772	19.0725	0.306046	18.5288	19.7432
1.2 X 10 ⁴	12.0381	0.158545	11.7060	12.3346	16.7060	0.304562	16.1731	17.3880
1.2 X 10 ⁵	7.97530	0.101149	7.76185	8.16610	10.1893	0.205589	9.84226	10.6741
1.2 X 10 ⁶	7.26291	0.0767094	7.10770	7.41241	8.87908	0.145189	8.62795	9.21007
1.2 X 10 ⁷	4.60348	0.0763850	4.45356	4.75687	6.22772	0.157103	5.95674	6.58670

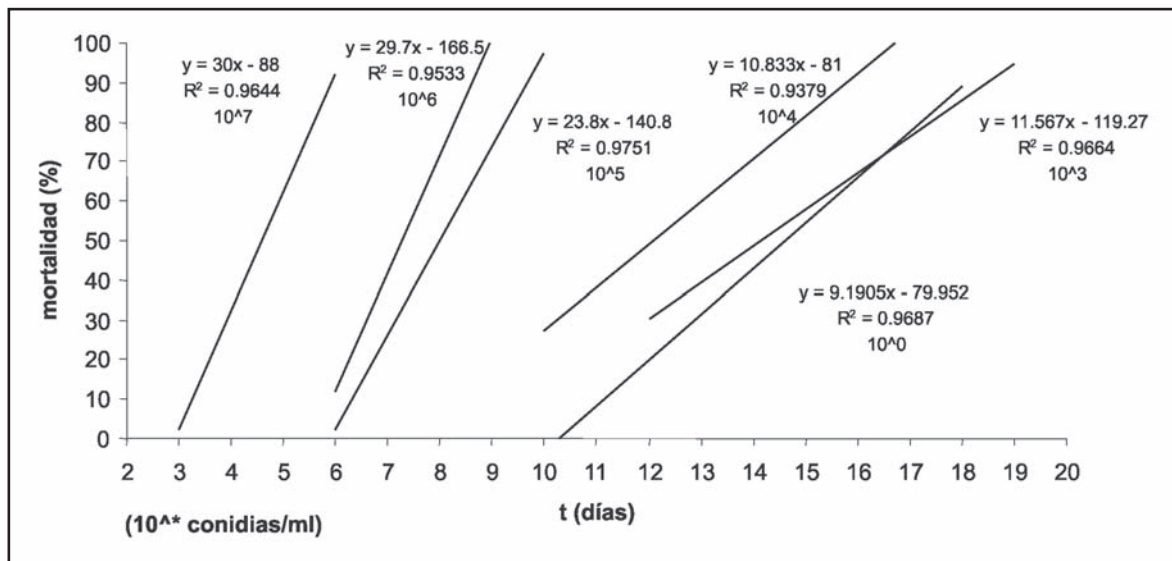


Fig. 4. Valores de las rectas de las regresiones lineales ($y=a+bx$) calculadas para la mortalidad de *Musca domestica* sometidas a la acción entomopatógena de *Beauveria bassiana*.

Aunque el control biológico, en el caso de moscas, es a menudo descrito y rara vez practicado, pensamos que tiene significado cuando como en el caso de las polleras, no pueden aplicarse masivamente pesticidas o utilizarse recursos como el ozono (Masten *et al.*, 2002) que demanda tecnología muy cara. Por ello se considero relevante ensayar un agente entomopatógeno como el Deuteromycete *Beauveria bassiana*, de producción extremadamente fácil y económica. Desde luego, *B. bassiana* ha sido evaluada contra larvas de *M. domestica* en concentraciones de 107 esporas, durante catorce días, reduciendo en un 84% la emergencia de imagos, contra un 54% en lotes no tratados, como control, lo cual induciría a pensar en lo inútil de su uso en larvas dada la mortalidad del control (Berson *et al.*, 1994).

Sin embargo los porcentajes de mortalidad para moscas adultas, registrados por los mismos investigadores británicos, con una cepa de *B. bassiana* y otra de *Metarhizium anisopliae*, son estimulantes; con ambos a 10⁵ conidias, indujeron un 100% de mortalidad a los seis días. La cepa utilizada en el estudio actual, LF08, parece ser menos patógena que la utilizada por Barson *et al.* (1994) ya que a 10⁵ conidias/mL., toma diez días para inducir mortalidad de 100% en moscas adultas. Estos resultados sugieren la necesidad de hacer por lo menos, tres exposiciones con dosis mayores de 10⁵, para alcanzar la máxima letalidad en menor tiempo.

Se concluye que, esporas de una cepa *B. bassiana*, (Moniliaceae), aislada en Venezuela, a dosis de 6000 esporas por mosca, produce 95% de mortalidad en *M. domestica*, en 6,23 días. Se especula su uso en nebulizaciones con similar concentración de esporas para el control de *M. domestica* en unidades locales de producción avícola.

Pathogenic action of a Venezuelan strain of *Beauveria bassiana* on *Musca domestica* (Diptera: Muscidae)

SUMMARY

The sustainable increasing of poultry in localities of the Andean Venezuelan region and the use of dung in market-gardens which generate *Musca domestica* populations pose contradictory economic-sanitary situations. Because of the cosmopolitan resistance of house flies to synthetic insecticides, we propose the use of entomopathogenic fungi locally present in nature as a biological control method. In this assay spores of *Beauveria bassiana* (Moniliaceae) isolated in Venezuela produced 95% mortality in 6.23 days in populations of *Musca domestica*, at a dose of 6,000 spores per fly. We propose the use of similar concentrations of spores in aerosols to control *M. domestica* in local units of agricultural production.

Key words: *Beauveria bassiana*, *Musca domestica*, control, laboratory assay.

AGRADECIMIENTOS

Los Autores agradecen al Laboratorio de Fitopatología "Dr. Carlos Díaz Polanco" del NURR, en las personas, MSc. Clemencia Guedez y al T.S.U. Luis Cañizález, por el suministro de las cepas de *Beauveria bassiana*, al Laboratorio de Postcosecha del NURR, en la persona de Miguel Maffey, por el análisis de Probit, a la Bachiller Laura Avendaño, por su ayuda en el laboratorio y en el campo, al Dr. José Vicente Scorza B., por sus comentarios y observaciones sobre el manuscrito.

REFERENCIAS

- Abbott W. S. (1925). A method computing the effectiveness of an insecticide. *J. Econ. Entomol.* **18**: 265-267.
- Ascher K. R. (1961). Houseflies in Israel. III Some observations at breeding sites in rural areas, and considerations about the influence of Israeli mamasa handling methods of houseflies breeding. *Zchr. Angew. Entomol.* **48**: 115-162.
- Avancini R. & Silveira G. (2000). Age structure and abundance in populations of muscoid flies from a poultry facility in Southeast Brazil. *Mem. Inst. O. Cruz.* **95**: 259-264.
- Axtell R. C. & Arend J. J. (1990). Ecology and management of arthropod pests of poultry. *Ann. Rev. Entomol.* **35**: 101-126.
- Barson, G., Reen, N. & Bywater, F. (1994). Laboratory evaluation of six species of entomopathogenic fungi for the control of the house fly (*Musca domestica* L.) a pest of intensive animal units. *J. Invert. Pathol.* **64**: 107-113.
- Georghiou G. R. & Mellon R. (1983). *Pesticide resistance in time and space*. En: Pest resistance to pesticides. Ed. por Georghiou, G.P. & Saito, T., 1-46pp. Plenum Press, New York. USA.
- Greenberg B. (1973). *Flies and disease. Vol II. Biology and disease transmission*. Princeton University Press, New Jersey. USA.
- Kobayashi M., Sasaki T., Saito N., Tamura K., Suzuki K., Watanabe H. & Agui N. (1999). Houseflies: Not simple mechanical vectors of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **61**: 625-629.
- Masten S., Kim-Yang A., Walker E. D., Roman H., & Yokoyama N. (2002). Toxicity of ozonated animal manure to the house fly, *Musca domestica*. *J. Environ. Qual.* **30**: 1624-1650.
- Milner R. J., Huppatz R. & Swaris B. (1991). A new method for assessment of germination of *Metarhizium* conidia. *J. Invert. Pathol.* **57**: 121-123.
- Moon R. D., Hinton J., O' Rourke S. & Schmidt D. (2001). Nutritional value of fresh and composted poultry manure for house fly (Diptera: Muscidae) larvae. *J. Econ. Entomol.* **94**: 1308-1317.
- Nazni W., Ursula M., Lee H. & Sadiyah L. (1998). Susceptibility of *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae) from various breeding sites to community used insecticides. *J. Vect. Ecol.* **23**: 54-60.
- Peter V. & Zacharda F. (1997). *Collection, storage and transport of poultry wastes*. En: Animal wastes. Appl. Sci. Publ. London. UK.
- Sasaki T., Kobayashi M. & Agui N. (2000). Epidemiological potencial of excretion and regurgitation by *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) in the dissemination of *Escherichia coli*. *J. Med. Entomol.* **37**: 945-949.
- Steinkraus D., Geden C., Rutz D. & Kramer J. (1990). First report of the natural occurrence of *Beauveria bassiana* (Moniliales: Moniliaceae) in *Musca domestica* (Diptera: Muscidae). *J. Med. Entomol.* **27**: 309 – 312.

Recibido el 20/01/2006
Aceptado el 15/09/2006



**REPÚBLICA BOLIVARIANA DE VENEZUELA
ESTADO MÉRIDA
MUNICIPIO MIRANDA**

GACETA MUNICIPAL

AÑO: XI Nº 02 EXTRAORDINARIO. TIMOTES, 26 DE MARZO 2001.

"Se tendrán como publicados y en vigencia, las Ordenanzas y demás instrumentos jurídicos municipales que aparezcan en la Gaceta Municipal, salvo la disposición legal en contrario y en consecuencia, las autoridades públicas y los particulares quedan obligados a su cumplimiento y observancia." (Artículo 6º de la Ordenanza sobre Gaceta Municipal).

SUMARIO

ACUERDO MARZO 2001

Anexo 1. Gaceta Municipal de Timotes, Estado Mérida, Venezuela, Año XI, Nº2.

ACUERDO N° 006-2001

EL CONCEJO DEL MUNICIPIO MIRANDA DEL ESTADO MÉRIDA

En uso de sus atribuciones legales que le confiere el Artículo 178 de la Constitución Bolivariana de Venezuela; Art. 5 y el Ordinal 3ro del artículo 76 de la Ley Orgánica de Régimen Municipal, y obrando de conformidad con lo acordado aprobado en Sesión Ordinaria No.08, de fecha: 16 de Marzo del 2001.

CONSIDERANDO

Que es deber de las autoridades Municipales, garantizar la salud de todos sus habitantes y del medio ambiente.

CONSIDERANDO

Que debido a los múltiples problemas que se han presentado en toda la Jurisdicción del Municipio Miranda, con el transporte, uso y Almacenamiento del Abono el Gallinazo, constituyen amenaza para la salud Pública y el Ambiente.

CONSIDERANDO

Que es deber de las autoridades Municipales, velar por la profilaxis de las enfermedades infecto-contagiosas, gastroenteritis y otras de índole diarreicas, que se originan por la proliferación de insectos transmisores de múltiples enfermedades. (Moscas)

CONSIDERANDO

Que la presencia Masiva de tales insectos se relaciona como elemento causal, de enfermedades infecto contagiosas, según se evidencia de cifras oficiales y que su reproducción tiene que ver en gran medida con el uso, manejo y transporte del abono de estiércol de gallina y de otros animales de corral en actividades agrícolas.

Anexo 1. Gaceta Municipal de Timotes, Estado Mérida, Venezuela, Año XI, N°2. (continuación)

CONSIDERANDO

Que esta actividad es enérgicamente rechazada por nuestros habitantes, tanto por la salud de los trabajadores agrícolas como por aquellos que consumen los alimentos.

ACUERDA

ARTICULO PRIMERO: Prohibir el transporte, uso y almacenamiento del Abono el Gallinazo, en toda la jurisdicción del Municipio Miranda, del Estado Mérida por ser elemento perturbador de la salud pública y el medio ambiente.

ARTICULO SEGUNDO: Para el ingreso de materia Orgánica distinta al Gallinazo, los transportistas deberán portar la correspondiente guía de movilización.

ARTICULO TERCERO: Los contraventores de tales disposiciones serán penados de conformidad con las siguientes sanciones:

- a) Incineración de Abono el Gallinazo en el lugar donde se encuentre almacenado o depositado para ser utilizado.
- b) Si el Abono el Gallinazo ya ha sido utilizado en contravención con el presente Acuerdo, el propietario debe tratar el suelo con cal agrícola a su cuenta y riesgo y será multado con la Cantidad de Setenta Unidades Tributarias (70 UT)
- c) Quien transporte Abono el Gallinazo, será sancionado con multa de setenta Unidades Tributarias (70 UT) y decomiso del producto para su correspondiente incineración.
- d) Queda terminantemente prohibido el tránsito de vehículos que transportan este producto en la jurisdicción del Municipio Miranda, quienes contravengan esta prohibición serán sancionados con la cantidad de Setenta Unidades Tributarias (70 UT.)

ARTICULO CUARTO: Las sanciones pecuniarias previstas en el presente Acuerdo, deberán ser canceladas en la Dirección de Hacienda Municipal dentro de las veinticuatro (24) horas siguientes a la imposición de las Mismas.

Anexo 1. Gaceta Municipal de Timotes, Estado Mérida, Venezuela, Año XI, N°2. (continuación)

ARTICULO QUINTO: Los Organismos: Guardia Nacional, Policía, Prefecturas Civiles, Presidentes de Juntas Parroquiales y Sindicatura Municipal serán los encargados de hacer cumplir el presente Acuerdo.

ARTICULO SEXTO: EL presente Acuerdo deroga todas las disposiciones Municipales, que colidan con la misma y entrará en vigencia a partir de su publicación en la Gaceta Municipal.

Dado, Firmado y Sellado en el Salón de sesiones del Concejo Municipal en Timotes a los Veintitrés Días del Mes de Marzo de Dos Mil Uno.- Año 190º de la Independencia y 142º de la Federación.-

T.S.U. José Evencio Olmos
Presidente (E) del Concejo

T.S.U. Eriberta Gómez
Secretaria

Alcaldía del Municipio Miranda, en Timotes a los Veintiséis Días del Mes de Marzo de Dos Mil Uno.- Año 190º de la Independencia y 142º de la Federación.-

Comuníquese y Publíquese

Ing. Ibraín Ramírez
Alcalde

Anexo 1. Gaceta Municipal de Timotes, Estado Mérida, Venezuela, Año XI, N°2. (continuación)

Control temporal de moscas caseras (*Musca domestica*) en galpones avícolas mediante nebulizaciones con conidias de *Beauveria bassiana*

Luis J. Cova O.¹ & José V. Scorza-Dagert¹

Esporas de *Beauveria bassiana* (Monilia: Moniliaceae) nebulizadas en el interior de galpones de cría de pollos con 7 pollos/m², a dosis de 9x10⁷ conidias/mL en 15 L de agua para cada 1200 m², reducen la densidad de moscas adultas (*Musca domestica*) en un 100% durante el ciclo de cría de los pollos. La reducción poblacional se indujo tras nebulizar una vez por semana, durante tres semanas. Se discuten los beneficios de este método de control y su incidencia sobre la salud pública de la población humana residente en la localidad.

Palabras claves: granjas avícolas, control de moscas, *Beauveria bassiana*.

INTRODUCCIÓN

La mosca casera (*Musca domestica* L.) es una plaga común y abundante en granjas avícolas (Axtell & Arends, 1990) y su densidad es proporcional a la acumulación de estiércol húmedo de ave. En granjas de Brasil, *M. domestica* integra más del 80% de la población muscoide (Avancini & Silveira, 2000) y en los Andes de Venezuela, Cedeño & Añez (2001) han advertido que es inconveniente el uso excesivo de estiércol de pollo o gallinaza como abono en horticultura, por la proliferación de moscas que produce, a la vez que han recomendado la aplicación de sanciones para los usuarios de gallinaza que no cumplan con exigencias sanitarias tales como su almacenamiento en seco o su mezcla con cal. En la localidad hortícola de Timotes del Estado Mérida, Venezuela, el Concejo Municipal ha prohibido el transporte, almacenamiento y uso de la gallinaza por los múltiples problemas de salud pública que derivan de su utilización (Anexo 1. Gaceta Municipal de Timotes, Estado Mérida, Venezuela, Año XI, Nº2: ver Scorza & Cova, 2006).

La excesiva producción de moscas se complica además, por su resistencia contra la mayoría de los insecticidas de uso general (Georghiou & Mellon, 1983), resistencia que impone el uso de otros medios de control compatibles con la actividad avicultora. Consideramos que un medio efectivo de control podría ser la aplicación de hongos entomopatógenos como *Beauveria bassiana* o *Metarhizium anisopliae*, evaluados por Barson *et al.* (1994) en condiciones de laboratorio.

En este trabajo informamos sobre los resultados de campo con una cepa de *B. bassiana* (LF08), aislada por el personal del Laboratorio de Fitopatología del Núcleo Universitario “Rafael Rangel”, de la Universidad de los Andes en Trujillo, Venezuela, en ensayos de control de moscas caseras en dos granjas avícolas cercanas a la población de Isnotú, del estado Trujillo, Venezuela.

MATERIALES Y MÉTODOS

Localidades de trabajo.

Unidades avícolas de Sara Linda y Agua Clara, muy próximas a la población de Isnotú, en el municipio Rafael Rangel del Estado Trujillo, entre

Universidad de los Andes: ¹ Instituto de Investigaciones “José Witremundo Torrealba”, NURR- Trujillo, Venezuela.

*Autor de correspondencia: covaoor@yahoo.com

600 y 800 m.s.n.m., con temperatura media de 25 °C situadas a dos kilómetros distantes entre sí, y conformadas respectivamente por dos y tres galpones de 10m de ancho con 120 m de largo y 3,5 m de alto. Los galpones están separados entre sí por 20 hasta 40 m, tienen pisos de tierra pisada recubierta con cáscaras de arroz y techos de zinc, paredes de alambre de gallinero y zócalo de cemento armado de 50cm de alto. En ambos complejos se crían 7 pollos por metro cuadrado, hasta los 45 días (Fig. 1).

Según nuestro diseño de trabajo, en los tres galpones de Agua Clara, se aplicaron repetidas dosis de *B. bassiana* mediante aspersión de suspensiones de esporas como controladoras de las poblaciones de moscas, en tanto que los galpones de Sara Linda, se asperjaría solamente agua como vehiculo control.

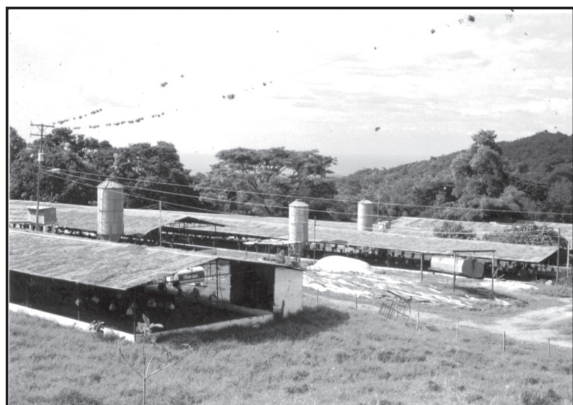


Fig. 1. Galpones de cría de pollos.

Estimaciones de las poblaciones de moscas.

El recuento de moscas se hizo con tres rejillas de madera según Scudder (1947) utilizado por Gómez-Núñez (1960) para contar moscas intradomiciliarias en una localidad urbana del norte de Venezuela. En cada ocasión se colocaron las tres rejillas, inclinadas verticalmente dentro de uno de los extremos de cada galpón, separadas una de otras, por al menos de 3 mts, haciendo el recuento de moscas durante un minuto según la metodología de Scudder (*ref. cit.*), entre las 9:00 y 11:00 de la mañana, evitando movimientos bruscos para no alterar el comportamiento de los insectos. Las mediciones se hicieron cada vez por triplicado; esto es, contando las moscas en las tres rejillas. La densidad de moscas se midió como promedio de las lecturas u observaciones de tres rejillas (Fig. 2). El efecto de tratamiento fue



Fig. 2. Rejilla de Scudder.

cuantificado calculando el porcentaje de reducción de moscas según la fórmula propuesta por Mulla *et al.* (1971).

$$\% \text{ de reducción} = 100 - [C1/C2 \times T2/T1] \times 100$$

C1 y C2 = Número de moscas en los controles antes (C1) y después (C2) del tratamiento.

T1 y T2 = Número de moscas en los galpones tratados antes (T1) y después (T2) del tratamiento.

En ambas localidades se hizo un primer recuento de moscas una semana después de introducidas las camadas de pollitos de quince días de edad; luego otros cuatro recuentos, uno cada semana, y un sexto y último recuento, tres semanas después, para un estudio de las poblaciones de las moscas a lo largo de ocho semanas.

*Preparación de las suspensiones de conidias de *B. bassiana*.*

La cepa de *B. bassiana* LF08 fue sembrada mediante introducción de un taco de agar-papa-dextrosa conteniendo el cultivo del hongo, dentro de arroz humedecido al 30%, esterilizado en autoclave e incubado a temperatura ambiente durante tres

semanas. El arroz esporulado fue suspendido en agua filtrada a temperatura ambiente a razón de 13 gr./l, con 0,1 mL. de Tween 80 y 3 gr. de leche en polvo, agitándolo suavemente para preparar una suspensión de conidias. Las conidias se contaron inmediatamente en el sobrenadante decantado, con una cámara de Neubauer, con un aumento de 400x obteniéndose 9×10^7 conidias/mL.

Aplicación de *B. bassiana*.

A razón de 195 gr de arroz en 15 litros de agua por cada 1200 m², la suspensión conteniendo 9×10^7 conidias/mL, se asperjó en los galpones experimentales, rociando toda el área cubierta de cáscaras de arroz, comederos, bebederos, cables incluso los pollos y la parte interna de los zócalos.

En los tres galpones de Agua Clara, se aplicó el hongo mediante nebulización interna mecánica, de suspensión de conidias, con una bomba portátil de espalda, con palanca manual y 20 litros de capacidad.

De igual modo, pero nebulizando solamente agua con Tween 80 a 0.1 mL/L y 3 gr./L de leche en polvo, se rociaron los dos galpones de Sara Linda, siguiendo la misma secuencia de tratamiento de los galpones de Agua Clara.

Se hicieron tres aspersiones en cada localidad, una por semana, inmediatamente después del recuento de las moscas. Un cuarto recuento se realizó tres semanas después de la última aspersión, después de la cosecha y limpieza de galpones e inicio del siguiente ciclo de cría.

RESULTADOS

Unas seis mil conidias de *B. bassiana* cepa LF08, contenidas en 0,5 mL de agua aplicadas directamente a moscas domésticas en el laboratorio

produjeron un 95% de mortalidad en 6,23 días. Las nebulizaciones semanales por tres veces consecutivas redujeron la densidad de moscas adultas en un 100% en un período de tres semanas con presión entomocida adicional del 94,96% durante las tres semanas siguientes (Tabla I). En comparación, la nebulización con agua en los dos galpones de Sara Linda, con un área y población similar de pollos, se registró una población promedio permanente por rejilla de un mínimo de cuatro (4) y máximo de doce (12) moscas, durante todo el período de cría de ocho semanas. Es necesario indicar que los galpones no tratados con el entomopatógeno, fueron controlados por el productor asperjando periódicamente gasoil alrededor de los mismos, debido a la alta densidad poblacional de moscas.

En los galpones experimentales tratados con conidias de *B. bassiana*, a partir de la primera semana de aplicación, fue constante el hallazgo de moscas casi inmóviles o incapaces de volar sobre las paredes de los zócalos de los galpones o de moscas cubiertas de micelio blanco en el perímetro adyacente (Fig. 3). La actividad entomocida o reguladora de la población de moscas, en los galpones tratados, se prolongó durante dos meses subsiguientes cuando se restableció la actividad procreadora de estos insectos.



Fig. 3. Moscas en el suelo contaminadas con *Beauveria bassiana*.

Tabla I. Medias y porcentaje de reducción de moscas en galpones de cría de pollos, usados como controles y nebulizados con conidias de *Beauveria bassiana*.

	Fechas	16-6	23-6	30-6 Δ^1	7-7 Δ^2	14-7 Δ^3	21-7	28-7	4-8	11-8
Tratamiento	X	*1	4.89	7.67	3.00	0.44	0.00	*2	*3	0.89
	% Red.				88.69	73.60	100.00			94.96
Control	X		9.33	12.17	3.50	6.17	11.67			5.17

*1: Inicio de cría; *2: Cosecha y limpieza de galpones; *3: Nuevo ciclo de cría; Δ^1 : Primera nebulización; Δ^2 : Segunda nebulización; Δ^3 : Tercera nebulización; % Red.: Porcentaje de reducción.

DISCUSIÓN

En un trabajo reciente (Scorza & Cova, 2006) se confirmó la acción patógena de un cepa venezolana del Deuteromycete *B. bassiana* contra adultos de *M. domestica*, capturados en una granja avícola de las cercanías de Isnotú, en el Estado Trujillo de Venezuela. En aquella comunicación se reportó que con una dosis de contaminación individual de 6000 conidias de *B. bassiana* por imago tratado, el 95% de los adultos perecen en 6,23 días. En este trabajo informamos sobre la acción entomocida de una dosis semejante de conidias, nebulizadas en el interior de galpones de una granja avícola de la misma localidad, sitio de cría de excesivas poblaciones de moscas.

Ha motivado esta iniciativa la proximidad de hogares, escuelas y dispensarios de salud a la unidad de cría de pollos, cuyas heces fecales constituyen un excelente medio de cultivo para moscas domésticas (Avancini & Silveira, 2000) y pueden actuar como transportadores y excretoras de bacterias enterohemorrágicas (Sasaki *et al.*, 2000), por lo cual constituyen un motivo de alarma en salud pública para los pobladores aledaños, dando lugar a alarma permanente en la prensa local.

La técnica para el recuento de moscas que se utilizo, es la de la rejilla de Scudder (1947) que durante este medio siglo, ha sido utilizada repetidamente y satisfactoriamente, porque no demanda equipos o instrumentos especiales y puede ser usada aún sin la colocación de las rejillas de madera (Welch & Schoof, 1953). Gómez-Núñez (1960) empleó la técnica e índices de Scudder (*ref. cit.*) para medir la densidad de moscas y evaluar la campaña de control de las mismas en la ciudad de Maracay, en el centro-norte de Venezuela.

La otra preocupación y motivo fundamental de este trabajo, ha sido comprometer a los propietarios de las fincas avícolas para ensayar una nueva metodología inocua para el control de moscas dentro de sus instalaciones, con miles de pollos que son fuente fundamental de sus ingresos económicos. Efectivamente, las repetidas nebulizaciones con conidias de *B. bassiana* sobre más de ocho mil pollos, han logrado reducir en tres semanas, el 100% las poblaciones de moscas internas en los galpones, con el consiguiente alivio para el medio familiar del avicultor y su entorno.

Musca domestica exhibe comportamiento gregario en granjas avícolas de Taiwán (Wu-chun Tu *et al.*, 1991). El tipo de diseño de la pollera se ha relacionado con su abundancia, siendo mayor en aquellas con techos en ángulos y con limpieza poco frecuente, donde las moscas tienden acumularse en los extremos anterior y posterior de las instalaciones (Horton, 1987) característica que ayuda la transmisión del hongo entre ellas.

La virulencia de *B. bassiana* para *M. domestica* ha sido bien documentada por Steinkrauss *et al.* (1990) y Barson *et al.* (1994). Este último trabajo revela actividad patógena para estadios larvales, pupales y adultos a concentraciones de 10^4 y 10^5 conidias/mL con letalidad en moscas adultas de 95% a los nueve días de exposición. Aunque no habíamos considerado la posibilidad de una acción epizootica, el registro de una prolongada reducción de la densidad de moscas hasta tres semanas después de la última nebulización de *B. bassiana* en los tres galpones experimentales, sugiere que su acción letal, una vez desaparecida la población de hembras adultas, se prolonga mucho más allá de la duración del ciclo huevo - adulto de la especie, lo cual implica su permanencia en el ambiente. Los testimonios de los residentes de las granjas sugieren que la acción reguladora sobre las moscas se mantuvo hasta por tres meses más, posterior a la última evaluación, a despecho y desarrollo de una nueva cohorte de pollos. No conocemos el impacto de la aplicación del entomocida sobre la presencia de moscas en las residencias distantes a los sitios de crías y, sobre todo, sobre eventuales modificaciones de la frecuencia de episodios diarreicos en la población infantil, objetivo estratégico de nuestro trabajo. Quedando sembrada la confianza sobre el uso de este controlador biológico en las unidades de producción; ahora deberíamos sembrar la confianza de sus consecuencias, en el personal docente, médicos y paramédicos de la localidad, lo cual exige un poco más que arroz, esterilizador y una maquina asperjadora para apreciar resultados finales y cuantificar el beneficio social de este proyecto.

En conclusión, a lo largo de cuatro semanas, la densidad de poblaciones de moscas tratadas con 10^7 conidias/mL de *B. bassiana* fue reducida en un 100%. En los dos galpones controles con similar área y número de pollos, nebulizados con agua solamente y a pesar del control externo con gasoil, la abundancia

promedio de moscas permaneció entre cuatro (4) y doce (12) por rejilla durante ocho semanas de observaciones.

Tres nebulizaciones de *B. bassiana*, una por semana a la concentración de conidias/mL mencionadas arriba, controlan las poblaciones de moscas adultas por más de seis semanas a partir del inicio del tratamiento.

Temporal control of house flies (*Musca domestica*) in poultry sheds fogged with spores of *Beauveria bassiana*.

SUMMARY

Spores from *Beauveria bassiana* (Monilia: Moniliaceae) applied to poultry sheds containing 7 chickens per m², at doses of 9 X 10⁷ spores/mL in 15L of water per 1200 m² reduced the density of adult *Musca domestica* flies by 100% during the poultry reproduction cycle. Reduction of the population was attained after fogging of the spores once per week, for 3 weeks. The benefits of this approach are discussed in terms of their impact on public health in the locality.

Key words: poultry sheds, housefly control, *Beauveria bassiana*.

AGRADECIMIENTOS

Al Laboratorio de Fitopatología "Dr. Carlos Diaz Polanco" del NURR, ULA, en las personas, MSc. Clemencia Guede y T.S.U. Luis Miguel Cañizalez, por el suministro de la cepas de *B. bassiana*; a la Familia Stanislao, por facilitarnos los galpones para nuestros ensayos; al Laboratorio de Postcosecha del NURR-ULA en la persona de T.S.U. Miguel Maffei por el Análisis de Probit; a la Bachiller Laura Avendaño y T.S.U. Alenxander Castro por su ayuda en el Laboratorio y en campo; al Dr. José Vicente Scorza B. por sus comentarios y observaciones sobre el manuscrito.

REFERENCIAS

Avancini R. & Silveira G. (2000). Age structure and abundance in populations of muscoid flies from a

poultry facility in Southeast Brazil. *Mem. Inst. O. Cruz.* **95**: 259-264.

Axtell R. C. & Arends J. J. (1990). Ecology and management of arthropod pest of poultry. *Ann. Rev. Entomol.* **35**: 101-126.

Barson G., Reen N. & Bywater F. (1994). Laboratory evaluation of six species of entomopathogenic fungi for control of the house fly (*Musca domestica* L.) a pest of intensive animal units. *J. Invert Pathol.* **64**: 107-113.

Cedeño L. & Añez B. (2001). Breve reseña sobre beneficios e inconveniente derivados del uso del estiercol en la agricultura. *Bol. Divulg. IAP, Mérida.* **26**: 17-19.

Georghiou G. R. & Mellon R. (1983). Pesticide resistance in time and space. En: *Pest resistance to pesticides*. Ed. Georghiou, G.P. & Saito, T., 1-46pp. Plenum Press, New York.

Gómez-Núñez J. C. (1960). Índice de densidad de moscas. *Bol. Inf. Div. Malariol.* **2**: 13-15.

Horton D. L. (1987). Influence of poultry house desing on adult house fly distribution. *J. Agric. Entomol.* **4**: 61-65.

Mulla M., Norland R., Fanara D., Darwazeh H. & Menean D. (1971). Control chironomid midges in recreational lakes. *J. Econ. Entomol.* **64**: 300-307.

Sasaki T., Kobayashi M. & Agui N. (2000). Epidemiologic potencial of excretion regurgitation by *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) in the dissemination of *Escherichia coli* 0157: H2 to food. *J. Med. Entomol.* **37**: 945-949.

Scorza D., J. V. & Cova O., L.J. (2006). Acción patógena de una cepa venezolana de *Beauveria bassiana* para *Musca domestica* (Diptera: Muscidae). *Bol. Malariol. Salud Amb.* **46**: 119-130

Scudder, H. (1947). A new technique for sampling the density of house fly populations. *Publ. Health Rep.* **62**: 681-686.

Steinkrauss D., Geden C., Rutz D. & Kramer J. (1990). First report of the natural occurrence of

- Beauveria bassiana (Moniliales: Moniliaceae) in *Musca domestica* (Diptera: Muscidae). *J. Med. Entomol.* **27**: 309-312.
- Welch, S. & Schoof, H.F. (1953). The reliability of "visual surveys" in evaluating, fly densities for community control programs. *Amer. J. Trop. Med.* **2**: 1131- 1136.
- Wu-chun Tu, Li-Cheng Tang, Mel-Hwa, K. & Hon, R. F. (1991). The aggregation behavior of the adult house fly (*Musca domestica*) in a poultry farm. *Entomol. Abstracts.* **7**: 103.

Recibido el 04/04/2006
Aceptado el 15/09/2006

Presencia de *Trypanosoma cruzi* en tejidos de ratas Wistar infectadas experimentalmente y sus fetos

Maritza Alarcón^{1*}, Ana Lugo de Yarbuh¹, Elio A. Moreno¹, Gilberto Payares²,
Sonia Araujo¹ & Melisa Colmenares¹

Este estudio fue realizado con un grupo de ratas juveniles hembras (*Rattus norvegicus*) cepa Wistar con 20 días de nacidas y 250 grs. de peso. Cada rata fue inoculada inyectándole por vía intraperitoneal 0.1 mL de la suspensión sanguínea con 1×10^5 tripomastigotes sanguíneos de *Trypanosoma cruzi* (cepa I/PAS/VE/00/PLANALTO). Los parásitos fueron aislados de *Panstrongylus geniculatus*, naturalmente infectado y capturado en un área urbana del valle de Caracas, Venezuela y mantenidos en ratones NMRI. A los 10 días post-infección a estas ratas (GI) les fue determinado el ciclo estral y luego fueron apareadas con los machos en una relación 2 hembras/1 macho en cada jaula. Grupos de ratas vírgenes inoculadas con *T. cruzi* (GII), ratas sanas (GIII) y ratas preñadas (GIV) fueron usadas como controles. La infección por *T. cruzi* en las ratas de GI reveló los más altos niveles de parasitemias patentes con $12,2 \pm 1,1$ *T. cruzi*/mm³ de sangre a los 18, 24 y 34 días post-infección con 6, 12 y 20 días de gestación respectivamente, al compararla con el GII. Los títulos de anticuerpos específicos anti-*T. cruzi* fueron mayores en el grupo de ratas gestantes e infectadas con *T. cruzi*, en comparación con las vírgenes infectadas, representados por 1:512 y 1:2048 a los 19 y 20 días post-infección respectivamente. El 33 % de las muestras de líquido amniótico de las ratas del GI, desarrollaron formas flageladas de *T. cruzi* en el medio de cultivo NNN. El estudio histopatológico de los cortes de 6µ de espesor coloreados con hematoxilina y eosina del corazón fetal (CF) obtenidos de 2 fetos de ratas del GI con 34 días de infección, reveló nidos de amastigotes en el tejido cardíaco. En las placentas de las ratas del GI se observó una placentitis caracterizada por intenso infiltrado inflamatorio de células mononucleares y polimorfonucleares con predominio de neutrófilos. Los ensayos inmunocitoquímicos con el doble marcaje Isotiocianato de fluoresceína-ioduro de propidio y peroxidasa-anti-peroxidasa en los cortes de placenta, corazón fetal y cordón umbilical de las ratas del GI, mostraron parásitos y abundante antígeno de *T. cruzi*. Estos resultados demostraron la infección intrauterina fetal por *T. cruzi* confirmando la transmisión transplacentaria del parásito desde la madre infectada a su prole. Posiblemente el mecanismo de transmisión congénita esté relacionado con la liberación de los tripomastigotes a través del trofoblasto, a la aspiración del líquido amniótico por los fetos o a la penetración activa de los parásitos a través de la piel y/o mucosas durante el período fetal.

Palabras claves: *Trypanosoma cruzi*, rata Wistar, tejidos fetales, transmisión transplacental.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas es causada por el protozoario flagelado *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909), tanto en Centro como en Sur América, donde es uno de los grandes problemas de salud pública. El parásito es comúnmente transmitido a los humanos y

a otros mamíferos cuando las heces y orina de insectos hematófagos (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) contienen formas flageladas de *T. cruzi*, son pasivamente depositadas sobre la piel durante la ingesta sanguínea (Schuster & Schaub, 2000). En humanos *T. cruzi* penetra a través de membranas mucosas intactas y muy probablemente por la piel sana (Lugo, 1973), o por otros mecanismos alternos como, transfusiones sanguíneas, como la reportada en Bancos de Sangre en Venezuela (Aché, 1993a) y en México (Guzmán *et al.*, 1998), trasplantes de órganos (Schijman *et al.*, 2000), contaminación oral (Nilo *et al.*, 2000; Camandaroba *et al.*, 2002), por la leche materna (Bittencourt, 2000; Azogue &

¹ Laboratorio de Parasitología Experimental, Depto. de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de los Andes. Mérida, 5101, Venezuela.

² Instituto de Biología Experimental (IBE) Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela (UCV), Caracas - Venezuela.

*Autor de correspondencia: amaritza@ula.ve

Darras, 1995) o a través de la vía transplacentaria. Esta modalidad de transmisión prevalece en mujeres preñadas en Sur América en un rango desde 2 a 51% en áreas urbanas, favorecida por la migración interna de personas infectadas desde zonas endémicas y desde 23 a 81% en las mujeres residentes en áreas endémicas (Bittencourt, 1992). Si bien la transmisión congénita de *T. cruzi* de la madre al feto fue observada por Chagas (1911) en Brasil, cuando encontró la infección en un niño de 17 días de nacido y no pudiendo explicar la puerta de entrada del parásito sugirió que era una infección transplacentaria, la enfermedad de Chagas congénita en humanos fue reportada por primera vez en Venezuela por Dao (1949), cuando *T. cruzi* fue observado en la sangre periférica de un recién nacido de madre chagásica. Algunas investigaciones han reportado que existe una estrecha relación entre el tiempo de infección por *T. cruzi* de la madre gestante y la transmisión de los parásitos a los fetos, por lo que han sugerido que la infección fetal ocurre en los primeros tres meses del embarazo, siendo necesario tomar en consideración los efectos secundarios producidos con la aplicación de las drogas utilizadas en el tratamiento de la enfermedad de Chagas durante la preñez (Moretti *et al.*, 2005). En este sentido, se ha destacado que la infección experimental crónica del ratón por *T. cruzi* no altera la fecundidad, comprobándose que en estos animales la aminofilina es capaz de favorecer la infección del feto por *T. cruzi*, probablemente porque el pasaje del parásito es favorecido por una vacuolización del sincicio placentario producida por la droga (Werner & Kunert, 1958). En las crías infectadas por *T. cruzi* el espectro patológico ha resultado ser muy parecido al que predomina en el humano, sin embargo, no es posible interpolar estos hallazgos realizados en roedores, ya que ambos tipos de placentas son totalmente diferentes (Dávila *et al.*, 1994).

La infección transplacentar puede ocurrir en cualquiera de las fases de la infección maternal y con mayor probabilidad durante la fase aguda, debido a la frecuente circulación de los tripomastigotes en la sangre de las madres gestantes. Estos parásitos penetran las vellosidades placentarias transformándose en amastigotes y en un momento dado se multiplican transformarse en tripomastigotes, los cuales son liberados atravesando la barrera placentaria alcanzando la circulación fetal y/o el líquido amniótico, el cual puede ser aspirado

en pequeñas porciones junto con los parásitos por los fetos, en los cuales la interiorización de los parásitos producirían la infección los tejidos muscular cardíaco y/o muscular esquelético fetal entre otros (Delgado & Santos-Buch, 1978; Alarcón *et al.*, 2003). Otros estudios han reforzado el conocimiento sobre la interacción materno-fetal, entre ellos la infertilidad, el retardo en el crecimiento y la pérdida fetal temprana asociados o no con la infección congénita, como ocurre con la infección placentar sin transmisión congénita en ratones, a pesar de los altos niveles de parasitemia circulantes en la madre gestante (Abderkarim *et al.*, 2002). En este sentido, en los casos con enfermedad de Chagas congénita los efectos del embarazo sobre la parasitemia en los fetos no han sido aún esclarecidos y hasta el momento se desconocen las causas por las cuales una madre chagásica origina o no un hijo infectado, aún cuando ocurra la reactivación de la infección (Szarfman *et al.*, 1975; Moreno *et al.*, 2005), ya que en esos casos la incidencia de la infección fetal tendería a ser muy grande (Stiehm *et al.*, 1966). Varios factores han sido asociados con la infección fetal, por lo que algunas investigaciones la han relacionado con las características genéticas, los insectos transmisores, la virulencia de las cepas de parásitos, así como también con el área poblacional estudiada, siendo más frecuente la transmisión transplacentar de *T. cruzi* en las regiones geográficas de alta endemicidad, donde una gran proporción de madres y sus recién nacidos han mostrado ser seropositivos a anticuerpos anti-*T. cruzi*. Estos factores aún no han sido claramente definidos y la infección pareciera estar más influenciada por el origen geográfico de las cepas de *T. cruzi*, las cuales juegan un papel muy importante en la frecuencia de la transmisión congénita (Andrade *et al.*, 1994). Otras observaciones han reportado diferente comportamiento en el tropismo placentar durante la transmisión vertical de *T. cruzi* a un reducido número de crías de ratas Wistar infectadas experimentalmente con cepas de *T. cruzi* procedentes de regiones endémicas para la enfermedad de Chagas en Venezuela (Moreno *et al.*, 2003a). Basados en las consideraciones anteriormente planteadas, nos propusimos seguir un protocolo de trabajo, que nos permitiera hacer un diagnóstico parasitológico en los tejidos fetales en el modelo experimental rata Wistar gestante. En estos animales el curso de la infección chagásica aguda fue seguido mediante la determinación de anticuerpos anti-IgG en las ratas gestantes así como con estudios parasitológicos e histopatológicos. El estudio parasitológico fue

realizado a nivel de la placenta, cordón umbilical, líquido amniótico y tejido muscular cardíaco de los fetos con 20 días de desarrollo en ratas Wistar con 20 días de gestación y 34 días de infección por *T. cruzi*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepa de Trypanosoma cruzi

Se utilizaron tripomastigotes sanguíneos de la cepa I/PAS/VE/00/PLANALTO de *T. cruzi*, aislada de *Panstrongylus geniculatus* naturalmente infectado, capturado por el Dr. G. Payares en el interior de una vivienda de un área urbanizada en las Colinas de Bello Monte, Caracas-Venezuela. Esta cepa de parásitos fue caracterizada por nosotros a través de la Reacción en Cadena de Polimerasa y mantenida en nuestro Laboratorio de Parasitología Experimental (LAPEX), del Departamento de Biología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de los Andes, por pasajes seriados en triatominos, cultivos in vitro y ratones NMRI.

Infección experimental y apareamiento

Un inóculo de tripomastigotes sanguíneos fue obtenido a partir de ratones machos NMRI que cursaban altas parasitemias patentes. Estos animales fueron sangrados por cardiopuntura y la sangre fue mezclada con solución salina estéril al 0,85%. Los tripanosomas fueron contados siguiendo el método modificado por Brener (1962) a fin de obtener un inóculo aproximado de 1×10^5 tripanosomas/0,1 mL de la suspensión sanguínea. Para el estudio se utilizaron 24 ratas albinas juveniles hembras (*Rattus norvegicus*) cepa Wistar de 45 días de nacidas y un promedio de 250 grs de peso. Las ratas fueron separadas en 4 grupos de 6 ratas cada uno: GI formado por ratas infectadas con *T. cruzi* y preñadas a los 10 días post-infección (pi), GII formado por ratas vírgenes infectadas con *T. cruzi* (control infectado), GIII formado por ratas vírgenes (control sano) y GIV formado por ratas sanas preñadas (control gestante). Las ratas de GI y GII fueron inoculadas por vía intraperitoneal (ip) con 1×10^5 tripanosomas/0,1 mL de la suspensión sanguínea y las ratas de GIII y GIV fueron inyectadas con 0,1 mL de solución salina por la misma vía. Antes del apareamiento a las ratas de GI y GIV les fue determinado el ciclo estral entre los 10 y 12 días (pi). Para tal fin se introdujo 0,5 mL de solución salina con una micropipeta Pasteur en la

abertura vaginal, después de mezclar la solución con el contenido vaginal de cada rata, se tomó una pequeña muestra la cual fue colocada sobre un portaobjeto para la observación al microscopio con 10X. La presencia de células nucleadas y células epiteliales cornificadas junto al moco vaginal, comprobaron que las ratas estaban en proestrus o estrus del ciclo (Waynforth & Flecknell, 1992). Las ratas fueron colocadas en jaulas en una relación 2 hembras/1 macho durante dos días para el apareamiento y fueron consideradas preñadas por el encuentro de espermatozoides en los frotis del contenido vaginal coloreado con azul de metileno. A este tiempo las hembras fueron separadas de los machos y mantenidas en jaulas individuales en el Bioterio experimental de la Facultad de Ciencias-ULA, bajo condiciones ambientales controladas y alimentadas con dieta comercial y agua *ad libitum*.

Evaluación de la infección

Para el diagnóstico parasitológico las muestras de sangre fueron extraídas de las ratas infectadas gestantes y de las vírgenes infectadas con *T. cruzi*, entre 12 y 34 días (pi). Estando los animales ligeramente anestesiados con éter dietílico fueron sangrados por ruptura del plexo retro orbital con capilares heparinizados, la sangre fue recogida en tubos de microcentrifuga de 1,5 mL y el número de tripomastigotes sanguíneos fue estimado en 5 μ L de sangre colocado sobre láminas portaobjeto y contados en 100 campos microscópicos.

Determinación de la presencia de anticuerpos IgG anti-T. cruzi

Los niveles de anticuerpos específicos IgG anti-*T. cruzi* fueron determinados mediante la reacción de inmunofluorescencia indirecta (IFI) (Camargo 1966). Para esta prueba las muestras de sangre obtenidas anteriormente de las ratas infectadas de los GI y GII fueron mantenidas a 4°C por 1 hora. Una vez retraído el coágulo los sueros fueron separados por centrifugación de la sangre a 3000 rpm durante 15 min y almacenados a -20 °C hasta su uso. Los sueros de las ratas fueron diluidos desde 1:32 hasta 1:4096, depositados sobre láminas portaobjetos que contenían como antígeno tripomastigotes de cultivo de la cepa PLANALTO durante 1 hora a temperatura ambiente, fijados con acetona, lavados tres veces con Buffer Fosfato Salino (PBS) a pH 7,2 durante 5 min cada vez e incubadas con el anticuerpo anti-IgG de rata

marcado con isotiocianato de fluoresceína (Sigma, St. Louis, USA) diluido 1:500 en PBS a pH 7,2 durante 1 h, lavados nuevamente con PBS a pH 7,2 y cubiertas con glicerina tamponada 9:1 para la observación al microscopio de fluorescencia.

Determinación de tripomastigotes en el líquido amniótico

Las ratas del GI con 20 días de gestación y 34 días (pi) fueron sobreanestesiadas con éter dietílico e inmediatamente se les extrajo el útero grávido, separándolo por debajo del antro a nivel del fondo de la vagina. A través de una pequeña incisión a nivel de las membranas que recubren cada saco uterino (SU) se tomaron muestras de líquido amniótico (LA). Pequeñas porciones de LA fueron colocadas sobre láminas portaobjeto para la observación al fresco, y otras muestras una vez secas fueron fijadas con metanol y coloreadas con Giemsa al 10% en buffer Sørensen a pH 7,2 para continuar con la búsqueda de tripomastigotes en el LA bajo el microscopio, el resto de las muestras de LA fue sembrado en el medio de cultivo NNN.

Estudio histopatológico

A través de una incisión longitudinal de la membrana uterina, se extrajeron los fetos con sus placentas los cuales fueron colocados en placas de Petri para lavarlos con solución fisiológica. Los fetos, cordones umbilicales(CU), placentas (P) y fragmentos de útero grávido (U) fueron fijados en formalina al 10 % durante 48 horas, al cabo de este tiempo a los fetos se les extrajo el corazón (CF). Los tejidos fueron incluidos en Paraplast (Monoject Scientific, St. Louis, MO. USA) y los cortes histológicos de 6 µm de espesor de cada tejido fueron coloreados con hematoxilina y eosina (HE) (Sigma, St. Louis. USA).

Estudio inmunocitoquímico

Para la detección de parásitos y antígeno de *T. cruzi* se utilizó el doble marcaje con inmunofluorescencia indirecta-ioduro de Propidio (IFI-IP) y peroxidasa-anti-peroxidasa (PAP) (Sell & Burton, 1981), a fin de verificar infección y antígeno de *T. cruzi* en los tejidos. Para tal fin los cortes histológicos de las muestras P, CU, U de las ratas infectadas gestantes y CF de los fetos de las mismas

ratas, fueron desparafinados, hidratados e incubados con antisero de conejo anti-*T. cruzi* diluido 1:30, anticuerpo IgG de rata conjugado con isotiocianato de fluoresceína (Sigma, St. Louis. USA) diluido 1:500 y ioduro de propidio (Molecular probe, Inc. USA) diluido 1:1000 con PBS a pH 7,2, lavados con PBS a pH 7,2 y cubiertos con glicerina tamponada 9:1 y laminilla para su observación. Otro grupo de láminas conteniendo los cortes histológicos de P, CU, U, CF fueron desparafinados, hidratados e incubados con H₂O₂ al 3% en metanol para inactivar la peroxidasa endógena, antisero de conejo anti-*T. cruzi* diluido 1:30 y anticuerpo IgG de rata conjugado con peroxidasa (Sigma, St. Louis. USA) diluido 1:500 con PBS a pH 7,2. Los cortes fueron lavados con PBS a pH 7,2 después de cada una de las incubaciones y la reacción fue revelada con 3,3 tetracloruro de diaminobencidina, contracolorada con hematoxilina de Mayer, deshidratados y cubiertos con MAR-TEX y cubreobjeto. Las muestras de tejidos fueron observadas en un microscopio confocal laser Olympus Fluoview II (CCD System, Olympus Optical CO., Japan). Los cortes de U de ratas vírgenes infectadas con *T. cruzi* (GII) y U de ratas sanas (GIII) y P, CU, U y CF de los fetos separados de ratas sanas gestantes (GIV), fueron procesados y revisados como controles de infección y gestación respectivamente.

Análisis estadístico

Los resultados de las parasitemias patentes fueron procesados mediante un análisis de varianza para efectos fijos y un contraste de inferencia simultánea (Kleinbaum *et al.*, 1998).

RESULTADOS

Evaluación de la parasitemia patente

El estudio parasitológico efectuado a los 12, 19, 26 y 34 días de infección y 6, 12 y 20 días de gestación, reveló en la ratas infectadas gestantes niveles de parasitemias significativamente mayor alcanzando su máximo valor promedio de $12,2 \pm 1,1$ tripomastigotos/mm³ de sangre a los 34 días (pi) y 20 días de gestación, en relación con la observada en las ratas vírgenes infectadas (Fig. 1). La comparación de la evolución de la parasitemia entre las ratas infectadas gestantes y vírgenes infectadas con *T. cruzi*, revelaron diferencias altamente significativas al 1 % entre la primera y segunda semana de gestación.

Evaluación de la respuesta humoral

En las ratas de los GI y GII la evolución de la respuesta humoral reveló un aumento en los títulos de anticuerpos IgG, anti-*T. cruzi*. A medida que progresaba la infección chagásica los niveles más altos de anticuerpos IgG oscilaron entre 1:512 y 1:2048 en las ratas infectadas gestantes los que tendieron a mantenerse elevados entre los 19 y 34 días (pi) y 6 a 20 días de gestación, mientras que en las ratas vírgenes infectadas con *T. cruzi* los títulos de TAc-IgG disminuyeron a 1:125 (Fig. 2). La comparación de los TAc entre los dos grupos de ratas infectadas con *T. cruzi* reveló diferencias significativas al 5 %.

Evaluación del líquido amniótico

El líquido amniótico separado de los sacos uterinos de 2 de las 6 ratas infectadas gestantes (33,33 %) con 34 días pi y 20 días de gestación, desarrolló formas flageladas de *T. cruzi* entre los 30 y 40 días de incubación en el medio de cultivo NNN.

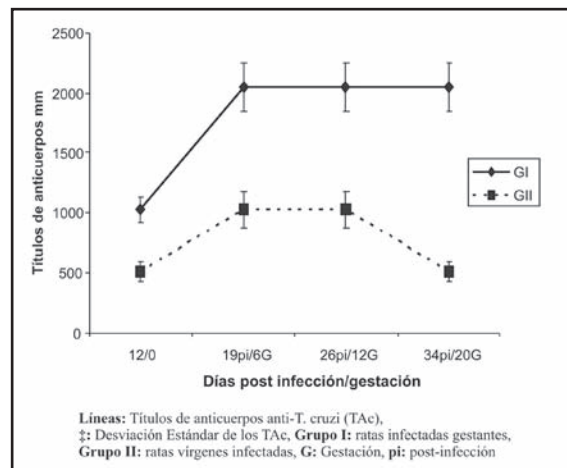
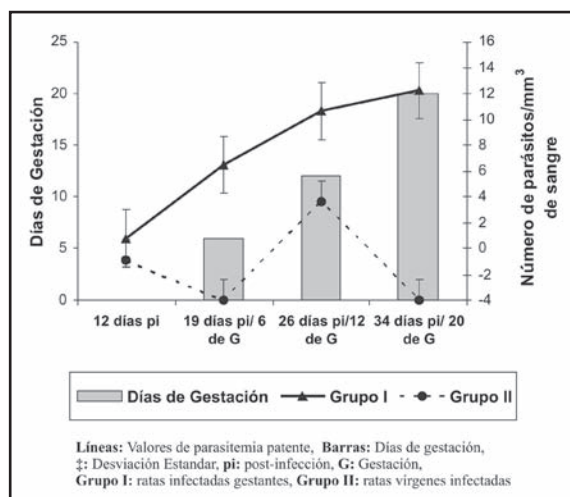
Estudios histopatológicos

La histología de las placentas de las ratas infectadas gestantes mostró vellositis de variable intensidad representada por lesiones inflamatorias agudas, moderada placentitis caracterizada por la presencia de infiltrado celular con abundantes neutrófilos muy cerca de los vasos sanguíneos (Fig.

3A) y numerosas células gigantes dispersas en el estroma veloso, placas coriónica y tejidos desiduales. El 25 % de las placentas (13/52) mostró nido de amastigotes en las células trofoblásticas y macrófagos rodeados de inflamación mononuclear (Fig. 3B). La respuesta inflamatoria uterina estuvo representada por un infiltrado linfomonohistiocitario junto a nido de amastigotes a nivel de las fibras musculares lisas del útero en el 25 % de las ratas infectadas gestantes (Fig. 3C). El útero de las ratas vírgenes infectadas con *T. cruzi*, mostró escaso infiltrado celular disperso en el tejido uterino y sin infección tisular. El análisis histológico con H-E y la imagen confocal de los corte de corazón de los fetos separados de las ratas infectadas gestantes, mostraron células inflamatorias mononucleares y polimorfonucleares, signos de activación endotelial, miositis hipertrófica y nido de amastigotes en el tejido cardíaco fetal (Fig. 4 A,B). La inmunotinción mediante IFI-IP de los cortes histológicos de la P (Fig 5A) y del CU (Fig. 5B) mostraron abundante depósito antigénico de *T. cruzi* disperso en el tejido placentario y localizado cerca de los vasos sanguíneos del cordón umbilical.

DISCUSIÓN

Se ha referido que la transferencia de antígenos de la madre al feto aumenta la capacidad de la progenie para responder a la infección a través de la modulación del sistema inmune fetal (Carlier & Truysens, 1999; Shearer & Clerici, 1996), por lo



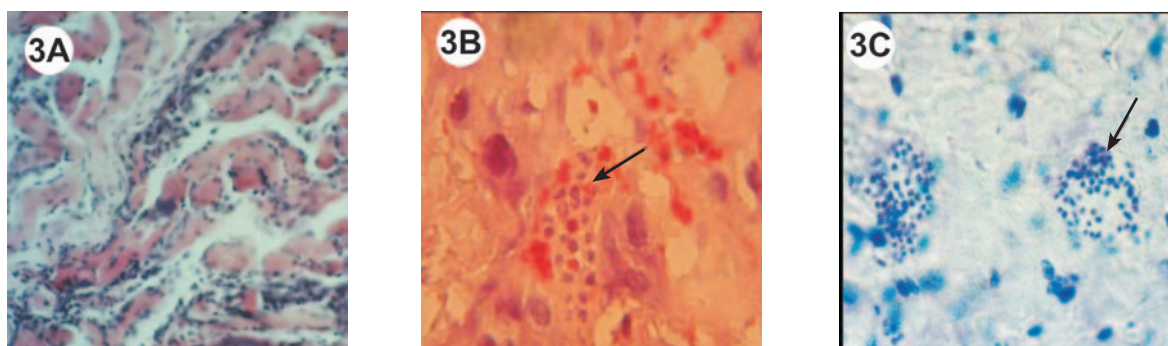


Fig. 3. Secciones histológicas de la placenta de rata Wistar con 34 días de infección con *Trypanosoma cruzi* y 20 días de gestación que muestran: A) áreas de inflamación mononuclear; B) grupo de neutrófilos cerca de vasos sanguíneos (—>); C) nidos de amastigotes (—>) y células inflamatorias en el tejido placentario. (H-E. 1000x).

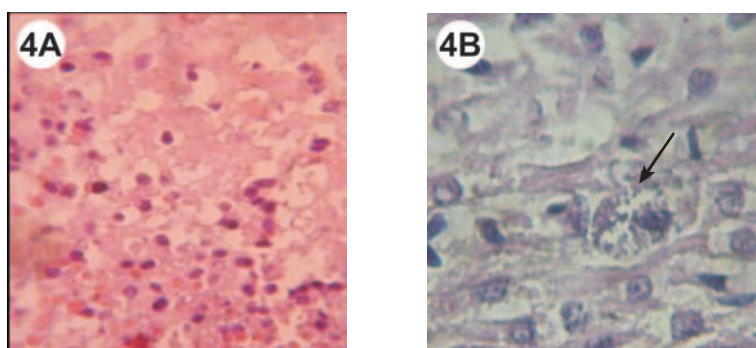


Fig. 4. Secciones histológicas de corazón de feto de rata Wistar con 34 días de infección con *Trypanosoma cruzi* y con 20 días de gestación. A) infiltrado inflamatorio de células mononucleares; B) nido de amastigotes (—>) en el tejido cardíaco fetal (H-E. 450x, 1000x).

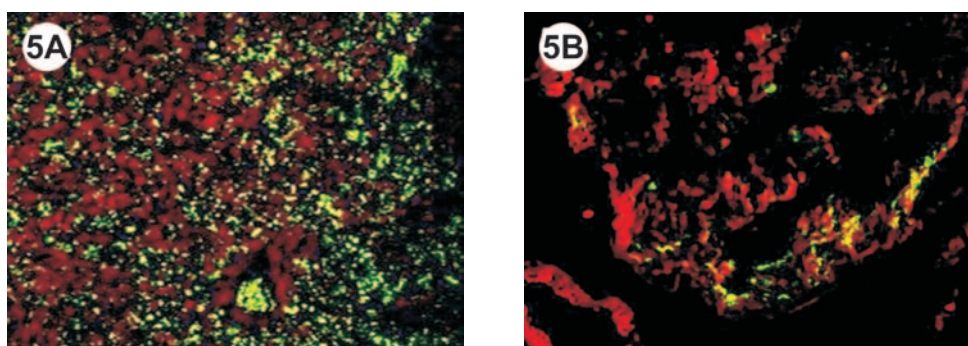


Fig 5. Imágenes confocales de corte histológico de placenta y de cordón umbilical de rata Wistar con 34 días de infección con *Trypanosoma cruzi* y con 20 días de gestación que muestran: A) abundante depósito antigénico fluorescentes de *T. cruzi* disperso en el tejido placentario (verde); B) Antígeno de *T. cruzi* muy cerca de vasos sanguíneos del cordón umbilical (núcleos celulares de color rojo) (IFI-IP.1250x).

que tanto los fetos como los recién nacidos pueden tener tanto parasitemias positivas como negativas aún cuando sus madres resulten con xenodiagnósticos positivos, lo que sugiere que la infección congénita no es transmitida a toda la progenie (Barousse *et al.*, 1978). En este estudio el hecho de que solo algunas de las placentas de las ratas Wistar se hayan infectado con *T. cruzi*, pudiera estar relacionado con la competencia inmunológica de la placenta al proteger al feto de la infección y en consecuencia modular la severidad de la infección congénita (Bitterncourt, 1992). En otros animales experimentales como el modelo ratón se ha observado que la infección por *T. cruzi* no altera la fecundidad, se produce una disminución significativa en el número de crías y en la sobrevivencia de las mismas al mes de nacidas, con presencia de anticuerpos aglutinantes anti-*T. cruzi* en los músculos esqueléticos, cardíacos y vasos sanguíneos (Meckert *et al.*, 1980; Gitlin & Koch, 1988). Estos anticuerpos pudieran estar acumulándose en el tejido muscular cardíaco de los fetos de las ratas Wistar infectadas con *T. cruzi*, debido posiblemente a la acción de los anticuerpos maternos anti-*T. cruzi* transferidos pasivamente por vía transplacental, así como a la activación de los monocitos los cuales participan en el control de la infección y en el mantenimiento de la preñez en humanos (Sack *et al.*, 1999), de esta forma los tejidos fetales estarían protegidos contra una eventual transmisión vertical de los parásitos, debido al sinergismo entre los anticuerpos y monocitos activados (Umekita & Mota, 2000).

Otros estudios en humanos y modelos experimentales relacionados con la infección chagásica congénita, han planteado que los linfocitos obtenidos de la sangre del cordón umbilical proveniente de madres chagásicas, pudieran relacionarse con antígenos de *T. cruzi* o expresar idiotipos sobre anticuerpos específicos (Elói-Santos *et al.*, 1989). Estas interacciones podrían ser capaces de alterar el curso de la infección con el progreso de la gestación (Carlier *et al.*, 1992; Márquez de Araujo *et al.*, 1996), de tal forma que si la respuesta inmune de la madre influye en el sistema inmune del feto, es razonable pensar que el perfil fenotípico linfocítico de los recién nacidos chagásicos pudiera también estar relacionados con esas interacciones (Neves *et al.*, 1999; Altemani *et al.*, 2000).

La transmisión congénita así como los cambios en la fertilidad, sobrevivencia de los

recién nacidos y el número total de la reabsorciones en ratones han sido relacionados con el proceso inflamatorio uterino (Gonzalez-Cappa *et al.*, 1999). A este respecto la interacción infección chagásica aguda/embarazo en la ratas Wistar produjo la transmisión congénita a un reducido número de fetos, en los cuales las células inflamatorias y nido de parásitos fueron observados en el tejido cardíaco fetal, cuando las fibras musculares lisas del útero grávido, estroma veloso y área vascular de algunas placentas de las ratas Wistar gestantes, estuvieron cargados de células polimorfomononucleares, a diferencia de lo observado por Carraro-Abrahão *et al.*, (2000) en ratones NMRI y suizos infectados con las cepas RAL y Y de *T. cruzi* respectivamente, cuyas placentas mostraron nidos de amastigotes en las células gigantes con inflamación linfoplasmohistiocitaria. En este sentido, algunos autores han sugerido que es posible que la presencia de infiltrado de células mononucleares y polimorfonucleares en las placentas infectadas con *T. cruzi*, pudiera estar relacionados con la activación del complemento por los parásitos durante el período maternofetal lo que produciría la muerte de los fetos, como ocurre en ratones con infección chagásica aguda (Tomlinson *et al.*, 1994; Xu *et al.*, 2000), este último evento pudiera también ocurrir en el modelo experimental rata Wistar, sin embargo, no podemos afirmarlo por cuanto en este estudio la gestación en las ratas fue interrumpida a los 20 días de evolución.

Andrade (1982) refirió la presencia de parasitismo en el área vascular de las placentas de ratones infectados con diferentes cepas de *T. cruzi* y su transmisión congénita, posteriormente el autor confirma la marcada diferencia que existe en el tropismo placentar (Andrade, 1992), por lo que se considera que el parasitismo placentario no guarda una estricta correlación con la infección fetal, dado que se han observado casos de enfermedad de Chagas congénita sin nidación placentaria (Bitterncourt, 2000). Los resultados experimentales obtenidos en el presente estudio sugieren que durante la infección aguda el origen de las cepas de parásitos puede ser un factor determinante en la infección de la placenta y por tanto en la infección congénita de *T. cruzi*, por lo que el hallazgo de tripomastigotes en el 33 % de las muestras de líquido amniótico y la presencia de nidos de amastigotes en el corazón fetal, son resultados indicativos de que los parásitos lograron atravesar las barreras mecánicas e inmunológicas hasta llegar a la circulación fetal causando la infección congénita a un reducido número de fetos, a, lo que indica la

eficacia de las capas trofoblásticas placentales para bloquear el pasaje de parásitos de la madre a los fetos a pesar de la presencia de numerosos parásitos en la sangre materna. En este sentido, los mecanismos por los cuales las capas trofoblásticas previenen la infección del feto aún es desconocida, sin embargo se ha sugerido que las enzimas lisosomales estarían limitando la propagación de *T. cruzi* hacia los fetos (Frank *et al.*, 2000).

Las alteraciones histológicas sufridas por la placenta debida a la infección por *T. cruzi* junto con la respuesta inmune generada por la presencia de los parásitos, pudieran limitar el intercambio materno-fetal, el cual también ha sido asociado con la presencia de infiltrado inflamatorio con predominio de neutrófilos, con la formación de trombos, necrosis isquémica y degeneración fibrinoide en ratones, hechos que reducen el flujo de sangre en la placenta produciéndose una insuficiencia placentaria severa la cual afecta la transferencia de nutrientes para el feto y por tanto la reducción del crecimiento fetal y la formación de lesiones placentarias (Scrimshaw y Schürch, 1998; Mjihdi *et al.*, 2002; Sala *et al.*, 2006).

En este estudio, la presencia de formas flageladas en los cultivos del líquido amniótico de algunas ratas Wistar infectadas gestantes, demuestra que los parásitos pueden alcanzar los fetos por vía hematógena (Nilo *et al.*, 2000), este pasaje de *T. cruzi* probablemente se deba a la placentitis provocada por la multiplicación o por la penetración activa de los parásitos hacia la circulación fetal a través de la placenta (Moreno *et al.*, 1998), tal como fue demostrado por la presencia de tripomastigotes en el líquido amniótico separado de tres sacos uterinos de un ratón de la cepa NMRI preñada e infectada con tripomastigotes aislados de un marsupial procedentes de una región geográfica venezolana para la enfermedad de Chagas en el estado Barinas (Moreno *et al.*, 2003b), en contraste con otras cepas de *T. cruzi*, de origen humano y canino provenientes de la misma área endémica, con las cuales no se observaron tripomastigotes en el LA de un grupo de ratas Wistar infectadas con estos aislados (Moreno *et al.*, 2003a).

Con estos resultados hacemos énfasis en dos encuentros importantes como son la infección placentar e intrauterina fetal y por tanto la transmisión congénita en el modelo experimental rata Wistar

infectadas por *T. cruzi* aislado de *P. geniculatus*, vector intradomiciliario urbano encontrado naturalmente infectado en la habitación de una vivienda ubicada en el valle de Caracas, donde su alta infección (76.1%) a *T. cruzi* (genotipo Tc1) y el alto contacto hombre-vector (98% HB) han sido recientemente demostrados (Carrasco *et al.*, 2005). Finalmente concluimos, comentando la importancia epidemiológica relacionada con la transmisión congénita de *T. cruzi*, en áreas geográficas urbanas no endémicas para la enfermedad de Chagas como el valle de Caracas.

Esta forma de transmisión de gran importancia en áreas endémicas ubicadas en sectores poblacionales rurales y suburbanos, donde las condiciones socioeconómicas y la carencia de educación sanitaria en los pobladores son factores de riesgo para el manteniendo de la infección así como de la endemia (Aché, 1993b), se ha visto favorecida por el incremento del turismo y la migración interna de personas infectadas hacia zonas no endémicas altamente urbanizadas, donde los parásitos se encuentran circulando entre la población humana, triatomíneos vectores y reservorios silvestres de *T. cruzi*, como lo muestran los trabajos de investigación referidos por Pifano (1986) y como lo señalan Herrera & Urdaneta-Morales, (1992) y Herrera *et al.*, (2003), quienes aislaron *T. cruzi* de *Didelphis marsupialis* y *P. geniculatus*, vector encontrado en la misma región urbana donde fuera capturado el triatómino infectado con *T. cruzi* cepa PLANALTO, cuyas formas sanguíneas utilizadas en la infección experimental de las ratas Wistar, mostraron preferencia por los tejidos placentario y cardíaco fetal. Estos encuentros muestran la necesidad de vigilar los posibles nuevos focos de la enfermedad de Chagas en zonas altamente urbanizadas de Venezuela, donde se encuentra una gran población la cual estaría sometida a una continua transmisión activa debida a la presencia de vectores intradomiciliarios infectados con *T. cruzi*.

Presence of *Trypanosoma cruzi* in tissues of experimentally infected Wistar rats and their fetuses

SUMMARY

This study was carried out with a group of 20 days old, 250-g female juvenile rats (*Rattus*

norvegicus) of the Wistar strain. Each rat was inoculated, injecting it intraperitoneally with a 0.1-mL suspension of Blood with 1×10^5 tripomastigotes from the I/PAS/00/PLANALTO strain. The parasites were isolated from naturally infected *Panstrongylus geniculatus* from a street in an urban area in Caracas, Venezuela, and maintained in NMRI rats. At 10 days post-infection (pi), the rats were determined to have completed the estrual cycle and were then mated with males, with a ratio of 2 females and 1 male in each cage. Groups of virgin rats inoculated with *T. cruzi* (GII), healthy rats (GIII) and pregnant rats (GIV) were used as controls. Infection by *T. cruzi* in the GI rats revealed the highest levels of clear parasitemia with 12.2 ± 1.1 tripomastigotes/mm³ of blood at 18, 24 and 34 days (pi) with 6, 12 and 20 days from gestation, respectively, compared with GII. The titles of specific antibodies anti-*T. cruzi* were greater in the group of pregnant and infected rats in comparison with the infected unmated rats, represented by 1:512 and 1:2048 at 19 and 20 days (pi) respectively. 33% of the samples of amniotic fluid of the rats of GI developed flagellate forms of *T. cruzi* in NNN culture. Histopathological study of 6µm sections stained with hematoxylin-eosin of fetal hearts obtained from 2 rat fetuses revealed nests of amastigotes in the cardiac tissue. In the placentas of GI with 34 days of infection, we observed a placentitis characterized by intense inflammatory infiltration of the mononuclear and polymorphonuclear cells with neutrophils predominant. The immunohistochemical assays using double marking with fluorescein isothiocyanate-propidium iodide and peroxidase-antiperoxidase in the sections of placenta, fetal hearts and umbilical cords showed parasites and abundant antigen of *T. cruzi*. These results demonstrate the fetal intrauterine infection by *T. cruzi*, confirming the transplacental transmission of the parasite from the infected mother to her offspring. Possibly the mechanism of congenital transmission is related to the release of the tripomastigotes across the trophoblast, to the taking up of the amniotic liquid by the fetuses or by the active penetration of the parasite across the skin and/or mucosa during the fetal period.

Key words: *Trypanosoma cruzi*, Wistar rats, tejidos fetales, transplacental transmission.

AGRADECIMIENTOS

Este estudio fue apoyado por el Fondo Nacional de Ciencia, Tecnología e innovación, FONACIT (Proyecto No. 2002000500).

REFERENCIAS

- Abderkarim M., Lambot M. A., Stewart I. J., Detournay O., Noel J. Ch., Carlier Y. & Truyens C. (2002). Acute *Trypanosoma cruzi* infection in mouse induced infertility or placental parasite invasion and ischemic necrosis associated with massive fetal loss. *Am. J. Patol.* **161**: 673-680.
- Aché A. (1993a). Prevalencia de infección humana por *Trypanosoma cruzi* en Bancos de Sangre de Venezuela. *Rev. Med. Trop. São Paulo.* **35**: 233-245.
- Aché A. (1993b). Programa de control de la Enfermedad de Chagas en Venezuela. *Bol. Dir. Malariol. San Amb.* **33**: 11-22.
- Alarcón M., Lugo de Yarbuh A., Moreno E., Araujo M. & Araujo S. (2003). *Enfermedad de Chagas congénita: Hallazgo de T. cruzi en el líquido amniótico de ratas Wistar gestantes con infección aguda*. LIII Convención Anual de AsoVAC: 231.
- Andrade S.G. (1982). The influence of the strain of *Trypanosoma cruzi* in placental infections in mice. *Trans. Roy. Trop. Med. Hyg.* **76**: 123-128.
- Andrade S. G. (1992). Epidemiologic research in congenital *T. cruzi* infection. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **89**: 32.
- Andrade A. L., Zicker F. & Martelli C. M. (1994). Método epidemiológico na investigação congênita pelo *Trypanosoma cruzi*. *Cad. Saúde Publ.* (Rio de Janeiro), **10 Supl. 2**: 345-351.
- Altemani A., Bittencourt A. & Lana A. (2000). Immunohistochemical characterization of the inflammatory infiltrate in placental Chagas' disease: a qualitative and quantitative analysis. *Am. J. Trp. Med. Hyg.* **62**: 319-324.
- Azogue E. & Darras C. (1995). Chagas congénito en Bolivia: estudio comparativo de la eficacia y el costo de los métodos de diagnóstico. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **28**: 39-43.
- Barousse A. P., Eposto M. O., Mandel S. & Sousa-Martinez F. (1978). Enfermedad de Chagas congénita en área no endémica. *Medicina* (B. Aires) **38**: 611.

- Bittencourt A. (1992). Possible risk factors for vertical transmission of Chagas' disease. *Rev. Inst. Trop. São Paulo*. **34**: 403-408.
- Bittencourt A. L. (2000). Transmissão vertical da doença de Chagas. En: Brener Z, Andrade ZA, Barral-Neto M. Eds. *Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas*, 2a Edc. Guanabara Koogan, Brasil, p: 16.
- Brener Z. (1962). Observações sobre a imunidade a superinfecções em camundongos experimentalmente inoculados con *Trypanosoma cruzi* e submetidos a tratament. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*. **4**: 119-123.
- Camandaroba E. L., Pinheiro C. M. & Andrade S. (2002). Oral transmission of Chagas' disease: importance of *Trypanosoma cruzi* biodeme in the intragastric experimental infection. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*. **44**: 97-103.
- Camargo M. (1966). Fluorescent antibody test for serodiagnosis. Technical modification employing preserved culture forms of *Trypanosoma cruzi* in slide test. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*. **8**: 227-234.
- Carlier Y., Rivera M. T., Truysens C., Ontivero M., Flament J., Van Marck E. & De Maertelaer V. (1992). Chagas' disease decreased resistane to *Trypanosoma cruzi* acquired infection in offspring of infected mice. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **46**: 116-122.
- Carlier Y. & Truysens C. (1999). Influence of maternal infection on off-spring resistance towards parasites. *Parasitol. Today*. **11**: 405-408.
- Carraro-Abrahão A. A., Lopes R. A., Salas M. A., Ribeiro R. D., Prado Jr. J. C., Alburquerque S. & Garcia T.A. R. (2000). Placental alterations of swiss mice infected with RAL strain of *Trypanosoma cruzi*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. **95 (Suppl. II)**: 122.
- Carrasco H. J., Torrellas A., Garcia C., Segovia M. & Feliciangeli M. D. (2005). Risk of *Trypanosoma cruzi* I (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) transmission by *Panstrongylus geniculatus* (Hemiptera: Reduviidae) in Caracas (Metropolitan District) and neighboring States, Venezuela. *Int. J. Parasitol.* **35**: 1379-1384.
- Chagas C. (1909). Nova trypanosomiasis humana. Estudo sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi*, N. Gen. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. **1**: 159-218.
- Chagas C. (1911). Nova entidade morbida do homen. Resumo general dos estudos etiologicos e clinicos. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. **3**: 219.
- Dao L. (1949). Otros casos de enfermedad de Chagas en el estado Guárico (Venezuela): formas agudas y crónicas; observación sobre enfermedad de Chagas congénita. *Rev. Policlin. Caracas*, **17**: 17-32.
- Davila H. O., Revelli S. S. & Moreno H. S. (1994). Infection with *Trypanosoma cruzi* during pregnancy in rats and a decrease in chronic myocardial lesion in their infected offspring. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **50**: 506-511.
- Delgado M.A. & Santos-Buch C.H.A. (1978). Transplacental transmission and fetal parasitosis of *Trypanosoma cruzi* in outbred white mice. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **27**: 1108-1115.
- Elói-Santos S. M., Novato-Silva E., Maselli V. M., Gazzinelli G., Colley D. G. & Correa-Oliveira R. (1989). Idiotypic sensitization in utero of children born to mothers with schistosomiasis or Chagas' disease. *J. Clin. Invest.* **84**: 88-93.
- Frank F., Sartori M. J., Asteggiano C., Lin S., de Fabro S. P. & Fretes R. E. (2000). The effect of placental subfractions on *Trypanosoma cruzi*. *Exp. Mol. Pathol.* **69**: 144-151.
- Gitlin D. & Koch C. (1988). On the mechanism of maternofetal transfer of human albumin and G-globulin in the mouse. *J. Clin. Invest.* **47**: 1204-1208.
- Gonzalez-Cappa S. M., Mirkin G. A., Solana M. E. & Tekiel V.S. (1999). *Patología por Trypanosoma cruzi ¿Cepa dependiente?*. Simposio internacional. Academia Nacional de Medicina. Buenos Aires.
- Guzmán B., García G., Floriani V., Guerrero M., Torres C., Ramírez M. (1998). Riesgo de transmisión por

- Trypanosoma cruzi* por transfusión de sangre en México. *Rev. Panam. Salud Pública*. **4**: 94-99.
- Herrera L. & Urdaneta-Morales S. (1992). *Didelphis marsupialis*: a primary reservoir of *Trypanosoma cruzi* in urban areas of Caracas, Venezuela. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **68**: 607-612.
- Herrera L., Urdaneta-Morales S. & Carrasco H. (2003). *Trypanosoma cruzi*: Behavior of metatrypomastigotes from *Didelphis marsupialis* and *Panstrongylus geniculatus*. *Rev. Cient. FCV-LUZ*. **13**: 307-311.
- Kleinbaum D., Kupper L., Muller I. & Nizan A. (1998). *Applied regression analysis and other multivariable method*. 3ra Ed. Duxbury Press. An Internacional Thomson Publishing Company, Boston.
- Lugo A. (1973). *Influencia de la ruta de inoculación de tripomastigotes de Trypanosoma cruzi sobre el desarrollo de la parasitemia en ratones albinos y alopécicos*. Postgrado en Parasitología. Enfermedad de Chagas. Universidad de los Andes, Mérida. Venezuela. p: 68-96.
- Marquez de Araujo S., Rivera M. T., El Bouhdidi A., de Maertelaer V. & Carlier Y. (1996). Maternal *Trypanosoma cruzi*-specific antibodies and worsening of acute infection in mouse offspring. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **54**: 13-17.
- Meckert P. C., Chambo G. J. & Laguens R. P. (1980). Enfermedad congénita secundaria a la infección crónica del ratón con *Trypanosoma cruzi*. *Medicina* (B. Aires), **40**: 40-44.
- Mjihdi A., Lambot M. A., Stewart I. J., Detournay O., Noël J. Ch., Carlier Y. & Truysens C. (2002). Acute *Trypanosoma cruzi* infection in mouse induces infertility or placental parasite invasion and ischemic necrosis associated with massive fetal loss. *Am. J. Pathol.* **161**: 673-680.
- Moreno E., Moreno S. & Zassa V. (1998). Transplacental transmission of *Trypanosoma cruzi* in rat with acute infection. 47 th Annual Meeting. *Am. J. Soc. Trop. Med. Hyg. San Juan Puerto Rico*. **59**: 639.
- Moreno E.A., Rivera I.M., Moreno S.C., Alarcón M.E. & Lugo-Yarbuh A. (2003). Transmisión vertical de *Trypanosoma cruzi* en ratas Wistar durante la fase aguda de la infección. *Invest Clin*. **44**: 241-254.
- Moreno E. A., Quintero A. C. & Araujo S. (2003b). Efectos de la infección chagásica aguda en ratones NMRI durante la gestación. *Acta Cientif. Vzolana*. **54 (Supl.1)**: 227.
- Moreno E., Méndez M., Alarcón M., Araujo S. & Lugo de Yarbuh A. (2005). Reactivación de la infección chagásica en ratas Wistar gestantes. *Kasmera*. **33**: 51-63.
- Moretti E., Basso B., Castro I., Carrizo M., Chaul M., Barbieri G., Canal D., Sartori M. & Carrizo R. (2005). Chagas' disease: Study congenital transmission in cases of acute maternal infection. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **38**: 53-55.
- Neves S. F., Elói-Santos S., Ramos R., Rigueirinho S., Gazzinelli G. & Correa-Oliveira R. (1999). In utero sensitization in Chagas' disease leads to altered lymphocyte phenotypic patterns in the newborn cord blood mononuclear cells. *Parasit. Immunol.* **21**: 631-639.
- Nilo M. E., Alvarado J., Ramírez M. & Espejo E. (2000). Hallazgo de tripomastigotes en estudio citoquímico de líquido amniótico. *Parasitol. al día* **24**: 49-51.
- Pifano F. (1986). El potencial enzoótico del complejo *Schizotrypanum cruzi-Didelphis marsupialis-Panstrongylus geniculatus* y sus incursiones a la vivienda humana del Valle de Caracas, Venezuela. *Bol. Acad. Cienc. Fis. Mat. Nat. Caracas*. **46**: 9-37.
- Sacks G., Sargent I. & Redman C. (1999). An innate view of human pregnancy. *Immunol. Today*. **20**: 114-118.
- Sala M. A., Lopes R. A., Carrazo-Abrahão A. M. & Meneguette C. (2006). Effect of the acute infection by *Trypanosoma cruzi* intrauterine growth of the mouse fetuses. *Parasitol Latinoam*. **61**: 69-73.
- Schijman A., Vigliano C., Burgos J., Favaloro R., Perrone S. & Laguens R. (2000). Early diagnosis of recurrent of *Trypanosoma cruzi* infection by Polymerase Chain Reaction after heart

- transplantation of a Chronic Chagas' Heart Disease Patient. *J. Heart Lung Transplant.* **19**: 1114-1117.
- Schuster G. & Schaub G. (2000). *Trypanosoma cruzi*: skin-penetration kinetics of vector-derived metacyclic trypomastigotes. *Int. P. Parasitol.* **30**: 1475-1479.
- Scrimshaw N. S. & Schürch B. (1998). Causes and consequences of intrauterine growth retardation. *Eur. J. Clin. Nutr.* **52 (Suppl 1)**: S1-S103.
- Sell P. & Burton M. (1981). Identification of Leishmania amastigotes and their antigens in formalin fixed tissue by immunoperoxidase staining. *Trans. Roy Soc. Trop. Med. Hyg.* **75**: 461-468.
- Shearer G. M. & Clerici M. (1996). Protective immunity against HIV infection: has nature done the experiment for us?. *Immunol. Today.* **17**: 21-24.
- Stiehm E. R., Vaerman J. P. & Fudenberg H. H. (1966). Plasma infection in immunologic deficient state. Metabolic and therapeutic studies. *Blood.* **28**: 918.
- Szarfman A., Urman J., Otalora A., Largaia A. & Yanovsky J.F. (1975). Specific agglutinins and immunoglobulins levels in congenital Chagas infection. *Medicina (B. Aires).* **35**: 245.
- Tomlinson S., Pontes de Carvalho L. C., Vandekerckhove F. & Nussenzweig V. (1994). Role of sialic acid in the resistance of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes to complement. *J. Immunol.* **153**: 3141-3147.
- Umekita I. F. & Mota I. (2000). How are antibodies involved in the protective mechanism of susceptible mice infected with *T. cruzi*?. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **33**: 253-258.
- Waynforth H.B. & Flecknell P.A. (1992). Experimental and surgical technique in the rat. Academic Press Limited. London.
- Werner H. & Kunert H. (1958). Über die ursache von congenitale protozoen-infektionen. *U. Tropenmed. Parasit.* **9**: 17.
- Xu C., Mao D., Holers V. M., Palanca B., Cheng A. M. & Molina H. A. (2000). Critical role for murine complement regulator in fetomaternal tolerance. *Science*, **287**: 498-501.

Recibido el 21/03/2006
Aceptado el 05/10/2006

Investigaciones sobre la transmisión vertical de *Trypanosoma cruzi* en ratas Wistar crónicamente infectadas

Elio A. Moreno^{1*}, Arelis C. Quintero¹, Marítza E. Alarcón¹, Ana Lugo de Yarbuh¹,
Stelliana C. Moreno¹, Sonia Araujo A.¹ & Rafael Borges²

Se presentan los resultados de un estudio experimental sobre la posible transmisión vertical de *Trypanosoma cruzi* en ratas albinas (*Rattus norvegicus*) cepa Wistar crónicamente infectadas. El curso de la infección fue evaluado antes del apareamiento, durante la gestación y después del parto mediante pruebas de diagnóstico parasitológico, inmunológico e histopatológico. Como controles se utilizaron ratas vírgenes infectadas y sanas gestantes. Los exámenes directos en muestras de sangre, hemocultivos y xenodiagnósticos realizados a las madres y a las crías, no presentaron parasitemias patentes y/o subpatentes. Exámenes serológicos realizados con la IFI y ELISA a las ratas vírgenes infectadas (A), gestantes infectadas (B) y a las crías, revelaron anticuerpos específicos anti-*T. cruzi* en el 100 % de las madres infectadas, 26,2 y 44,6 % de las crías y 41,6 y 83,3 % de las crías sanas que fueron alimentadas sobre madres infectadas. El estudio minucioso de las muestras frescas y de cultivo de líquido amniótico, no mostró formas flageladas de *T. cruzi*. El estudio histopatológico reveló discreta miocarditis, miositis y vellositis con características de cronicidad, acompañada de nidos de amastigotes de *T. cruzi* a nivel del músculo cardíaco, esquelético y en el estroma de una placenta; moderado infiltrado inflamatorio sin parasitismo en útero, cordón umbilical y glándulas mamarias. La persistencia de nidos de amastigotes de *T. cruzi* en el corazón, músculo esquelético y en una placenta de ratas con infección chagásica crónica, sugiere la posibilidad de infección fetal. La patogenicidad de la cepa, formas del parásito utilizado y el tamaño del inóculo, pudieran ser factores que inciden en las variaciones observadas en la transmisión vertical de *T. cruzi*.

Palabras claves: *Trypanosoma cruzi*, transmisión vertical, rata Wistar, infección crónica.

INTRODUCCIÓN

Trypanosoma cruzi (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) agente etiológico de la infección chagásica, puede ser transmitido de la madre al hijo por vía transplacentaria y por el amamantamiento, durante las fases aguda y/o crónica de la infección materna (Bittencourt, 2000). La posibilidad de transmisión congénita de la infección fue referida por Chagas (1911) y su comprobación fue atribuida a Dao (1949), quien observó formas sanguíneas de *T. cruzi* en la sangre periférica de un niño recién nacido de madre con enfermedad de Chagas agudo. A partir de ese momento, otros casos congénitos se han

descrito en Venezuela y en otros países del Continente Americano (Howard, 1957; Rassi *et al.*, 1958; Pifano, 1960; Bittencourt, 1972; Schmunis & Szafrman, 1977; Azogue *et al.*, 1985; Ponce & Ponce, 1995; Torrico *et al.*, 2004; 2006). Bittencourt *et al.* (1988) señalan que la prevalencia de la infección por *T. cruzi* en mujeres embarazadas en Sudamérica, varía entre 2 y 51 % en centros urbanos y de 23 a 81 % en áreas endémicas para la enfermedad de Chagas. Las madres infectadas asintomáticas pueden transmitir la infección a sus hijos a través de la placenta y ocasionalmente por la lactancia. Hasta el presente se desconocen las causas por las cuales esta incidencia es tan baja, así como los diferentes factores que influyen para que una misma madre genere algunos hijos infectados y otros no (Bittencourt, 2000; Blanco *et al.*, 1999).

La transmisión congénita de *T. cruzi* ha sido investigada en diferentes modelos animales, con el objeto de clarificar aspectos relacionados con este mecanismo de transmisión. Los primeros trabajos

¹ Laboratorio de Parasitología Experimental (LAPEX), Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, ULA - Mérida.

² Departamento de Estadística, Facultad de Economía, Universidad de los Andes, Mérida 5101, Venezuela.

*Autor de correspondencia: emorenob@ula.ve

experimentales fueron realizados por Mayer & Rocha-Lima (1914) quienes formularon la hipótesis de la transmisión placentaria al encontrar nidos de amastigotes de *T. cruzi* en las placentas de cobayos experimentalmente infectados, sin observar alteraciones en las crías. A partir de entonces, otras investigaciones efectuadas en ratones (Delgado & Santos-Buch, 1978; Andrade, 1982; Abdelkarim *et al.*, 2002; Moreno *et al.*, 2003a), conejos (Villela, 1923), perros (Souza-Campos, 1928) y monos (Sullivan *et al.*, 1994), han demostrado transmisión congénita del parásito durante la fase aguda de la infección a un número reducido de crías.

Estudios experimentales llevados a cabo en la rata albina (*Rattus norvegicus*), cepa Wistar, machos y hembras, producidas por la inoculación intraperitoneal de formas sanguícolas de la cepa Y de *T. cruzi*, demostraron que la misma constituye un modelo apropiado, que reproduce con gran semejanza: el espectro patológico que predomina en la enfermedad de Chagas aguda (Scorza, 1980) y los mecanismos de transmisión congénita del parásito durante la fase aguda de la infección chagásica (Moreno *et al.*, 2006). Partiendo de esta premisa, el presente trabajo tiene como objetivo investigar si este mecanismo de transmisión vertical de *T. cruzi* ocurre en ratas con infección chagásica crónica. El curso de la infección fue evaluado antes, durante la gestación y después del parto, mediante un estudio parasitológico, inmunológico e histopatológico en las ratas crónicamente infectadas con *T. cruzi* y en sus crías.

MATERIALES Y MÉTODOS

Parásitos

Se utilizaron parásitos de la cepa Y de *T. cruzi* (Pereira da Silva & Nussenzweig, 1953) de referencia internacional y cedida por la Cátedra de Parasitología de la Universidad de Carabobo, Valencia-Venezuela, y mantenidos en nuestro laboratorio por pasajes seriados en triatominos (*Rhodnius prolixus*), cultivos *in vitro* y en ratones NMRI. Las formas sanguícolas de *T. cruzi* fueron obtenidas por cardiopuntura con jeringas heparinizadas, a partir de ratones experimentalmente infectados con altas parasitemias. La sangre fue mezclada con PBS pH 7,2 y el número de parásitos fue cuantificado siguiendo la metodología

descrita por Brener (1962), mediante el conteo de los tripomastigotes en 5 mm³ de la suspensión sanguínea.

Infección experimental

De un total de 30 ratas hembras de 20 días de nacidas y con un peso promedio de 50 gr, 20 fueron inyectadas intra-dérmicamente en el miembro inferior derecho con un inóculo aproximado de 1x10⁵ tripomastigotes sanguícolas contenidos en un volumen de 0,1 mL de la suspensión. Las 10 ratas juveniles restantes sanas, utilizadas como grupo control, fueron inyectadas por vía intra-dérmica con 0,1 mL de solución fisiológica salina. Ambos grupos de ratas fueron mantenidas en jaulas separadas en nuestro bioterio experimental bajo condiciones ambientales controladas y alimentadas con dieta comercial (ratarina) y agua *ad libitum*.

Estimación de la infección y apareamiento

A las ratas adultas que cursaban la fase crónica de la infección, se les practicaron exámenes parasitológicos (directos en sangre periférica e indirectos tales como: xenodiagnóstico utilizando ninfas de IV estadio de *R. prolixus* y hemocultivo en medio de cultivo NNN-USAMRU (Walton *et al.*, 1972) adicionada con solución fisiológica salina como fase líquida) y serológicos siguiendo los procedimientos indicados por Moreno *et al.* (2003b). Inmediatamente después, las ratas infectadas y controles sanas fueron separadas en tres grupos: Un grupo control infectado (A) de 8 ratas vírgenes, un grupo (B) de 12 ratas infectadas y un grupo control sano (C) de 10 ratas. Las ratas de los grupos B y C en etapas de proestrus y/o estrus de su ciclo estral, fueron apareadas con machos en una relación de 2 hembras/1 macho por jaula. Una vez comprobados los espermatozoides en el lavado vaginal, las ratas infectadas y controles sanas preñadas, fueron colocadas en jaulas individuales en el bioterio experimental bajo las mismas condiciones ambientales señaladas.

Estimación parasitológica durante la gravidez

La parasitemia fue evaluada en forma individual en las ratas infectadas mediante el examen directo de muestras de sangre extraída con capilares heparinizados, por punción del plexo retro-orbital a los 6, 12 y 20 días de la gravidez y a los 15 días después del parto normal, utilizando el método modificado de

Brener (1962) y el microhematócrito como método de concentración (Freilij *et al.* 1983).

Detección de anticuerpos humores

Los métodos serológicos empleados para apreciar los niveles de anticuerpos (Ac) específicos anti-*T. cruzi* en los sueros de las madres infectadas, en las ratas no preñadas infectadas y en las crías, fueron las técnicas de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) y el Ensayo Inmunoenzimático (ELISA). Para estas pruebas, se utilizó 0,5 y 1 mL de sangre extraída del plexo retro-orbital de cada animal y los sueros separados por centrifugación fueron congelados a -20 °C hasta su uso. El antígeno empleado se preparó con formas de cultivo de la cepa Y de *T. cruzi*, colectadas en fase exponencial de crecimiento en el medio de cultivo NNN, siguiendo los procedimientos descritos por Camargo (1966) y Voller *et al.* (1975).

Transmisión de T. cruzi transplacentaria y por el amamantamiento

Al término de la gestación las ratas del grupo B fueron separadas en tres subgrupos: a 4 ratas (B1) se les permitió el parto normal con el objeto de investigar transmisión transplacentaria del parásito; 4 ratas (B2) se les permitió el parto normal, pero sus crías recién nacidas fueron intercambiadas por crías recién nacidas de ratas sanas, con la finalidad de investigar la transmisión de *T. cruzi* a través de la leche durante la lactancia y las 4 ratas infectadas (B3) restantes, junto con 3 ratas gestantes sanas fueron sacrificadas para buscar tripomastigotes del parásito en el líquido amniótico y alteraciones histopatológicas a nivel del corazón, músculo esquelético, útero grávido, cordón umbilical, glándulas mamarias y placentas.

Evaluación parasitológica de las crías

Muestras de sangre extraída de la cola de cada una de las crías juveniles amamantadas por sus madres biológicas infectadas y las alimentadas por nodrizas sanas, fueron examinadas a los 10, 20 y 30 días de nacidas, con el fin de detectar parasitemias patentes. Igualmente, parasitemias ocultas o subpatentes fueron investigadas después del último muestreo, mediante exámenes parasitológicos indirectos como el hemocultivo en medio NNN y el xenodiagnóstico con ninfas de *R. prolixus*. Para tal fin, 0,3 mL de sangre obtenida con capilares heparinizados del plexo ocular

de cada cría juvenil, fue mezclada con la solución fisiológica salina contenida en tubos con medio de cultivo NNN. Los hemocultivos fueron mantenidos en estufa a 26 °C y revisados a los 15, 30 y 45 días después de la adición de la sangre.

Para la aplicación de xenodiagnósticos, 10 ninfas de *R. prolixus* se alimentaron hasta la repleción sobre cada una de las madres infectadas y sus crías inmovilizadas dentro de una malla de plástico. Las ninfas fueron mantenidas en el insectario experimental y 30 días después de la ingesta sanguínea, las heces de los triatominos obtenidas individualmente mediante compresión abdominal, fueron examinadas al microscopio con el objeto de precisar la presencia de formas flageladas de *T. cruzi*.

Evaluación parasitológica del líquido amniótico (LA)

Las ratas infectadas del grupo B3 y 3 ratas sanas (A) a término de la gestación fueron sacrificadas por hiperanestesia con éter dietílico. En el momento del sacrificio, se extrajo cuidadosamente el útero grávido con sus órganos anexos, el cual fue lavado sobre una cápsula de Petri con solución fisiológica salina y cuidadosamente secado con papel adsorbente a fin de eliminar restos sanguíneos procedentes de las venas y arterias uterinas para evitar cualquier contaminación. Con una pipeta Pasteur se hizo una pequeña incisión sobre la membrana en cada cuerno uterino a nivel de los fetos. Se recolectaron varias muestras de LA, una para ser examinada bajo el microscopio y las otras fueron depositadas en un recipiente estéril con la finalidad de conformar un "pool". Entre 0,3 y 0,5 mL del pool de LA/rata fue adicionado a 2 tubos con medio de cultivo NNN y revisados a los 15, 30 y 45 días después de la adición de la muestra.

Estudio histopatológico

Las incisiones sobre la membrana uterina fueron ampliadas para extraer los fetos unidos por el cordón umbilical a sus placentas. Al mismo tiempo, se extrajo el corazón completo que fue cortado frontalmente en dos partes, fragmentos de músculo esquelético poplíteo, útero grávido y el sexto par de glándulas mamarias. Los tejidos fueron fijados en formalina neutra al 10 % durante 48 horas e incluidos en Paraplast (Monoject Scientific, St. Louis, MO. USA). Los cortes de 6 µm de espesor se hicieron en

un microtomo American Optical Spencer y fueron coloreados por los métodos de Giemsa-Pappenheim-colofonio (Bray & Garnham, 1962) y hematoxilina-eosina (HE). Igualmente, fueron sacrificadas por sobreenestesia con éter dietílico las crías juveniles provenientes de las madres chagásicas, junto con las crías sanas que fueron amamantadas sobre ratas infectadas y las crías de las ratas controles restantes. De cada una de las crías se extrajo el corazón completo que fue cortado frontalmente en dos partes iguales y fragmentos de la musculatura esquelética.

Análisis estadístico

Los títulos de anticuerpos anti-*T. cruzi* obtenidos con las técnicas serológicas empleadas (IFI y ELISA), fueron examinados mediante un análisis de variancia en una vía (Kleinbaum *et al.*, 1998). Las diferencias en los promedios de cada variable según los grupos y tiempos fueron considerados estadísticamente significativos con valores de $P < 0,001$.

RESULTADOS

Parasitemias

Los exámenes directos de muestras de sangre, hemocultivos y xenodiagnósticos realizados a cada una de las ratas con infección chagásica crónica, antes del apareamiento, durante el período de gestación y a los 15 días después del parto, no mostraron parasitemias patentes o subpatentes. Igualmente, resultaron negativas a las pruebas de diagnóstico parasitológico las 103 crías juveniles provenientes de las 8 ratas infectadas de los grupos B1 y B2 y amamantadas hasta el destete por sus madres

biológicas y por nodrizas sanas, así como las 12 crías juveniles de madres sanas que fueron amamantadas por madres infectadas del grupo B2.

Presencia de anticuerpos

Las pruebas serológicas realizadas a las ratas vírgenes infectadas (A) y a las ratas chagásicas gestantes (B) antes del apareamiento, durante la gravidez y a los 15 días después del parto, mostraron títulos específicos anti-*T. cruzi* $> 1:32$ para la IFI y densidad óptica (DO) $> 0,35$ para la ELISA, considerándose en ambos casos el 100 % de las ratas seropositivas. Los títulos de Ac obtenidos con la IFI durante el período de gestación, se analizaron mediante un gráfico que representa la mediana en cada tiempo y en cada grupo $\pm$ DT, observándose diferencias significativas en los títulos entre los tiempos ($P < 0,001$) (Fig. 1). Igualmente, los valores de DO obtenidos con la ELISA, mostraron diferencias significativas en los tiempos ($P = 0,03356$) y no en los grupos ($P = 0,2899$). En cuanto a los exámenes serológicos efectuados a las crías, las pruebas realizadas con ambas técnicas presentaron porcentajes variables de seropositividad desde un 26,2 y 44,6 % para las crías nacidas de madres chagásicas y 41,6 y 83,3 % para las crías sanas que fueron amamantadas por madres infectadas (Tabla I). Los sueros procedentes de las ratas sanas y de sus crías no mostraron reactividad alguna.

Valoración del líquido amniótico y alteraciones histopatológicas

En los exámenes microscópicos directos realizados a las muestras de líquido amniótico de las ratas infectadas sacrificadas a término de la gestación, y en los cultivos *in vitro*, no se apreciaron

Tabla I. Variación en los títulos de anticuerpos anti-*T. cruzi* en ratas crónicamente infectadas, gestantes y en su progenie.

Parámetros			Técnicas serológicas		
Sueros	N° de animales	(%)	Título (IFI)	(%)	DO (ELISA)
Ratas gestantes	12	100	1:64 - 1:2048	100	0,35 - 0,60
Crías de mch*	103	27/103 (26,2)	1:64 - 1:512	46/103 (44,0)	0,35
Crías de ms** amamantadas por mch*	12	5/12 (41,6)	1:64 - 1:128	10/12 (83,3)	0,35

* = madres chagásicas; ** = madres sanas; IFI = Inmunofluorescencia Indirecta; ELISA = Ensayo Inmunoenzimático; DO = densidad óptica

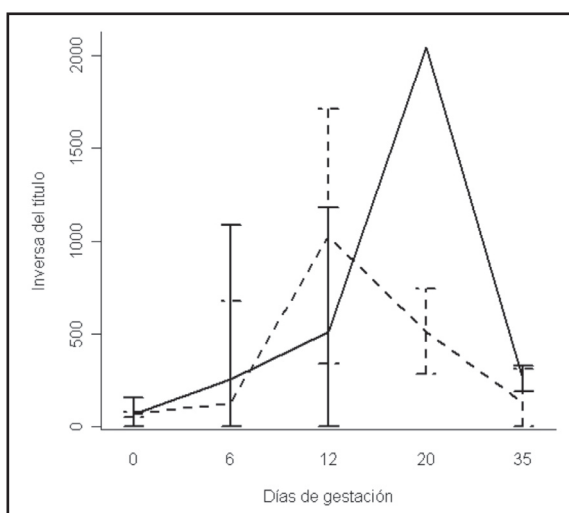


Fig. 1. Títulos de anticuerpos anti-*T. cruzi* detectado en sueros de ratas crónicamente infectadas con formas sanguíneas del parásito, antes del apareamiento (0), durante la gestación (6, 12 y 20) y 14 días después del parto normal (35). (— Ratas gestantes; ---- Ratas vírgenes)

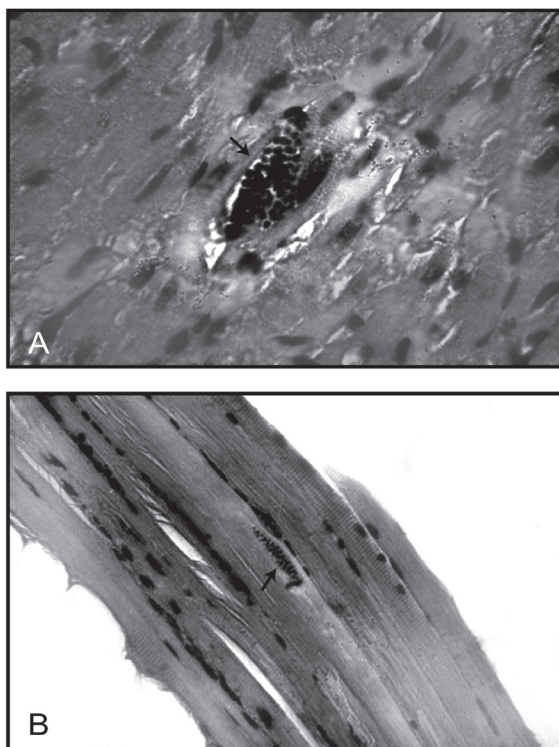


Fig. 2. Persistencia parasitaria en cortes de corazón (A) y músculo esquelético (B) de ratas Wistar crónicamente infectadas con la cepa Y de *T. cruzi*. Observe áreas de inflamación focalizadas de naturaleza mononuclear (Giemsa-Colofonio, 1000X, 400X).

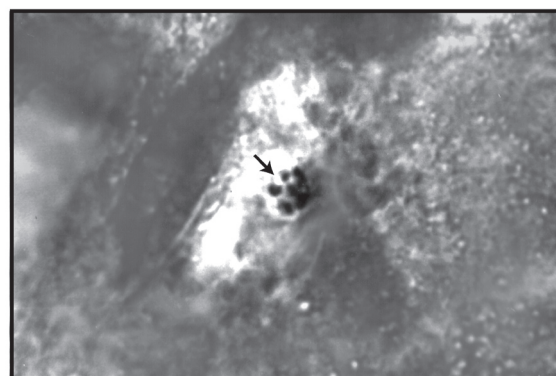


Fig. 3. Persistencia parasitaria en cortes de placenta de una rata Wistar crónicamente infectada con la cepa Y de *T. cruzi*, a término de la gestación (HE, 1000X).

formas flageladas de *T. cruzi*. Por otro lado, el análisis histopatológico de los órganos maternos reveló a nivel del corazón y músculo esquelético moderada miocarditis y miositis focal de variable intensidad, destrucción de algunas fibras musculares con discreta fibrosis en la masa muscular y persistencia escasa de nidos de amastigotes (Fig. 2 A, B). El útero grávido mostró distensión de las fibras musculares lisas, discreto infiltrado celular sin parasitismo y abundantes eosinófilos. En las secciones del cordón umbilical se observó un discreto infiltrado celular en el tejido mucoso de Wharton y en las tunicas media y adventicia de las arterias y venas umbilicales. En los cortes de glándulas mamarias no observamos alteraciones apreciables ni presencia de parásitos en los alveólos, conductos excretores y en el tejido conectivo inter e intralobulillar. Las células alveolares mostraron citoplasma altamente basofílico y secreciones con presencia de macrófagos en los conductos alveolares. En los cortes de las placentas se observaron focos inflamatorios a nivel del estroma vellosito placentario y en las placas coriónica y desidual. En una placenta se evidenció un nido de amastigotes a nivel del estroma y vellositis de variable intensidad (Fig. 3).

El estudio histopatológico de los cortes de corazón y músculo esquelético de las crías juveniles, nacidas de madres con infección chagásica crónica y de las 12 crías de madres sanas amamantadas por madres infectadas, mostraron en algunas secciones discretos focos inflamatorios y ausencia de parasitismo tisular. Los cortes del corazón, músculo esquelético y las placentas de madres sanas no presentaron alteraciones histopatológicas apreciables.

DISCUSIÓN

Los métodos de diagnóstico parasitológico empleados en las ratas infectadas con *T. cruzi*, durante el desarrollo de la investigación, revelaron ausencia de parasitemias patentes y/o subpatentes, lo que indica que en la fase crónica de la infección chagásica hay un control sobre la liberación de parásitos al torrente sanguíneo. Estos resultados corroboran las observaciones publicadas por Moreno *et al.* (2005) quienes estudiando la reactivación de la infección chagásica en ratas gestantes crónicamente infectadas con formas metacíclicas de *T. cruzi* DSM, no detectaron exacerbación de parasitemias en la sangre. Sin embargo, observaron cambios apreciables en la respuesta inmunológica caracterizados por una disminución en los niveles de IgG y un incremento significativo de la IgM, signos característicos de una reactivación de la infección chagásica aguda. Estos cambios en la respuesta inmunológica probablemente sean los responsables de la eliminación de las formas sanguíneas del parásito. No obstante, Bittencourt (1992) señaló que mujeres en estado crónico de la enfermedad de Chagas, desarrollan embarazos aparentemente normales, presentando pocas evidencias que indiquen cambios en la respuesta inmune o reflejen recrudescimiento de la enfermedad de Chagas.

En cuanto a la transmisión vertical de *T. cruzi*, algunos autores han referido casos congénitos de madres que presentaban importantes manifestaciones clínicas producidas por la infección chagásica tanto en la fase aguda (Dao, 1949; Jörg, 1954; Howard, 1957; Pifano, 1960) como en la fase crónica (Rassi *et al.*, 2004).

En animales experimentales los resultados han sido contradictorios, Souza-Campos (1928) demostró transmisión congénita del parásito en perras durante esta fase de la infección. Por otra parte, Apt *et al.* (1967) investigaron este mecanismo de transmisión en ratas con infección aguda y crónica. Los autores señalaron que a pesar de obtener infección en las ratas madres, no observaron infección congénita en las crías, lo que podría deberse a la resistencia natural de la rata a la infección por *T. cruzi*. Por otra parte, Carlier *et al.* (1987), Marques de Araujo & Chiari (1996) trabajando con ratones crónicamente infectados con *T. cruzi*, y Jansen *et al.* (1994) con faros (*Didelphis marsupialis*), no observaron este

mecanismo de transmisión del parásito a su progenie. La única referencia de infección congénita en ratones en fase crónica, es la de Cunio *et al.* (1980), quienes observaron formas amastigotas en el tejido fetal.

La transmisión vertical de la infección chagásica es mayor durante la fase aguda por la presencia de tripomastigotes en la sangre materna. Se ha señalado que el parásito invade y se multiplica en las células de Hofbauer de la placenta, que los tripomastigotes son liberados posteriormente y pueden alcanzar al embrión o feto por vía hematogénea (Bittencourt, 2000). Este mecanismo de transmisión ha sido investigado en animales experimentalmente infectados con diferentes cepas de *T. cruzi*, variando el inóculo y la forma del parásito. Dávila *et al.* (1994) trabajando con ratas endogámicas infectadas con 1×10^6 tripomastigotes sanguíneos de *T. cruzi* durante la gestación, demostraron que 5/67 (7,5 %) de las crías procedentes de madres infectadas presentaron parasitemias patentes y 5/15 hemocultivos positivos. Igualmente, Moreno *et al.* (2003b) empleando inóculos bajos de 1×10^4 formas metacíclicas de *T. cruzi* de origen canino, observaron transmisión vertical del parásito en 4/44 (9,1 %) crías procedentes de ratas que cursaban esta fase aguda de la infección chagásica. La transmisión vertical también ha sido observado en ratones C3H (Marques de Araujo & Chiari, 1996), ratones C3H/HeN (Solana *et al.*, 2000), ratones NMRI (Moreno *et al.*, 2003a) y en monos (Sullivan *et al.*, 1994). En el presente trabajo, los exámenes parasitológicos efectuados a las crías nacidas y amamantadas por las madres biológicas crónicamente infectadas, no mostraron formas sanguíneas de *T. cruzi* en las muestras de sangre examinadas, a pesar de que en una de las placentas se observó un nido de amastigotes. Estos resultados concuerdan con la opinión de Rassi *et al.* (1958) quienes, aún cuando observaron parásitos en la placenta, no pudieron comprobar la presencia de *T. cruzi* en el recién nacido. Posteriormente, Bittencourt (2000), señaló que la transmisión transplacentaria parece depender de factores ligados al parásito y al hospedador. La autora sugiere que el epitelio trofoblástico que separa la sangre materna del estroma y las vellosidades, además de ofrecer una barrera mecánica, constituye una barrera inmunológica. Por otra lado, se ha señalado que el pasaje transplacentario de *T. cruzi* también depende de la patogenicidad de la cepa y de la actividad fagocítica en la placenta (Delgado & Santos-Buch, 1978).

El otro mecanismo de transmisión de *T. cruzi* investigado, fue a través de la leche durante el amamantamiento. Las crías de madres sanas, que fueron amamantadas hasta el destete por ratas crónicamente infectadas, no presentaron infecciones patentes evidenciables por los métodos de diagnóstico parasitológico utilizados. En vista de la presencia de anticuerpos anti-*T. cruzi* en las crías, podría pensarse que los anticuerpos maternos transferidos pasivamente restringen la parasitemia. Investigaciones llevadas a cabo en mujeres crónicamente infectadas con *T. cruzi* y en animales infectados experimentalmente, no han evidenciado la transmisión del parásito por esta vía (Bittencourt, 1992; Marques de Araujo & Chiari, 1996; Amato Neto *et al.*, 2000; Campos *et al.*, 1988). Bittencourt *et al.* (1988) señalaron que la transmisión de *T. cruzi* a través de la lactancia raramente ocurre aún en casos con enfermedad de Chagas aguda. Igualmente, Miles (1972) había indicado que la transmisión del parásito por la leche materna era extremadamente rara, debido a la dificultad de la transmisión oral. Estas observaciones fueron corroboradas por Pinto *et al.* (1989) y por Moreno *et al.* (2003b) quienes estudiando la transmisión congénita de la infección chagásica aguda en ratones y ratas Wistar, no encontraron evidencias del pasaje de *T. cruzi* a través de este medio.

Anticuerpos humorales anti-*T. cruzi* fueron apreciados en los sueros de las ratas madres crónicamente infectadas. Los títulos de anticuerpos en las ratas gestantes aumentaron significativamente al final de la gestación, regresando después del parto a valores similares a las ratas infectadas no preñadas. Este incremento de los Ac sugiere que se produjeron cambios en la respuesta inmune de la madre, los cuales son potenciados por los efectos paralelos de la gravidez. Igualmente, fueron detectados importantes niveles de anticuerpos específicos en los sueros de las crías nacidas y amamantadas por sus madres biológicas con infección chagásica crónica y en las crías de madres sanas amamantadas por ratas chagásicas.

Con la técnica de ELISA, los valores porcentuales de los títulos de anticuerpos fueron mayores, lo que indica la mayor sensibilidad de la reacción. Estos hallazgos, confirman que hubo transmisión pasiva de anticuerpos maternos anti-*T. cruzi* vía transplacentaria y a través de la leche a su progenie, confiriéndole protección parcial contra

infecciones por *T. cruzi* (Apt *et al.*, 1967; Pinto *et al.*, 1989; Carlier *et al.*, 1992).

El estudio parasitológico del líquido amniótico no reveló formas flageladas del *T. cruzi* en este medio. No obstante, Moreno *et al.* (2003a; 2006) observaron dichas formas en el líquido amniótico de ratones y en ratas en fase aguda de la infección chagásica, tanto en muestras frescas como en el pool sembrado en los tubos de cultivo NNN. Señalan los autores que la presencia de tripomastigotes en este medio, es indicativo de una posible infección fetal. En humanos, se han encontrado formas flageladas de *T. cruzi* en el líquido amniótico de mujeres jóvenes con enfermedad de Chagas y se ha demostrado la transmisión transplacentaria del parásito a sus hijos (Bittencourt *et al.*, 1981; Nilo *et al.*, 2000). Es importante alertar a los médicos y enfermeras sobre la presencia de formas infectivas de *T. cruzi* en este medio, a fin de evitar cualquier contacto con el líquido amniótico durante el momento del parto, principalmente de mujeres procedentes de áreas endémicas para la enfermedad de Chagas.

El estudio histopatológico realizado a los corazones y fragmentos de músculo esquelético de las ratas chagásicas sacrificadas a término de la gravidez, mostraron una miocarditis y miositis focal con características de cronicidad, destrucción de algunas fibras musculares con discreta fibrosis y persistencia de parásitos en el tejido muscular, similar a la descrita por Moreno *et al.* (2005) en ratas Wistar y Añez *et al.* (1999) y Elías *et al.* (2003) en humanos con enfermedad de Chagas crónica. En las secciones del útero grávido se evidenció un moderado infiltrado linfocitario en el miometrio y abundantes eosinófilos; la presencia de estas células sugiere posibles efectos de la infección por *T. cruzi* así como los efectos inducidos por la gravidez.

La persistencia parasitaria también fue evidente en una placenta, en donde se observó un pequeño pseudoquisté a nivel del estroma y vellositis de variable intensidad. La presencia de nidos de amastigotes en la parte vascular de la placenta, sugiere la posibilidad de infección fetal en la fase crónica. Esto es posible que ocurra aunque la placenta actúe como una barrera contra infecciones producidas por varias cepas de *T. cruzi*, aún siendo ellas altamente patógenas (Delgado & Santos-Buch, 1978; Andrade, 1982). Por otro lado, Moreno *et al.*

(2003a) y Carraro-Abrahão *et al.* (2000) observaron en placentas de ratones NMRI y suizos infectados con la cepas RAL y Y de *T. cruzi*, un intenso parasitismo y grandes nidos de amastigotes en el citoplasma de las células gigantes del estroma, así como transmisión vertical a su progenie en la fase aguda de la infección. En placentas humanas se ha descrito una placentitis chagásica, necrosis de las vellosidades del epitelio trofoblástico, intenso parasitismo y células inflamatorias abundantes. Este parasitismo placentario no necesariamente tendría una estricta correlación con la infección fetal, dado que se han observado casos de enfermedad de Chagas congénita sin el hallazgo histológico de *T. cruzi* así como nidación placentaria sin infección fetal (Bittencourt, 2000). Los resultados también confirman las observaciones de Andrade (1982) y Delgado & Santos-Buch (1978), quienes señalaron que cepas de *T. cruzi* de diferente origen, presentan distinto tropismo por la placenta, por lo que la transmisión congénita dependería de la virulencia (capacidad de proliferación) e histotropismo de la cepa del parásito así como de la capacidad fagocítica de los macrófagos de las vellosidades placentarias. Técnicas moleculares han demostrado que diferentes cepas y clones de *T. cruzi* presentan diferencias en tropismo hacia los tejidos del hospedador vertebrado (Vago *et al.*, 1996; 2000; Macedo *et al.*, 2002). De conformidad con esta proposición, la cepa Y de *T. cruzi* mantiene un tropismo placentario evidenciable por los resultados observados, mientras que otras cepas estudiadas en nuestro laboratorio tendrían un bajo o inexistente tropismo placentario, lo cual explicaría en parte la diferencia en la transmisión vertical del parásito (Moreno *et al.*, 2003b; 2005).

La presencia de focos inflamatorios en la masa muscular cardíaca y esquelética de las crías nacidas de madres chagásicas y las crías de madres sanas amamantadas por madres infectadas, posiblemente se deba a la acción de los anticuerpos maternos anti-*T. cruzi* transferidos pasivamente por vía transplacentaria y por la leche materna, más que a la presencia de tripomastigotes de *T. cruzi*, ya que estas formas parasitarias no fueron detectadas a través de los exámenes parasitológicos empleados.

Es importante señalar que dada la posibilidad de control de la transmisión vectorial, la transmisión vertical adquiere más importancia, ya que en los países donde se ha controlado o no hay transmisión vectorial este sería el principal factor, conjuntamente

con la transmisión por transfusiones sanguíneas, de nuevas infecciones por *T. cruzi*. Finalmente, es necesario conocer y entender los factores que pueden incidir en las variaciones observadas en la transmisión congénita del parásito, entre ellos la patogenicidad de la cepa, las formas del parásito y el tamaño del inóculo utilizado.

Research on vertical transmission of *Trypanosoma cruzi* in chronically infected Wistar rats.

SUMMARY

We give the results of an experimental study on possible vertical transmission of *Trypanosoma cruzi* in chronically infected Wistar rats. The progress of the infection was evaluated before, during and after parturition with parasitological, serological and histopathological tests. Infected virgin rats and healthy gestating rats were used as control. Direct parasitological examinations of blood samples, blood cultures and xenodiagnosis carried out on mothers and offspring did not reveal patent or sub-patent parasitemias. At the same time, serological tests with IIF and ELISA on virgin rats (A) and infected gestating rats (B) and offspring showed specific anti-*T. cruzi* antibodies in 100 % of infected mothers and 26.2 and 44.6 % of offspring, while the figures for healthy offspring nursing from infected mothers was 41.6 and 83.3 %. Histopathological tests showed slight parasitic persistence in cardiac, skeletal muscle and in stroma from a placenta; discrete myocarditis and myositis with features of chronicity; moderate inflammatory infiltrate without parasitism in the uterus, umbilical cord and mammary glands. These results suggest that fetal infection is possible in Wistar rats with chronic chagasic infection. There follows a discussion of the factors that might produce the variations noted in congenital *T. cruzi* transmission, including the pathogenicity of the strain, the parasite forms used and the amount inoculated.

Key words: *Trypanosoma cruzi*, vertical transmission, Wistar rat, chronic infection.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo de Desarrollo Científico, Humanístico y Tecnológico de la Universidad de

los Andes por el apoyo financiero a través de los Proyectos C-1184-03-03-A.; al FONACIT: Proyecto S1-20020005001; al Insectario de cría "Dr. Herman Lent" del Departamento de Biología de la Facultad de Ciencias, por el suministro de las ninfas de *R. prolixus*.

REFERENCIAS

- Abdelkarim M., Lambot M.A., Stewart I.J., Detournay J.C.N., Carlier Y. & Truyens C. (2002). Acute *Trypanosoma cruzi* infection in mouse induces infertility or placental parasite invasion and eschismic necrosis associated with massive fetal loss. *Am. J. Pathol.* **161**: 673 – 680.
- Amato Neto V., Lopes M.H., Setsu U.E., de Souza R.M.A.R. & Pinto Dias J.C. (2000). Outras formas de transmissão do *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Pat. Trop.* **29** (Supl.): 115-129.
- Andrade S.G. (1982). The influence of the strain of *Trypanosoma cruzi* in placental infections in mice. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **76**: 123-128.
- Añez N., Carrasco H., Crisanti G., Rojas A., Fuenmayor C., Gonzalez N., et al. (1999). Myocardial parasite persistence in chronic chagasic patients. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **60**: 726-732.
- Apt W., Naquira C., Tejada A. & Strozzi L. (1967). Transmisión congénita del *Trypanosoma cruzi*. II. En ratas con infección aguda y crónica. *Bol. Chil. Parasitol* **23**: 9-15.
- Azogue E. C., La Fuente C. & Darras C. H. (1985). Congenital Chagas' disease in Bolivia: epidemiological aspects and pathological findings. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **79**: 176-180.
- Bittencourt A. L. (1972). Incidência da transmissão congénita da doença de Chagas em abortos. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.* **14**: 257- 259.
- Bittencourt A. L. (1992). Possible risk factors for vertical transmission of Chagas' disease. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.* **34**: 403- 408.
- Bittencourt A. L. (2000). Transmissão Vertical da Doença de Chagas. pp. 16-20. En: *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. Eds. Brener Z., Andrade Z.A. & Barral- Netto M. 2a ed. Guanabara-Koogan., Rio de Janeiro, Brasil.
- Bittencourt A. L., Freitas L. A., Araujo M. O. G. & Jakomo K. (1981). Pneumonitis in congenital Chagas' disease. A study of 10 cases. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **30**: 38- 42.
- Bittencourt A. L., Sadigursky M., Silva A., Menezes C. A., Marianetti M. M., Guerra S. C, et al. (1988). Evaluation of Chagas' disease transmission through breast-feeding. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **83**: 37- 39.
- Blanco S. B., Segura E. L. & Gürtler R. E. (1999). El control de la transmisión congénita de *Trypanosoma cruzi* en la Argentina. *Medicina* (B. Aires). **59** (Supl. II): 138-142.
- Bray R. & Garnham P. C. C. (1962). The Giemsa colophonium method for staining protozoa in tissue section. *Indian J. Malariol.* **16**: 152-155.
- Brener Z. (1962). Observações sobre a imunidade e as superinfecções em camundongos experimentalmente inoculados com *Trypanosoma cruzi* e submetidos a tratamento. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.* **4**: 119-123.
- Camargo M. E. (1966). Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of american trypanosomiasis, technical modification employing preserved culture forms of *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.* **8**: 227- 234.
- Campos R., Pinto P. L., Moreira A. A., Amato Neto V., Duarte M. I., Santana E. et al. (1988). Estudo experimental sobre a transmissão da doença de Chagas por medio do leite. *Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. São Paulo.* **43**: 146- 47.
- Carlier Y., Rivera M.T., Truyen C., Pouissant F. & Milaire J. (1987). Interactions between chronic murine *Trypanosoma cruzi* infection and pregnancy: fetal growth retardation. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **37**: 534-540.
- Carlier Y., Rivera M. T., Truyen C., Ontivero M., Flament J., Van Marck E. et al. (1992). Chagas' disease: decreased resistance to *Trypanosoma cruzi* acquired infection in offspring

- of infected mice. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **46**: 116-122.
- Carrarao-Abrahão A. A., Lopes R. A., Salas M. A., Ribeiro R. D., Prado Jr. J. C., Albuquerque S, *et al.* (2000). Placental alterations of swiss mice infected with RAL strain of *Trypanosoma cruzi* *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **95 (Suppl. II)**: 122.
- Chagas C. (1911). Nova entidade morbida do homen. Resumo geral dos estudos etiologicos e clinicos. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **3**: 219.
- Cunio R. W., Olmos J. A., De Mercau G. T. H., Blanca R. L., De Marteau D., Ontiveros M. I. & Budeguer M. V. (1980). Chagas Mazza congénito experimental. *Medicina* (Buenos Aires), **40 (Suppl I)**: 50 – 55.
- Dao L. (1949). Otros casos de enfermedad de Chagas en el Estado Guárico (Venezuela): formas agudas y crónicas; observación sobre enfermedad de Chagas congénita. *Rev. Policlín. Caracas.* **17**: 17- 32.
- Davila H. O., Revelli S. S., Moreno H. S., Valenti J. L., Musso C., Poli H.O., Morcini J. C. & Bottasso H. O. (1994). Infection with *Trypanosoma cruzi* during pregnancy in rats and a decrease in chronic myocardial lesions in their infected offspring. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **50**: 506- 511.
- Delgado M. A. & Santos-Buch C. H. A. (1978). Transplacental transmission and fetal parasitosis of *Trypanosoma cruzi* in outbred white Swiss mice. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **27**: 1108-1115.
- Elias F. E., Vigliano C. A., Laguens R. P., Levin M. J. & Berek C. (2003). Analysis of the presence of *Trypanosoma cruzi* in the heart tissue of three patients with chronic Chagas' disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **68**: 242- 247.
- Freilij H., Müller L. & Gonzalez Cappa D. (1983). Direct micromethod for diagnosis of acute and congenital Chagas' disease. *J. Clin. Microbiol.* **18**: 327- 330.
- Howard J. E. (1957). Enfermedad de Chagas congénita. *Bol. Chil. Parasitol.* **12**: 42.
- Jansen A., Madeira F. B. & Deane M. P. (1994). *Trypanosoma cruzi* infection in the Opossum *Didelphis marsupialis*: Absence of neonatal transmission and protection by maternal antibodies in experimental infections. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **89**: 41 – 45.
- Jörg M. E. (1954). Trypanosomiasis cruzi congénita mortal en un lactante de 17 días de vida. *El Recién Nacido* (Buenos Aires). **2**: 152-167.
- Kleinbaum D., Kupper L., Müller L. & Nizan A. (1998). *Applied regression analysis and other multivariable method*. 3ra. Ed. Duxbury Press. An International Thomson Publishing Company, Boston.
- Kolodny M. H. (1939). The transmission of immunity in experimental trypanosomiasis (*Trypanosoma cruzi*) from mother rats to their offspring. *Am. J. Hyg.* **30**: 19- 39.
- Lana M., Vieira L. M., Machado-Cohelo L., Chiari E., Velos V. M. & Tafuri W. M. (1991). Humoral immune response in dogs experimentaly infected with *Trypanosoma cruzi*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz,* **86**: 471- 473.
- Macedo A. M., Oliveira R. P. & Pena S. D. J. (2002). Chagas' disease: role of parasite genetic variation in pathogenesis. *Exp. Rev. Mol. Med.* **5**: 1-17.
- Marques de Araujo S. & Chiari E. (1996). *Trypanosoma cruzi* infection in offspring born to chagasic C3H/He mice mothers. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **91**: 211- 216.
- Mayer M. & Rocha-Lima H. (1914). Zum Verhalten von Schizotrypanum cruzi in warm blutern und Arthropoden. *Arch. F. U. Schiffs Tropenhyg.* **18**: 257- 292.
- Miles M. A. (1972). *Trypanosoma cruzi* milk transmission of infection and immunity from mother to young. *Parasitology.* **72**: 65: 1- 9.
- Moreno E. A., Quintero A. C. & Araujo S. (2003a). Efectos de la infección chagásica aguda en ratones NMRI durante la gestación. *Acta Cientif. Vzolana.* **54 (Supl.1)**: 227.

- Moreno E. A., Rivera I. M., Moreno S. C., Alarcón M. E. & Lugo de Yarbuh A. (2003b). Transmisión vertical de *Trypanosoma cruzi* en ratas Wistar durante la fase aguda de la infección. *Invest. Clin.* **44**: 241- 254.
- Moreno B. E., Méndez I. M., Alarcón M. E., Araujo A. S. & Lugo de Yarbuh A. (2005). Reactivación de la infección chagásica en ratas Wistar gestantes. *Kasmera*. **33**: 51- 63.
- Moreno E. A., Araujo M. A., Alarcón M. E., Lugo de Yarbuh A., Araujo S. & Borges R. (2006). Efectos de la infección chagásica aguda en ratas Wistar gestantes. *Rev. Cientif. FCV-LUZ*. **16**: 506 – 516.
- Nilo M. E., Alvarado J., Ramirez M. & Espejo E. (2000). Hallazgo de tripomastigoto en estudio citoquímico de líquido amniótico. *Parasitol. día.* **24**: 49- 51.
- Pereira da Silva L. H. & Nussenzweig V. (1953). Sobre una cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. *Fol. Clin. Biol.* **20**: 191- 207.
- Pifano F. (1960). Algunos aspectos de la enfermedad de Chagas en Venezuela. *Arch. Venez. Med. Trop. Parast. Med.* **3**: 73- 99.
- Pinto P. L. S., Campos R., Santana E. J., Moreira A. A. B., Amato-Neto V., Duarte M. Y. S. et al. (1989). Estudo experimental sobre a transmissão da doença de Chagas por meio do leite. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, **31 (Supl.7)**: S15.
- Ponce C. & Ponce E. (1995). Transmisión congénita de la enfermedad de Chagas en Honduras. *Parasitol. día.* **19**: 199.
- Rassi A., Borges C., Köberle F. & De Paula O. (1958). Sobre a transmissão congénita da doença de Chagas. *Rev. Goiania de Medicina*, **4**: 4.
- Rassi A., Amato Neto V., Rassi G. G., Amato V. S., Rassi A. J., Luquetti A. & Rassi S. G. (2004). Busca retrospectiva da transmissão materna da infecção chagásica em pacientes na fase crônica. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **37**: 1 - 12.
- Scorza C. (1980). La rata “Wistar” como modelo experimental para el estudio de la miocarditis chagásica: aspectos histopatológicos, histoquímicos, inmunológicos y electrocardiográficos en diferentes etapas de la infección. [Trabajo de Ascenso] Mérida: Univ. de los Andes.
- Schmuñis G. A. & Szarfman A. (1977). La enfermedad de Chagas congénita. *Medicina (B. Aires)*, **37**: 47- 53.
- Solana M. E., Celentano A. M., Tekiel V., Jones M. & Gonzalez Cappa S. M. (2000). *Trypanosoma cruzi*: effect of parasite subpopulation on murine pregnancy outcome. *J. Parasitol.* **88**:102-106.
- Souza-Campos E. (1928). Transmissão intrauterina do *Trypanosoma cruzi* na infecção experimental do cão. *An. Fac. Med. São Paulo*, **3**: 35.
- Sullivan J. J., Bishop H. S., Klippel-Means L., Rock L. & Ware D. (1994). Congenitally transmitted *Trypanosoma cruzi* among laboratory-reared offspring of naturally infected squirrel monkeys. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **51**: 170.
- Torrico F., Alonso-Vega C., Suarez E., Rodríguez P., Torrico M.C., Dramaix M., Truyens C. & Carlier Y. (2004). Maternal *Trypanosoma cruzi* infection, pregnancy outcome, morbidity, and mortality of congenitally infected and non-infected newborns in Bolivia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **70**: 201 - 209.
- Torrico F., Alonso Vega C., Suarez E., Tellez T., Brutus L., Rodríguez P., Torrico M. C., Schneider D., Truyens C. & Carlier Y. (2006). Are maternal re-infections with *Trypanosoma cruzi* associated with higher morbidity and mortality of congenital Chagas' disease? *Trop. Med. Int. Health.* **2**: 628- 635.
- Vago A. R., Andrade L. O., Leite A. A., d'Avila Reis D., Macedo A. M., Adad S. J. et al. (1996). Kinetoplast KDNA signatures of *Trypanosoma cruzi* strains directly from infected tissues. *Am. J. Pathol.* **149**: 2153- 2159.
- Vago A. R., Andrade L. O., Leite A. A., d'Avila Reis D., Macedo A. M., Adad S. J. et al. (2000). Genetic characterization of *Trypanosoma cruzi*

- directly from tissue of patients with chronic Chagas' disease: differential distribution of genetic types into diverse organs. *Am. J. Pathol.* **156**: 1805- 1809.
- Villela E. A. (1923). A transmissão intrauterina da molestia de Chagas. Encefalite congenita pelo *Trypanosoma cruzi*. *Folha Med.* **4**: 41- 43.
- Voller A., Draper C., Bidwell D. & Bretletti A. (1975). Microplate enzyme-linked-immunosorbent assay for Chagas' disease. *The Lancet*, **1**: 426- 428.
- Walton B. C., Brooks W. H. & Arjona L. (1972). Serodiagnosis of american leishmaniasis by indirect fluorescent antibody test. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **21**: 296- 299.
-

Recibido el 24/04/2006
Aceptado el 26/10/2006

Evaluación de factores de reproducción para detectar posible contaminación genética en cepas consanguíneas de ratones

Rosa De Jesús^{1*} & Elizabeth Torres²

Las cepas consanguíneas de ratón son usadas en la investigación biomédica por características tales como la homocigosis y la isogenicidad las cuales son el producto de apareamientos de hermanos con hermanas, procedentes de una pareja ancestral, por más de veinte generaciones consecutivas, estas características se mantienen durante mucho tiempo, mientras se mantengan los esquemas específicos en los sistemas de crías y el ambiente se mantenga estandarizado. La integridad del genoma de estas cepas puede verse alterada por problemas de contaminación genética, mutaciones y/o por la deriva genética. La contaminación genética es el problema más común de alteración del genoma en colonias de producción. La evaluación de algunos factores de la producción pueden ser usados como alerta de contaminación genética. Si después que éstos han sido evaluados, se sospecha que en la cepa existe alteración del genoma, es recomendable aplicar cualquier técnica específica de laboratorio. En el presente estudio fueron evaluados algunos de los parámetros de producción de las colonias de cepas de ratones consanguíneos producidas en Venezuela, tales como: condiciones de alojamiento, esquemas de reproducción, el parámetro zootécnico: número de crías por camada. Los resultados de esta evaluación condujeron a recomendar el análisis de marcadores moleculares como los microsatélites que son los más apropiados para este propósito.

Palabras claves: cepas de ratones consanguíneos, contaminación genética, parámetros reproductivos.

INTRODUCCIÓN

El ratón es un biomodelo adecuado para la investigación biomédica por características como: su alta fertilidad, su capacidad de proliferación, el tamaño conveniente, su corto período de gestación, su mantenimiento económico, la susceptibilidad a ciertas enfermedades, la fácil producción bajo condiciones controladas y la tolerancia a la consanguinidad, entre otras (Festing, 1993; The Jackson Laboratory, 2003, Benavides & Guénet, 2003). Las cepas consanguíneas de ratón han sido base fundamental para el logro de grandes avances a nivel de las áreas de la biomedicina. Se considera una cepa consanguínea de acuerdo a las reglas adoptadas por el Comité sobre la Nomenclatura Genética Estandarizada para el Ratón en el año de 1978 (Green *et al.*, 1981; Lyon *et*

al., 1996; Festing, 1982; 1993), aquella en la cual se han apareado hermanos con hermanas por veinte o más generaciones consecutivas y es derivada de una sola pareja reproductora ancestral, lo que conlleva a que éstas presenten un factor de consanguinidad de aproximadamente 98,7% ($F=98,7\%$); este valor alcanza el 100% (todos los loci homocigotos) en aquellas cepas con más de 150 generaciones (Benavides & Guénet, 2004). El genoma de los ratones consanguíneos puede presentar alteraciones, debido a: la contaminación genética; la mutación espontánea y a la deriva genética (Nomura *et al.*, 1984; Silver, 1995; Bailey, 1982).

Para garantizar que una investigación realizada con ratones consanguíneos, presente resultados reproducibles y por tanto tenga validez científica, es necesario que éstos posean las características establecidas por el estándar internacional para la cepa referida. Es decir, si un investigador señala que su experiencia ha sido realizada con ratones *BALB/c*, éstos deben tener las características genéticas señaladas para esta cepa; la condición de contaminación genética que altera su patrimonio

¹ Laboratorio de Fisiología Animal. Departamento de Biología. Facultad de Ciencias. Universidad de Los Andes. Mérida. Telf: 0274-2401307.

² Instituto de Estadística Aplicada y Computación (IEAC), de la Facultad de Ciencias Económicas y Sociales de la ULA.

*Autor de correspondencia: rosadej@ula.ve

genético conducirá a resultados no reproducibles. Es indispensable, por tanto, que se mantengan programas de control de la calidad genética en los bioterios de producción. Éstos son conocidos como programas de control genético o monitorización genética; los cuales son un conjunto de técnicas que permite verificar si los animales mantienen las características genéticas originales de la cepa a la cual pertenecen a través del tiempo, o si han sufrido algún cambio debido a una contaminación genética. El fundamento de tales programas es el de analizar caracteres cualitativos o cuantitativos (enzimas, marcadores inmunológicos, marcadores de ADN) y compararlos con valores de referencia establecidos internacionalmente para la cepa consanguínea analizada. En todos los casos se trata de utilizar marcadores lo suficientemente polimórficos entre las cepas como para detectar apareamientos accidentales (Festing, 1990).

Diferentes marcadores han sido usados con este fin: bioquímicos (Bonhomme *et al.*, 1983; West *et al.*, 1985; Kahan *et al.*, 1987); inmunológicos (Festing & Totman, 1980); del color del pelaje, injertos de piel (Silvers & Gasser, 1973; Matthew *et al.*, 2000), de caracteres morfológicos y marcadores de ADN. Dentro de estos últimos los más utilizados en los controles de la calidad genética de las cepas consanguíneas son los microsatélites, aunque actualmente ya se ha desarrollado un panel de 28 SNP's (en inglés: single nucleotide polymorphisms) que están siendo usados en el control genético (Petkov *et al.*, 2004a,b), sin embargo éstos por su alto costo, son difíciles de establecer.

En los programas de control genético no deben olvidarse el análisis primario de las condiciones de la producción de las cepas y el de los parámetros reproductivos, los cuales deben ser parte del registro normal de las colonias de producción de ratones consanguíneos, los mismos aportan mucha información que en caso de diferir de los promedios establecidos para las diferentes cepas pueden alertar sobre alteraciones del genoma que pueden ser corroboradas con pruebas específicas de laboratorio, tales como, el análisis de marcadores moleculares (Festing, 1993; Silver, 1995; Benavides & Guénet, 2003). Dentro de los parámetros reproductivos los promedios de productividad o función reproductiva de las diferentes cepas son indicadores muy valiosos de la pureza genética de las cepas consanguíneas, ya que éstos son característicos de cada cepa (Silver, 1995;

Benavides & Guénet, 2003). Un importante factor de alerta de contaminación genética de la colonia será entonces la detección de camadas que difieran ampliamente del promedio calculado para cada cepa (Nomura *et al.*, 1984; Benavides & Guénet, 2003).

En Venezuela se producen cuatro cepas consanguíneas de ratones: *BALB/c*, *C57BL/6*, *DBA/2* y *C3H/He*. La cepa *BALB/c* se produce en cuatro bioterios, ésta es una de las cepas más usadas en la investigación del país; la cepa *C57BL/6* se produce en tres bioterios, ésta cepa es la segunda cepa consanguínea de ratón más utilizada en la investigación del país de acuerdo a información obtenida en la dirección electrónica: <http://www.asovac.org.ve>, de las reuniones científicas de la Asociación Venezolana para el Avance de la Ciencia (ASOVAC) en el periodo 2000-2004. Las cepas *DBA/2* y *C3H/He*, se producen un solo bioterio y de acuerdo a la consulta realizada en la dirección electrónica de la ASOVAC, no se encontraron reportadas éstas cepas.

MATERIALES Y MÉTODOS

La población estudiada comprendió las colonias de fundación de las cepas consanguíneas de ratones *BALB/c*, *C57BL/6*, *DBA/2* y *C3H/He* producidas en cuatro bioterios diferentes del país.

En este estudio analizamos algunos de los factores que afectan la producción de las cepas consanguíneas, los cuales pueden alterar las características de homocigosis e isogenicidad. Entre estos factores tenemos: la procedencia de las cepas, la separación física de los ambientes en los cuales se producen las diferentes cepas consanguíneas dentro de los bioterios, el manejo de los diferentes esquemas de apareamiento, el tiempo de generaciones en cada Bioterio y el parámetro zootécnico: número de crías nacidas por camada. Los datos para éste análisis fueron recolectados en visitas realizadas a los diferentes bioterios. En el momento de la recolección de estos datos, se observó si existía la separación física de las áreas de producción y mantenimiento y la existencia de barreras físicas, entre los distintos núcleos de fundación existentes dentro de cada Bioterio. Se solicitó información acerca de los datos de procedencia de las cepas y los datos del número de generaciones que tenían las cepas dentro de cada Bioterio para el momento. Se recolectaron los datos correspondientes

al número de crías nacidas por camada para cada cepa de los reportes que existían, en el momento de la visita, registrados en las diferentes tarjetas de registro ubicadas en cada caja de reproducción, ésta fue una muestra aleatoria tomada de esta forma debido a que existen bioterios que no mantienen registros de este parámetro zootécnico, a pesar de esto, los datos recolectados sirvieron para dar una visión del comportamiento de cada cepa en relación a este parámetro zootécnico, el cual es importante en el control genético de las cepas consanguíneas de ratón. En relación al parámetro reproductivo: número de crías nacidas por camada, se aplicó el análisis de la varianza para un diseño completamente aleatorizado, según el modelo:

$$y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij}, \text{ donde } \varepsilon_{ij} \sim N(0, \sigma^2)$$

donde :

y_{ijk} : es la ij – ésima observación (es la variables respuesta o número de crías por camada)

μ : es la media general de todas las observaciones

τ_i : representa el efecto del factor A (Bioterios) para $i = 1, 2, 3, 4$

ε_{ij} : representa el error.

Se midieron las diferencias significativas en el número de crías por camada (variable respuesta), considerando a las cepas *BALB/c* producidas por los cuatro bioterios y a las cepas *C57BL/6* producidas por los tres bioterios, estudiados. Las hipótesis a probar son las siguientes:

1. Cepa *BALB/c*

$$H_0: \mu A = \mu B = \mu C = \mu D = \mu E$$

$$H_1: \mu A \neq \mu B \neq \mu C \neq \mu D \neq \mu E$$

2. Cepa *C57BL/6*

$$H_0: \mu A = \mu C = \mu D$$

$$H_1: \mu A \neq \mu C \neq \mu D$$

Se determinó la homogeneidad en los datos obtenidos en los diferentes bioterios, para lo que se realizó la prueba de Bartlett. También, se realizó el análisis a posteriori mediante la prueba de Turkey para observar las diferencias verdaderamente significativas entre las medias poblacionales de los bioterios que producen la cepa *BALB/c*. El análisis de varianza no fue realizado para los datos de las cepas *DBA/2* ni *C3H/He*, debido a que éstas sólo se producen en un bioterio.

Para observar la existencia de diferencias estadísticamente significativas en los promedios del número de crías nacidas de las cuatro cepas de ratones consanguíneos analizadas con los promedios reportados por la base de datos de The Jackson Laboratory (2003), se aplicó el análisis de la distribución *t-Student*. Las hipótesis a probar fueron las siguientes:

Cepa *BALB/c*

$$1. H_0 = 5$$

$$2. H_1: \text{no todas son } \mu = 5$$

Cepa *C57BL/6*

$$1. H_0 = 6$$

$$2. H_1: \text{no todas son } \mu = 6$$

Cepa *DBA/2*

$$1. H_0 = 4$$

$$2. H_1: \text{no todas son } \mu = 4$$

Cepa *C3H/He*

$$1. H_0 = 5$$

$$2. H_1: \text{no todas son } \mu = 5$$

El procesamiento de la información fue realizado mediante el software estadístico Statistics Analysis System (SAS versión 8.2 bajo UNIX, instalado en el Centro Nacional de Cálculo Científico de la ULA (CecalcUla), ejecutado remotamente desde el Instituto de Estadística Aplicada y Computación (IEAC), de la Facultad de Ciencias Económicas y Sociales de la ULA). El análisis de los esquemas de producción de los sistemas de cría se realizó comparando el esquema propuesto por The Jackson Laboratory (2003), con el esquema que siguen para la producción de los ratones consanguíneos, cada uno de los bioterios analizados.

RESULTADOS

Los datos sobre la producción relacionados al lugar de procedencia, las condiciones de alojamiento, el tiempo de permanencia de las cepas en los diferentes bioterios (tiempo de generaciones) y el número de crías por camada, se encuentran tabulados en la Tabla I.

En ésta se puede observar que sólo el bioterio B y el bioterio D mantienen cepas de procedencia de bioterios nacionales, pero éstos últimos adquirieron las

cepas en laboratorios internacionales reconocidos los cuales ofrecen certificados de calidad de los animales. Presenta también la tabla que las cepas producidas en el bioterio A, una de las cepas *BALB/c* producidas en el bioterio B y las cepas que se producen en el bioterio D se encuentran en vía de consanguinidad y el resto de las cepas que se producen en el país tienen más de veinte generaciones, indicando que éstas pueden considerarse consanguíneas de acuerdo a la definición de las mismas. Por otro lado, se puede observar en la tabla que solamente el bioterio B mantiene alojadas las cepas en condiciones que garantizan que no exista contaminación genética, pues se mantienen en aisladores.

En el análisis del número de crías nacidas por camada, se determinó la homogeneidad de los datos usando la Prueba de homogeneidad de Bartlett el resultado se presenta en la Tabla II, observándose que no existen diferencias significativas estadísticamente, lo cual permite que los datos puedan ser procesados mediante un análisis de varianza.

El ANOVA se realizó con la finalidad de detectar diferencias significativas en el número de crías entre los bioterios. La Tabla III muestra los resultados de los análisis de varianza de una sola vía para los datos de las cepas *BALB/c* y *C57BL/6*.

Los datos de la cepa *BALB/c* presentaron diferencias significativas ($\alpha = 0,05$) para el número de crías nacidas por camada, en los efectos principales, es decir en relación al bioterio en el cual se produce; lo cual podría evidenciar que existen diferencias significativas en el número de crías nacidas por bioterio. Debido a esto fue preciso realizar un análisis "a posteriori" con la finalidad de determinar cual bioterio produce la diferencia. El procedimiento usado fue el de comparaciones múltiples de Turkey (Wayne, 1997). A fin de averiguar si el número de crías de los bioterios se ajustan a los estándares internacionales (Tabla I), se utilizó la *t-Student*, para cada bioterio según el estándar. Los resultados del procesamiento de la información mediante este test se presentan en la Tabla IV.

En ésta se observan diferencias significativas para la cepa *BALB/c* producida en el Bioterio B (cepa producida en el bioterio B de procedencia internacional), para el Bioterio D (cepa producida en el Bioterio C) y para el Bioterio E. Para la cepa *C57BL/6* se observan diferencias significativas para los Bioterios A y C. En relación a las cepas *DBA/2* y *C3H/He* ambas presentan diferencias significativas.

Posteriormente, analizamos los esquemas de producción, la finalidad fue comparar la estructura

Tabla I. Datos sobre: Procedencia de las cepas consanguíneas, Tiempo de generaciones, Promedio de Número de crías nacidas por camada y Condiciones de alojamiento.

Bioterios	Cepas	Procedencia	Tiempo de Generaciones (generaciones)	Promedio de Número de crías nacidas/camada	Promedio característico de Número de crías nacidas/camada	Condiciones de alojamiento
A	BALB/c	CENPALAB	18	5,53	5	Aislador
	C57BL/6	CENPALAB	18	4,58	6	Aislador
B	BALB/c	Laboratorio Taconic	20	6,27	5	Cubículo
	BALB/c	Bioterio A	1	5,11	5	Cubículo
C	BALB/c	Laboratorios Charles Rivers	43	3,35	5	Cubículo
	C57BL/6	Laboratorios Charles Rivers	45	4,87	6	Cubículo
	DBA/2	Laboratorios Charles Rivers	39	7,34	4	Cubículo
	C3H/He	Laboratorios Charles Rivers	28	6,8	5	Cubículo
D	BALB/c	Bioterio C	28	3,78	5	Cubículo
	C57BL/6	Bioterio C	18	5,29	6	Cubículo

Tabla II. Prueba de homogeneidad de Bartlett.

Cepa	Fuente	Grados de libertad (Df)	χ^2	P
BALB/c	Bioterio	4	6.8207	0.1457
C57BL/6	Bioterio	2	9.0513	0.1080

del esquema de los sistemas de producción planteado internacionalmente para estas cepas, el cual minimiza las probabilidades de contaminación genética, con la estructura de los esquemas que siguen los diferentes bioterios nacionales, de no cumplirse éste cualquier estudio de control genético posterior no tendría validez, debido a que si una producción de cepas consanguíneas de ratones no está estructurada como se ha planteado, difícilmente los ratones producidos podrán tener la pureza genética característica de la cepa referida. Cuando se desarrolla y mantiene una colonia de cepas de ratones consanguíneos se debe seguir una producción estructurada en un núcleo de fundación, un núcleo pedigrí de expansión y un núcleo de producción.

Dentro de la estructura establecida para el núcleo de fundación, generalmente, éste está formado por varias parejas reproductoras (apareadas en forma monogámica) las cuales forman líneas separadas; éstas parejas proceden de una sola pareja reproductora (pareja ancestral). Al comparar los esquemas de producción de los cuatro bioterios estudiados, solamente el Bioterio B es algo diferente, debido a que, hasta el momento de la toma de datos, el esquema que se seguía para la producción de los ratones de las cepas consanguíneas mantenía diez unidades contentivas de varias parejas, las cuales pudiesen ser consideradas como líneas, sin embargo, para realizar el reemplazo de las parejas reproductoras con las

crías del tercer o cuarto parto, se intercambiaban los animales entre líneas (unidades). El resto de los bioterios siguen esquemas para la producción de los ratones similares a los planteados internacionalmente, lo que garantiza un buen manejo de la producción.

DISCUSIÓN

El análisis de los factores de producción realizado fundamenta y justifica un estudio de control genético a nivel de técnicas de laboratorio. Las cepas consanguíneas de ratones que se producen en el país proceden de laboratorios en los cuales certifican la calidad genética de los mismos, mantienen los esquemas de los sistemas de producción en la forma como es planteada internacionalmente en la producción de estas cepas; otro dato de interés es que las cepas que se producen en el país deben tener un porcentaje de consanguinidad aproximado a $F=98,7\%$, pues, en su mayoría cuentan con las veinte generaciones de apareamientos sucesivos entre hermanos, tal como lo especifica la definición de estas cepas; a pesar de esto, se puede sospechar de alguna contaminación genética debido a que cuando se analiza el parámetro número de crías nacidas por camada mediante la prueba *t-Student* se puede observar que existen diferencias significativas estadísticamente con respecto al estándar internacional del número de crías nacidas por camada en las cepas producidas en el país.

Tabla III. Análisis de varianza para las cepas BALB/c y C57BL/6.

	Fuente de variación	Suma de Cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados Medios	F	P
BALB/c	Bioterio	301,9255	4	75,4814	17,16	<.0001 *
	Error	923,9069	210	4,399		
	Total correcto	1225,8325	214			
C57BL/6	Bioterio	10,08602	2	5,043	1,37	0,259
	Error	331,6129	90	3,684		
	Total correcto	341,6129	92			

P: calculado con $\alpha = 0,05$; *: La diferencia es altamente significativa.

Aclaratoria: En el estudio realizado solo se analizan cuatro bioterios, sin embargo, como el bioterio B mantiene en producción dos cepas BALB/c de diferente procedencia, cuando se realiza el análisis de los datos de esta cepa se hace mención de cinco bioterios (A, B, C, D y E), con la finalidad de hacer un mejor manejo del programa usado, esta observación es sólo para el análisis de la cepa referida; de manera que, cuando se hace referencia en la Tabla IV, a los bioterios B y C se habla del mismo bioterio B (B - cepa de procedencia internacional y C - cepa de procedencia nacional), refiriéndose a cada una de las cepas que en éste se producen; cuando se hace mención de D se refiere al bioterio C y cuando se hace mención a E se refiere al bioterio D, igualmente es válida esta aclaratoria para los datos presentados en los anexos E y G.

Tabla IV. Análisis t-Student para las cepas BALB/c, C57BL/6, DBA/2 y C3H/He.

Cepa	Bioteri	Número de muestras	–	Desviación estándar (ST Dev)	Error estándar (Std error)	t	Grados de Libertad	P
BALB/c	A	43	5.91	2.02	0.31	2.92	42	0.0053
	B	43	6.81	2.52	0.38	4.72	42	<.0001 *
	C	43	5.67	2.21	0.34	2.000	42	0.0520
	D	43	3.58	1.74	0.26	-5.361	42	<.0001 *
	E	43	4.16	1.91	0.29	-2.868	42	0.0064 *
C57BL/6	A	31	4.48	1.93	0.35	-4.374	42	0.0001 *
	C	31	4.87	1.34	0.24	-4.708	42	<.0001 *
	D	31	5.29	2.36	0.42	-1.678	42	0.1038
DBA/2	C	19	7.32	2.11	0.48	6.851	42	<.0001*
C3H/He	C	20	6.80	0.62	0.14	13.077	42	<.0001*

P: calculado con $\alpha = 0,05$; *: La diferencia es altamente significativa

El parámetro zootécnico número de crías nacidas por camada está determinado genéticamente y cualquier alteración del mismo puede conllevar a sospechar de una contaminación genética (Nomura *et al.*, 1984; Silver, 19995; Benavides y Guénet, 2003). Este resultado puede ser reforzado cuando se observan las condiciones de alojamiento en las cuales se encuentran las cepas en la mayoría de los bioterios, los cuales no presentan barreras efectivas de separación entre las diferentes cepas que se producen en éstos, lo que aumenta la probabilidad de sospechar la presencia de contaminación de éstas cepas.

Ante esta situación se recomienda la planificación y ejecución de un control genético (Control tipo II) para garantizar que no existe contaminación genética de las cepas y que las diferencias estadísticamente observadas son producto probablemente de mutaciones o problemas nutricionales. Éste control genético está dado por el estudio de marcadores moleculares polimórficos, entre los cuales se pueden usar los microsatélites los cuales son considerados una herramienta valiosa para tal propósito.

Evaluation of reproductive parameters for genetic contamination in mouse strains inbred.

SUMMARY

Inbred strains of mice are used in biomedical research because characteristics such as homozygosis

and isogenicity which result from mated brother and sister, descendants of an original pair for more than twenty consecutive generations. The genome integrity of these strains can be altered by genetic contamination, mutations and genetic drift. Genetic contamination is the most common problem affecting the genome of the animals of production colonies. The evaluation of some production factors can be used as warning of genetic contamination. If, after these production factors have been evaluated, it seems that there is genome alteration in the strain, it is advisable to apply any specific laboratory technique. In the present study some of the production parameters of the colonies of inbred strains of mice bred in Venezuela were evaluated; these are: conditions of the animals quarters, reproductive zootechnic parameters; number of offspring per litter. Results of this evaluation led to recommending the analysis of some molecular markers as microsatellites that are the most appropriate technique for this purpose.

Key words. Mouse strains inbred, genetic contamination, reproductive parameters

REFERENCIAS

- AsoVAC (2004). Base de datos – Resúmenes de trabajos presentados en la L Convención. Disponible: <http://www.asovac.org.ve> [Consulta: 2004, Febrero 20].
- Bailey D. W. (1982). How pure and inbred strains of mice? *Immunology Today*. **3**: 210-214.

- Benavides F. & Guénet J-L.(2003). *Manual de genética de roedores de laboratorio. Principios básicos y aplicaciones*. Universidad de Alcalá. Laboratory Animals Ltd. SECAL.
- Bonhomme F., Catalan J., Britton-Davidian J., Chapman V., Moriwaki K., Nevo E. & Thaler L. (1983). Biochemical Diversity and Evolution in the Genus Mus. *Biochemical Genetics*. **22**: 275-303.
- Festing M. F. W. (1982). Genetic contamination of laboratory animal colonies: an increasingly serious problem. *ILAR News*. **25**: 6-10
- Festing M. F. W. (1990). Introduction to genetic monitoring. *Scand. J. Lab. An. Sc.* **17**: 119-125.
- Festing M. F. W. (1993). Genetic quality control in laboratory rodents. *Aging Clin. Exp. Res.* **5**: 309-315.
- Festing M. F. W. & Totman P. (1980). Polyvalent strain-specific alloantisera as tools for routine genetic quality control of inbred and congenic strains of rats and mice. *Lab. Anim.***14**: 173-177.
- Green M. C., Beechey C. V., Davisson E. P., Evans E. P., Lane P. W., Lyon M. F., Roderick T. H., Searle A. G., Shreffler D. C., Staats J., Taylor B. A. & Womack J. E. (1981). *Genetic Variants and Strains of Laboratory Mouse*. Gustav Fischer Verlag. Stuttgart NY.Ch 1.
- Kahan B., Auerbach R., Alter B. J. & Bach F. H.(1987). Histocompatibility and isoenzyme difference in commercial supplied BALB/c mice. *Science*. **217**: 379-81
- Lyon M. C., Rastan S. & Brown S. (1996). *Genetic Variants and Strains of the Laboratory Mouse*. Oxford University Press. NY.
- Matthew W., Trambley J., Ha Jongwon, Adams A., Durham M., Rees P., Cowan S., Pearson T. & Larsen Ch. (2000). Genetic Characterization of Strain Differences in the Ability to Mediate CD40/CD28-Independent Rejection of Skin Allografts. *The Journal of Immunology*. **164**: 68-50.
- Nomura T., Esaki K. & Tomita T. (1984). *Manual for Genetic Monitoring in inbred mice*. ICLAS. University of Tokyo Press.
- Petkov P. M., Ding Y., Cassell M. A., Zhang W., Wagner G., Sargent E. E., Asquith S., Crew V., Johnson K. A., Robinson P., Scott V. E. & Wiles M. E. (2004a). An Efficient SNP System for Mouse Genome Scanning and Elucidating strain Relationships. *Genome Research*. **14**: 1806-1811.
- Petkov P. M., Cassell M. A., Sargent E. E., Donnelly C. J., Robinson P., Crew V., Asquit S., Harr R. V. & Wiles M. V. (2004b). Development of a SNP genotyping panel for genetic monitoring of the laboratory mouse. *Genomic*. **83**: 902-911.
- Silver L. M. (1995). *Mouse Genetics. Concepts and Applications*. New York: Oxford University Press.
- Silvers W. & Gasser D. (1973). The Genetic divergence of sublines as assessed by Histocompatibility Testing. *Genetics*. **75**: 671-677.
- The Jackson Laboratory. (2003). *Jax Mice*. [Catálogo]. Bar HARBOR, Maine. USA.
- West J., Lyon M., & Peters J. (1985). Genetic differences between substrains of the inbred mouse strain 101 and designation of a new strain 102. *Genet. Res.* **46**: 349-352

Recibido el 28/11/2005
Aceptado el 05/10/2006

Diagnóstico del sistema de recolección de desechos generados en el Hospital Ruiz y Páez, Ciudad Bolívar, estado Bolívar, Venezuela

Glacelidys Rodríguez^{1*}, Neil Mago² & Víctor Mora Arellano²

El manejo inadecuado de los desechos sólidos procedentes de los centros hospitalarios, está considerado como uno de los principales factores de riesgo ocupacional, fundamentalmente por el carácter infeccioso de los desechos Tipo B y la presencia de objetos punzo-cortantes (Desechos Tipo C). Por ello, la presente investigación analítica y descriptiva, tiene como objetivo diagnosticar el manejo actual de los desechos generados en el Hospital Ruiz y Páez, estado Bolívar Venezuela, mediante inspecciones realizadas en forma aleatoria a las diferentes áreas de servicio del hospital en referencia, la aplicación de una encuesta al personal de saneamiento y asistencial y la toma de fotografías. Se evidenció que no se cumple el 79,17% del Decreto 2.218 "Norma para la Clasificación y Manejo de Desechos en Establecimientos de Salud", el 100% del personal asistencial y saneamiento encuestado, no ha recibido capacitación para el manejo de los desechos peligrosos e infecto-contagiosos. En el 2004-2005, se han registrado 31 accidentes laborales por objetos punzo cortantes. A partir de la información obtenida, se propone la necesidad de instituir un nuevo sistema de recolección y disposición final de los desechos generados. Para el establecimiento y consecución del sistema, se recomienda la incorporación y adiestramiento de toda la comunidad hospitalaria.

Palabras claves: Desechos médicos, disposición de residuos médicos, riesgo ocupacional.

INTRODUCCIÓN

Los centros hospitalarios como instalaciones destinadas a proteger y mejorar el nivel de salud, paradójicamente presentan factores de riesgo de mucha importancia y trascendencia en la transmisión de infecciones a pacientes, trabajadores, visitantes y miembros de la comunidad, pudiendo ocasionar repercusiones serias en la sociedad y el ambiente.

El manejo inadecuado de los desechos producidos en los centros de salud, conlleva riesgos tales como lesiones con objetos punzo-cortantes contentivos de fluidos y materiales infecto-contagiosos, facilitando la transmisión de enfermedades intrahospitalarias, con el aumento en el número de días de hospitalización, costos de tratamiento y la morbi-mortalidad; así como repercusiones económicas por incapacidad laboral,

sin considerar los impactos negativos que se podrían presentar en el ambiente (Villena *et al.*, 1994; Mata *et al.*, 2004; González, 2005).

En lo que respecta a Venezuela, la clasificación y manejo de los desechos generados en los establecimientos en el sector salud, humana o animal, está regulada por normas técnicas descritas en el Decreto Presidencial N° 2.218 publicadas en Gaceta Oficial N° 4.418, (1992), con la finalidad de prevenir la contaminación e infección microbiana en usuarios, trabajadores y público en general, así como su diseminación ambiental, ya que puede afectar la calidad de los diferentes ecosistemas (atmósfera, suelos, aguas superficiales y subterráneas) y la biodiversidad que los constituyen.

Según este decreto, los desechos hospitalarios se clasifican en desechos comunes o Tipo A, correspondientes a papeles, cartones, componentes de barrido generados en la limpieza, siempre y cuando no hayan estado en contacto con los desechos Tipo B, C, D y/o E. Los desechos Tipo B son los potencialmente peligrosos, y corresponden a aquellos

¹ Unidad de Estudios Básicos. UDO, estado Bolívar - Venezuela

² Escuela Ciencias de la Salud. UDO, estado Bolívar - Venezuela

*Autor de correspondencia: glacelidys@gmail.com

materiales que puedan resultar contaminados por su ubicación, contacto o cualquier otra circunstancia. Los desechos infecciosos o Tipo C son por su naturaleza, ubicación, exposición, contacto o por cualquier otra circunstancia contentivos de agentes infecciosos y/o patógenos. Los desechos orgánicos y/o biológicos o Tipo D son todas aquellas partes o porciones extraídas de seres humanos y animales; por último, los desechos especiales o Tipo E, son productos y residuos farmacéuticos o químicos, material radioactivo y líquidos inflamables.

Dado que, en los centros de salud pública (Hospitales y Ambulatorios) y privada (Clínicas) del estado Bolívar no se cumplen a cabalidad las normas técnicas del referido Decreto para la clasificación y manejo de desechos en establecimientos de salud (Mora *et al.*, 2004; Suárez *et al.*, 2005), se torna indispensable llevar a cabo un orden de procedimientos y medios materiales que permitan mejorar la calidad ambiental en relación con la segregación de los desechos generados.

Considerando lo anteriormente descrito y dado que, en la literatura revisada son escasos los trabajos de investigación publicados y relacionados con el manejo y disposición final adecuada de los desechos producidos en los centros de salud en el ámbito nacional y en particular en la Región Guayana, se plantea como objetivo principal diagnosticar el manejo actual de los desechos sólidos en el Hospital Ruiz y Páez de Ciudad Bolívar – estado Bolívar, con el propósito de controlar y reducir con seguridad y eficiencia los riesgos asociados a la salud y al manejo de los desechos hospitalarios infecciosos, por medio de la planificación de procedimientos técnicos para lograr su correcta segregación y disposición, con la participación activa de los miembros de la comunidad hospitalaria para el logro de un buen saneamiento ambiental y calidad de vida.

MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación fue de tipo descriptiva y analítica. El estudio se realizó en el Hospital Ruiz y Páez (Tipo IV), ubicado en la Av. Germania, Ciudad Bolívar - estado Bolívar, entre las coordenadas U.T.M. N: 897.500 y 900.000; E: 440.000 y 442.000. Escala 1:25000 (MINFRA, 2000). Forma parte del Complejo Hospitalario Universitario Ruiz y Páez, constituye los tres (3) primeros sectores de este

complejo y está integrado por 20 áreas de servicio. Actualmente, cuenta con 355 camas operativas de hospitalización, su capacidad de consulta externa puede alcanzar las 4.500 personas por día y tiene aproximadamente 1.200 trabajadores diarios.

Para el diagnóstico del manejo de los desechos sólidos intrahospitalarios (DSI), se procedió en primera instancia, con la identificación de las diferentes áreas de servicios, número de camas y tipo de desechos que cada área genera, evaluando la situación actual con base en el Decreto 2.218. Para ello, se diseñó y utilizó una lista de verificación de conformidad con la normativa vigente (Tablas I y II).

La obtención de la data se realizó en el lapso comprendido entre abril 2005 a febrero de 2006, a través de inspecciones realizadas en forma aleatoria a las áreas de servicio, 4 días a la semana en los turnos de trabajo: 7:00 am a 1:00 pm; 1:00 pm a 7:00 pm. En las cuales se evidenció las rutas y horarios de limpieza, así como las rutinas del personal asistencial para el descarte de los desechos, enfocando la mayor atención en los objetos punzo-cortantes (Tipo C) y los desechos biológicos (Tipo D), debido a su potencial patogénico. La información fue sistematizada y analizada en las planillas antes señaladas para determinar el grado de cumplimiento de la normativa.

Adicionalmente, se tomaron fotografías empleando una cámara digital y se aplicaron encuestas al personal asistencial y al de saneamiento, para determinar el nivel de conocimiento que presentan en relación al manejo de los DSI, basado en el Manual para el Manejo de Desechos en Establecimientos de Salud, promovida por la Fundación Natura y el Centro Panamericano de Ingeniería Sanitaria y Ciencias del Ambiente (Zabala, 1998). Para determinar el número de encuestas a aplicar se empleó la siguiente fórmula estadística, según lo descrito por Milton & Tsokos (2001).

$$n: \frac{K^2 \cdot N \cdot p \cdot q}{(e^2 \cdot N) + (K^2 \cdot p \cdot q)}$$

Donde:

K = constante de distribución con probabilidad Z, cuyo valor es $(2,58)^2$ cuando la confiabilidad es de 99%

Tabla I. Segregación de los desechos sólidos en el área de generación. Hospital Ruiz y Páez, Ciudad Bolívar – estado Bolívar.

Área:	Encargado del área:				
Nº total de camas:	Investigador a cargo:				
Camas Ocupadas (%):	Fecha:				

Tipos de desechos	(A) Comunes	(B) Peligrosos	(C) Infecciosos	(D) Orgánicos	(E) Especiales
Desechos generados					
Características de los Recipientes según Decreto Ley 2.218	☐ Envases con tapa <u>Bolsas:</u> ☐ Tamaño adecuado ☐ Polietileno opaco e impermeable ☐ Espesor de 0,08 mm	<u>Recipiente:</u> ☐ Accionado a pedal ☐ Logo de Desechos Médicos ☐ Identificado con letras rojas 20 - 50 cm ☐ Individuales para punzo-cortantes <u>Bolsas:</u> ☐ Polietileno blancas opacas de 0,1 mm de espesor ☐ Soldadas térmicamente en el fondo	<u>Baldes:</u> ☐ Tapas Herméticas y asa ☐ Polietileno de alta densidad <u>Bolsas:</u> ☐ Polietileno de 0,1 mm ☐ En cajas de cartón corrugado ☐ Cierre Hermético	Según su naturaleza	
Observaciones acerca de los recipientes					

■ Cumple con la característica señalada

□ No cumple con la característica

☒ No se logró obtener información

N = tamaño de la población

e = error (0,01), es decir, 99% de confiabilidad

p = probabilidad de que ocurra un evento (50%)

q = probabilidad de que no ocurra un evento (50%)

El Hospital Ruiz y Páez, para el momento en el que se realizó el estudio, presentaba 133 personas adscritas al personal de Saneamiento Ambiental, donde se incluye al personal fijo, contratado y suplentes. Dentro de esta población (133 individuos), se tomó una muestra aleatoria de 74 personas, para alcanzar una confiabilidad del 99%, según cálculos realizados con la fórmula antes citada. El personal asistencial se encontraba conformado por 200 enfermeras, de las cuales fueron encuestadas un total de 91, siguiendo los mismos criterios estadísticos que el caso anterior.

Finalmente, se recabó información acerca del número de accidentes laborales producidos durante el periodo 2004-2005 en este centro de salud,

por medio de la revisión de las historias médicas manejadas por el Departamento de Epidemiología del Hospital “Julio Criollo Díaz” (Hospital del Tórax), también perteneciente al Complejo Hospitalario Ruiz y Páez, por ser esta la única dependencia en donde son remitidos y registrados los diferentes casos de enfermedades y accidentes ocupacionales.

RESULTADOS

Manejo actual de los desechos generados en el Hospital Ruiz y Páez

En el total de las áreas de servicio del centro de salud estudiado, se producen desechos sólidos en volúmenes y características variables, según la complejidad y las especialidades existentes en el área, la tecnología empleada, el número de pacientes atendidos y el uso de material desechable, entre otros

Tabla II. Manejo de desechos sólidos según el área de generación. Hospital Ruiz y Páez. Ciudad Bolívar - estado Bolívar.

Área:	Encargado del área:				
Nº total de camas:	Investigador a cargo:				
Camas Ocupadas (%):	Fecha:				

Tipos de desechos	(A) Comunes	(B) Peligrosos	(C) Infecciosos	(D) Orgánicos	(E) Especiales
Área de Transferencia					
Período de recolección de desechos					
Transporte interno de los desechos según Decreto 2.218	Contenedores: ☐ Plástico ☐ Metal ☐ Ruedas Lisas Modo de Transporte: ☐ Ascensores de Carga o Servicio ☐ Rampa ☐ Ascensores públicos en Horario Especial Otros aspectos: ☐ Desinfección diaria				
Almacenamiento Temporal					
Almacenamiento Final					

■ Cumple con la característica señalada

□ No cumple con la característica

☒ No se logró obtener información

factores. Sin embargo, a pesar de esta variabilidad, el manejo de los desechos sólidos sigue una misma línea de procesos, que según el Decreto Ley 2.218 “Norma para la Clasificación y Manejo de Desechos en Establecimientos de Salud”, abarca los siguientes aspectos: Producción y almacenamiento primario, transporte interno, almacenamiento secundario, transporte externo y tratamiento y disposición final. En el Hospital Ruiz y Páez esta sistematización no se aplica eficientemente, sólo existe una separación de los desechos orgánicos y, en algunas áreas de servicio (Pediatría, Cirugía, Traumatología, Obstetricia y Ginecología) de los objetos punzo-cortantes; por lo que el resto de los desechos infecto-contagiosos, así como los potencialmente peligrosos, como los provenientes de las áreas de hospitalización; son mezclados con los desperdicios comunes siendo descartados y trasladados al relleno sanitario sin recibir ningún tipo de tratamiento (Fig. 1).

Cumplimiento de la normativa legal vigente.

Bajo las condiciones antes descritas, sólo se cumplen 5 (20,83%) de los 24 artículos que norman las labores de manejo de los DSI dentro del Decreto 2.218, aplicables a este centro de salud. El primero de ellos es el Art. 5 donde se sostiene que los desechos deben ser clasificados como A, B, C, D o E según sus características y además se deben descartar en recipientes acordes a las mismas, a este respecto, sólo se observó un único tipo de contenedor por área, no existen recipientes accionados a pedal para la recolección de los desechos Tipo B y C (Art. 8) y en su lugar se usan envases de plástico sin identificación y bolsas negras reforzadas de 40 Kg en lugar de 30 Kg, según lo normado en el artículo 7, este excedente de peso dificulta la maniobrabilidad durante las jornadas de traslado, aumentando el riesgo de incidencia de

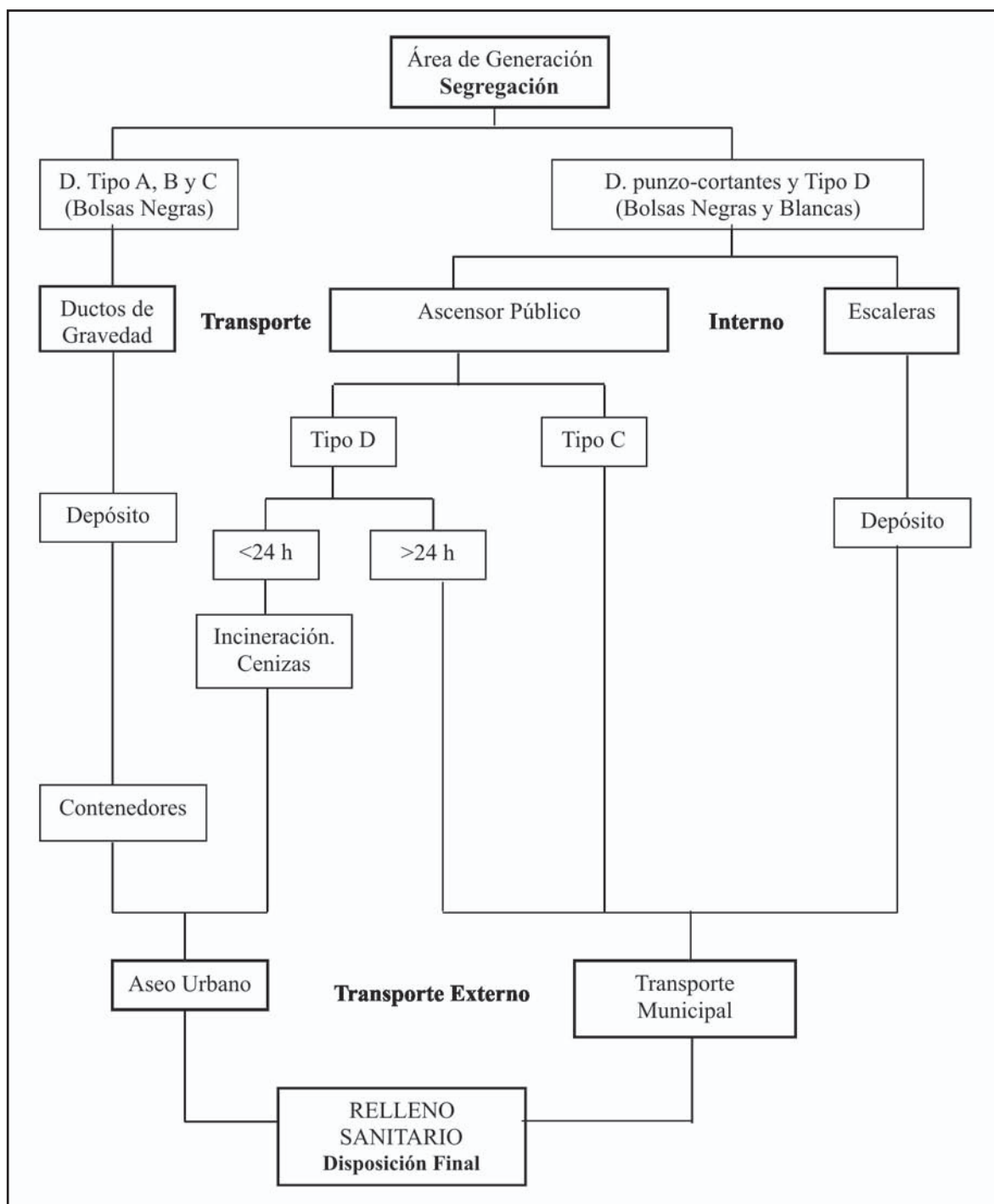


Fig. 1. Diagrama del manejo actual de los desechos sólidos en el Hospital Ruiz y Páez, Ciudad Bolívar - estado Bolívar.

accidentes laborales, aunado al hecho de que este tipo de bolsas son empleadas para todos los desechos, sin excepción.

Por su parte, las piezas punzo-cortantes, según lo normado en el artículo 10, deben ser previamente dispuestas en recipientes debidamente identificados, resistentes a cortes y con cierre hermético, en contraste con esto, se observó gran cantidad de jeringas descartadas con los desechos comunes, también se visualizaron en varias áreas de servicio (Pediatría, Cirugía, Traumatología, Obstetricia y Ginecología), envases de plásticos sin identificación ni cierre hermético destinados a la recolección de estos objetos, que luego son acopiados a la intemperie hasta su disposición final (Fig. 2-A).

Los fluidos médicos orgánicos, no son dispuestos en recipientes cerrados herméticamente como lo describe el Artículo 11, sino colocados en botellas de plástico y luego descartados en bolsas blancas de 15 Kg de capacidad. Asimismo, no existen recipientes tipo baldes desechables de polietileno de alta densidad, con tapas de cierre hermético, para los desechos Tipo D (Art. 12 y 13), en su lugar, estos son dispuestos en bolsas negras de 40 Kg colocadas en envases plásticos no identificados y sin cierre hermético (Fig. 2-B).

Según el Artículo 15, el transporte de los desechos Tipo B, C y D desde el área de generación o transferencia hasta el lugar de almacenamiento, debe realizarse empleando contenedores de plástico o metal inoxidable sobre ruedas, de superficie lisa y sin uniones salientes para su fácil limpieza y desinfección, situación que no fue observada durante la investigación. El transporte interno de los desechos comunes recolectados junto con los desechos Tipo B y C, son descartados a través de ductos de gravedad sin tomar ninguna precaución para evitar la apertura o rotura de las bolsas, además, en el interior de estos ductos se encuentran salientes y objetos metálicos que rompen las bolsas esparciendo su contenido en el depósito. El transporte de los desechos orgánicos (placenta, entre otros) y de algunos envases contentivos de objetos punzo-cortantes (Desechos Tipo C), se realiza empleando los ascensores, o en su defecto a través de las escaleras, por donde también son transportados los alimentos, los pacientes, el personal y el público en general, a pesar que el Artículo 17 prohíbe esta actividad.

Los desechos descartados por los ductos de gravedad son colocados en contenedores, presentes en número insuficiente, sin tapas y expuestos tanto a la acción del ambiente como a la disgregación propinada por los indigentes que deambulan en su entorno (Art. 19). No se observó un área de almacenamiento final para los desechos Tipo B, C y D (Art. 20 y 21), en principio porque los dos primeros son mezclados con los desechos comunes, y los desechos Tipo D, son incinerados una vez al día. Sin embargo, durante las inspecciones realizadas se evidenció el mal estado en el que se encuentra el incinerador; así como gran cantidad de desechos orgánicos, en su mayoría placentas, permanecen a la intemperie, hasta el momento en que puedan ser incinerados o en su defecto trasladados hasta el relleno sanitario y enterrados, sin previa parcelación ni identificación. Este transporte es ejecutado por el servicio de aseo urbano municipal, sin garantizar el uso exclusivo para tales fines (Art. 22), ya que este centro de salud no cuenta con el vehículo adecuado para el traslado de los desechos médicos según lo normado en los artículos 23 al 27.

En cuanto, al tratamiento de los desechos Tipo B, C y D (Art. 28 y 29), sólo se practica incineración a algunos desechos orgánicos, principalmente provenientes del área de perinatología; inactivación térmica a los desechos del laboratorio de microbiología e infectología; e inactivación química mediante la adición de hipoclorito de sodio a los desechos provenientes de pacientes inmunosuprimidos en todas las áreas de hospitalización.

Los residuos generados de la aplicación de estas escasas técnicas de tratamiento (cenizas, entre otros) son dispuestos en los rellenos sanitarios junto con los desechos Tipo A (Art. 30 y 31). No obstante, estos artículos también son incumplidos pues estos desechos dejan de clasificarse como comunes al entrar en contacto con los desechos Tipo B y C que no han sido segregados y están dispuestos en los contenedores para ser también trasladados al relleno sanitario.

Por su parte, se debe señalar que los desechos Tipo E, son en su mayoría descartados en el sistema de drenaje o colocados en envases vacíos y dispuestos con los desechos comunes, incumpliendo con las normas para el control de la generación y manejo de los desechos peligrosos (Art. 32). Vale



Fig. 2. Disposición de los objetos punzo-cortantes (A) y desechos orgánicos (B) en el Hospital Ruiz y Páez, Ciudad Bolívar - estado Bolívar.

destacar, que el centro de salud estudiado cuenta con un Departamento de Saneamiento Ambiental, aunque este no le brinda un entrenamiento al personal, a fin de que adquieran formación y criterios que garanticen un manejo seguro y racional de los desechos (Art. 34).

De los 34 artículos que conforman el Decreto 2.218, 4 son definiciones (Art. 1, 2, 3, 4), uno es competencia del Ministerio de Sanidad y 5 (Art. 23 al 27) no se aplican en el Hospital Ruiz y Páez, pues se refieren a las características del medio de transporte externo de los desechos infecto-contagiosos, ausente en este establecimiento de salud. Por tanto se determinó que esta institución, incumple con el 79,17% de la normativa legal vigente.

Nivel de capacitación del personal asistencial y de saneamiento para el manejo de los DSI

La totalidad del personal encuestado desconocía la clasificación de los DSI de acuerdo a la normativa legal de nuestro país y escasamente sólo el 26,32% del personal asistencial ha recibido algún tipo de capacitación para el manejo de desechos peligrosos e infecto-contagiosos, mientras que ninguno de los integrantes del personal de saneamiento encuestado, afirmó haberlo recibido.

En cuanto al personal asistencial, este sólo realiza una discriminación entre los desechos provenientes de pacientes VIH seropositivos y en algunos casos los objetos punzo-cortantes. El

75% de los encuestados sostuvo que los desechos producidos en los cuartos de hospitalización (Tipo B) eran peligrosos. No obstante, llama a la reflexión el hecho que el 100% de ellos, descarta todos los residuos en las papeleras de desechos comunes, aun considerándolos peligrosos, sin tomar en cuenta el tipo de padecimiento del paciente ya sea viral, microbiano o simple traumatismo.

Por otro lado vale destacar, que los pasilleros y las camareras (parte del personal de saneamiento) cuentan con un uniforme adecuado y el 71,43% de ellos emplean guantes plásticos en sus jornadas de trabajo y se encargan de la desinfección de los recipientes una vez por turno, mediante la adición de Gerdex® y aromatizantes. El personal encargado de la recolección y traslado de los desechos, desde el depósito hasta los contenedores, carecen totalmente de normas de seguridad e higiene y son los individuos que más expuestos se encuentran a los factores de riesgo, ya que las bolsas se rasgan al ser arrojadas por los ductos de gravedad y los desperdicios deben ser nuevamente recogidos mediante palas e introducidos en nuevas bolsas para su traslado hacia los contenedores.

Accidentes laborales presentados en el centro de salud durante el periodo 2004-2005

Según, los datos suministrados por el Departamento de Epidemiología del Hospital “Julio Criollo Díaz” (Hospital del Tórax), y tal como se observa en la Tabla III, en los últimos dos años (Enero

Tabla III. Accidentes laborales registrados en el Hospital Ruiz y Páez, Ciudad Bolívar – estado Bolívar, durante el periodo enero 2004 – agosto 2005.

		Número de accidentes laborales registrados	
		2004	2005
Situación en la que se produjo el accidente	Personal asistencial	12	9
	Estudiantes	4	6
	Administración de medicamentos	6	8
	Procedimientos Quirúrgicos	6	4
	Toma de muestra	4	3
Tipo de exposición	Mucosa	1	2
	Vía Percutánea:	15	13
	Superficial	9	9
	Profunda	5	4
	Laceración	1	0
Fuente	Paciente con SIDA	4	4
	Pacientes con VIH	2	3
	No VIH	2	1
	Estatus serológico desconocido	8	7
TOTAL		16	15

Fuente: Departamento de Epidemiología del Hospital del Tórax, Complejo Hospitalario Universitario Ruiz y Páez. Ciudad Bolívar - estado Bolívar, 2005

2004 - Agosto 2005) se han producido 31 accidentes laborales, de los cuales 21 casos (67,74%) fueron registrados en el personal asistencial, todos generados por objetos punzo-cortantes contentivos de fluidos sanguíneos, de los cuales 13 casos provienen de pacientes seropositivos. La mayoría de los accidentes se produjeron vía percutánea de forma superficial (51,06%; 18 casos), durante la administración de medicamentos o durante procedimientos quirúrgicos.

DISCUSIÓN

El manejo de los desechos sólidos intrahospitalarios (DSI), está considerado como uno de los principales factores de riesgo ocupacional (Coad, 1996; Junco *et al.*, 2003; Wilburn & Eijkemans, 2005), en donde los objetos punzo-cortantes constituyen el primer causal de los accidentes registrados, a través de ellos se pueden transmitir un sin número de enfermedades, siendo las más frecuentes la Hepatitis B y C, VIH / SIDA, malaria e infecciones por estreptococos y estafilococos. Adicionalmente, existe la posibilidad de que la exposición prolongada a contaminantes infecciosos y/o tóxicos, aunque en mínimos niveles, incremente la susceptibilidad del personal de salud y de los pacientes para desarrollar enfermedades pre-existentes (Zabala, 1998; Fernández & De la Cruz, 1999).

La manipulación inadecuada de los desechos Tipo C y otros factores de riesgo, pueden ser controlados mediante un manejo adecuado de los DSI. A este respecto, el centro hospitalario estudiado ha realizado una segregación parcial de los desechos, al promover dentro de las áreas de servicio la separación de los objetos punzo-cortantes y los desechos orgánicos, sin embargo, este esfuerzo por disminuir la propagación de agentes patógenos, es completamente anulado por la manera como se lleva a cabo el transporte interno y la disposición final de los mismos, esto como consecuencia de la carencia de materiales e instalaciones para realizar un adecuado manejo, así como el desconocimiento de las normativas legales vigentes por parte del personal asistencial y de saneamiento, agravado por el comportamiento que presentan muchos de los visitantes al centro hospitalario.

Este manejo inadecuado genera la mezcla de los desechos comunes con los desechos biocontaminados, portadores de una gran variedad y cantidad de microorganismos patógenos, lo cual constituye un alto riesgo no sólo para el personal hospitalario, sino también para la comunidad y la calidad del ambiente. Este hecho es agravado por las condiciones socio-económicas actuales de nuestro

país, donde el número de indigentes deambulando entre la basura ha aumentado (Aranguren, 2004) y por ende las probabilidades de desencadenarse focos de infecciones. A fin de determinar una adecuada diagnosis y plantear un correcto manejo de los DSI, también se debe considerar la supervivencia de los microorganismos patógenos en el ambiente, según su resistencia a las condiciones de temperatura, humedad y disponibilidad de materia orgánica; así como el rol de vectores como los insectos y roedores (Monge, 1997).

Para disminuir al máximo estos riesgos de infecciones, es necesario cuidar cada una de las etapas en el sistema de segregación y disposición final de los desechos, iniciando por la clasificación de los mismos, puesto que una segregación inadecuada no sólo pone en riesgo la salud, sino también eleva considerablemente los costos de manejo de residuos, por estar supuestamente aplicando, un tratamiento de desinfección y esterilización a grandes cantidades cuando sólo una pequeña porción lo requiere.

Se ha propuesto el uso de bolsas de recolección en diversos colores (Fig. 3), para agilizar tanto la segregación como las labores de transporte hacia las instalaciones para la aplicación del tratamiento (Junco & Rodríguez, 2000a; MINSA, 2004; Suárez *et al.*, 2005). Esta es una de las etapas más importantes dentro del manejo de los DSI, porque de ella depende la incorporación al ambiente de desechos “estériles”, que no atenten contra la biodiversidad ni contra la salud de las comunidades adyacentes a los centros de salud y a lo vertederos.

Por otra parte, la aplicación del nuevo sistema de manejo debe garantizar el traslado de los desechos, por medio del uso exclusivo de ascensores de carga, para evitar la exposición a pacientes, personal asistencial y visitantes; además de incluir las tecnologías necesarias que faciliten el reciclaje, tratamiento, almacenamiento y disposición final, en forma eficiente, económica y ambientalmente segura.

En el caso particular del centro de salud estudiado, el principal tratamiento aplicado es la incineración, en su mayoría de placentas; dado el alto contenido de humedad de este tejido, se generan daños a mediano y largo plazo en los bloques refractarios del equipo, recomendándose su sustitución por

incineradores de doble cámara, con la ventaja de convertir los gases generados en la cámara primaria, entre ellos las dioxinas (carcinógenos), en vapor de agua, CO₂ y restos de óxidos de nitrógeno y ácido clorhídrico, previendo que las cenizas resultantes deben ser enviadas en una funda debidamente etiquetada como residuo peligroso al relleno sanitario, debido al alto contenido de plomo, cadmio, cromo, mercurio y arsénico (MINSA, 1998; Zabala, 1998).

Asimismo, los fluidos orgánicos (Desechos Tipo D) y los desechos especiales (Tipo E), deben ser tratados mediante inactivación química antes de ser descartados. En el caso estudiado, son en su mayoría vertidos directamente al sistema de drenaje, con la afectación de la calidad de las aguas con sustancias tóxicas, como por ejemplo, los provenientes de radiología y bioanálisis. Además, de la proliferación microbiana presente en las ranuras de inodoros, lavaderos, etc., con la probabilidad de presentarse infecciones intrahospitalarias con el incremento del número de días de hospitalización en áreas quirúrgicas, salas de cura, entre otras.

Finalmente vale destacar, el alto índice de accidentes laborales, esencialmente en el personal asistencial, haciéndose indispensable la aplicación de cursos de adiestramiento para el manejo de los desechos potencialmente peligrosos e infecto-contagiosos, enfocando la mayor atención en los objetos punzo-cortantes, básicamente por ser el primer factor de riesgo y porque durante la investigación su presencia junto con los desechos comunes fue alarmante. Sin la incorporación y concienciación del personal, es poco factible la aplicación de un sistema óptimo de segregación y disposición de los desechos (Ruiz & Guevara, 1999; Junco & Rodríguez, 2000b).

En conclusión, aunque existe una normativa legal vigente para la clasificación y manejo de los desechos en establecimientos de salud, según el Decreto 2.218 y las recomendaciones de la Organización Mundial de la Salud, los resultados de la investigación indican que su aplicación no es efectiva en el centro hospitalario estudiado, pues apenas se cumple el 20,83% de la misma. El personal asistencial y de saneamiento, carecen de una preparación adecuada para el manejo de los desechos peligrosos e infecto-contagiosos, reflejado en el alto número de accidentes laborales, producidos en los 2 últimos años (31 casos), todos producto de la manipulación de objetos punzo-cortantes.

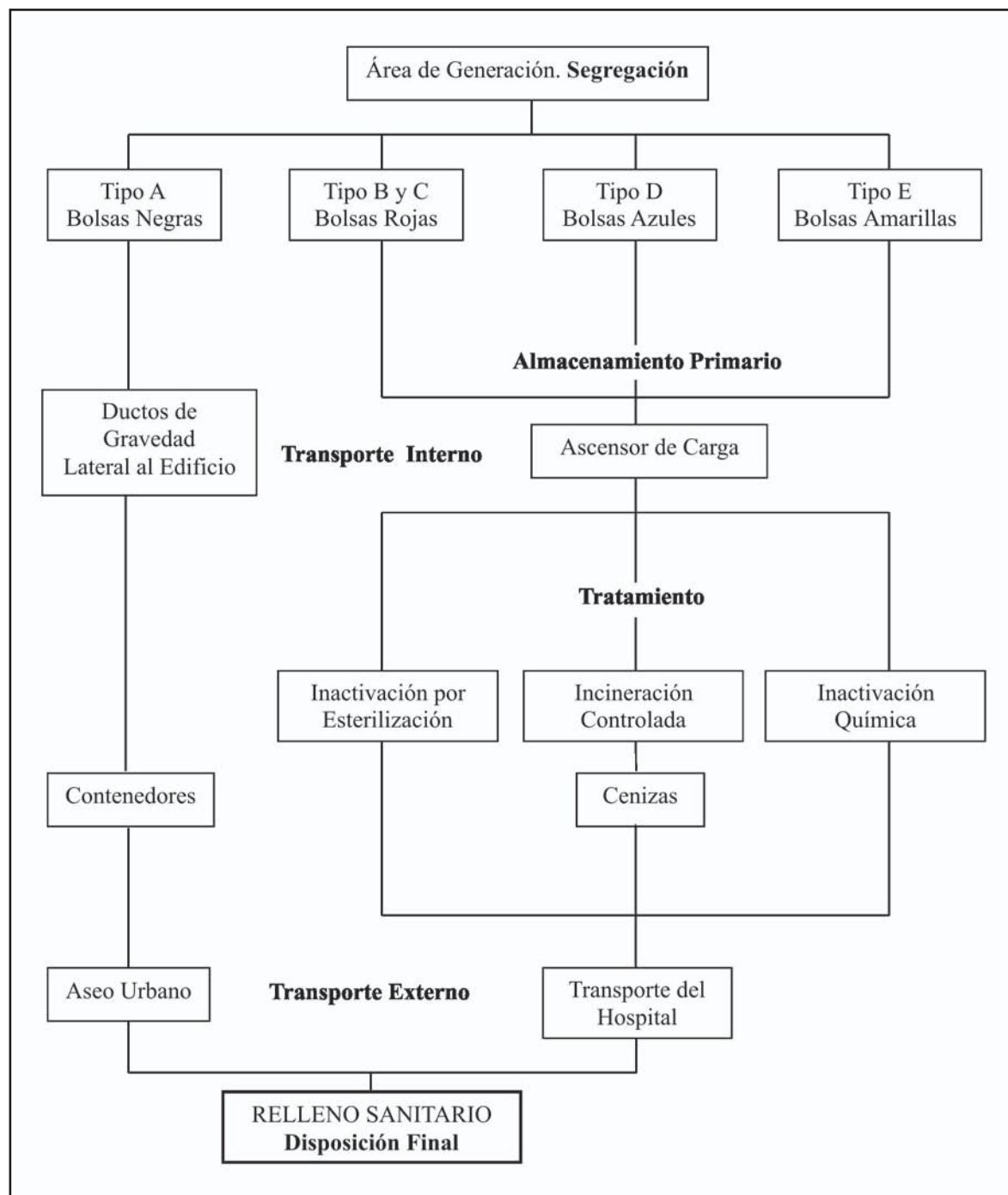


Fig. 3. Esquema planteado para mejorar el manejo de los desechos sólidos en el Hospital Ruiz y Páez, Ciudad Bolívar - estado Bolívar.

A partir del diagnóstico realizado, se proponen recomendaciones para optimizar el sistema de manejo de desechos en concordancia con el Decreto 2.218 y lo recomendado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) y el Centro Panamericano de Ingeniería Sanitaria y Ciencias del Ambiente (CEPIS), para disminuir el número de accidentes laborales y el riesgo de exposición de los pacientes y público en general, así como la minimización de los costos de manejo y tratamiento.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen la colaboración del Dr. Trino Eulacio, Director del Complejo Hospitalario Universitario Ruiz y Páez, y del Sr. Luis Olivar, Jefe del Departamento de Saneamiento Ambiental de este centro hospitalario, por permitir la entrada a las instalaciones y brindar información acerca del funcionamiento del mismo.

Diagnosis of the medical waste management in the Hospital Ruiz y Páez, Bolívar state, Venezuela

SUMMARY

Inadequate handling of solid waste coming from hospital facilities is considered as one of the principal occupational risk factors because of the infectious nature of some components and the presence of sharps waste. For this reason, the present analytic and descriptive investigation has as its goal the diagnosis of current waste management in the Ruiz y Páez Hospital, Bolívar state, Venezuela. Through random inspections carried at the different hospital service areas referred to, the implementation of a survey of cleaners and assistance personal was carried and photos taken. It was demonstrated that 79.19% of the Decree 2,218 "Rules for classification and waste handling coming from health establishments" was not complied with and that 100% of the questioned personal had not received training for the management of dangerous and infectious waste. In 2004-2005 31 occupational accidents with sharps objects were reported. From the information obtained, it is necessary to institute a new system of collection and final disposal of the medical waste generated. For the

establishment and achievement of this system, all the hospital community must be involved and trained.

Key Words: Medical waste, medical waste disposal, occupational risk.

REFERENCIAS

- Aranguren W. (2004). La pobreza en la agenda de la seguridad social en Venezuela. *Gaceta Laboral*. **10**: 377-396.
- Coad A. (1996). Manejo de desechos médicos en países en desarrollo. Organización Panamericana de la Salud. [Citado: Febrero, 2006]. Disponible en U.R.L: <http://www.cepis.ops.pe/bvsars/fulltext/manejo/manejo.htm>
- Fernández R. & De la Cruz F. (1999). Riesgo biológico ocupacional y medidas de seguridad en los laboratorios médicos. Centro Panamericano de Ingeniería Sanitaria y Ciencias del Ambiente. OPS/OMS. [Citado: Febrero, 2006]. Disponible en U.R.L: <http://www.cepis.ops-oms.org/eswww/fulltext/repind61/rbomslm/rboms.html>
- Gaceta Oficial. (1992). Decreto N° 2.218. *Manejo de desechos en establecimientos de salud*. Gaceta Oficial de la República de Venezuela. N° 4.418. Extraordinario. Caracas, Venezuela.
- González I. (2005). *Desechos peligrosos en servicios de urgencia en unidad de atención primaria de salud*. Medwave. Edición Abril. Año 5, N° 3.
- Junco R. & Rodríguez D. (2000a). Desechos hospitalarios: Aspectos educativos en la implementación de su manejo. *Rev. Cubana Hig. Epidemiol.* **38**: 195-200.
- Junco R. & Rodríguez D. (2000b). Desechos hospitalarios: Aspectos metodológicos de su manejo. *Rev. Cubana Hig. Epidemiol.* **38**: 122-126.
- Junco R., Martínez G. & Luna M. (2003). Seguridad ocupacional en el manejo de los desechos peligrosos en instituciones de salud. *Rev. Cubana Hig. Epidemiol.* **41**: 30-36.

- Mata A., Reyes R. & Mijares R. (2004). Manejo de desechos hospitalarios en un hospital tipo IV de Caracas, Venezuela. *Interciencia*. **29**: 89-93.
- Milton S. & Tsokos T. (2001). *Estadística para biología y ciencias de la salud*. Primera edición. Interamericana Mc Graw-Hill. Madrid, España.
- MINFRA (Ministerio de Infraestructura). (2000). *Levantamiento aerofotogramétrico Ciudad Bolívar - Soledad*. Escala 1: 25000 Vuelo, Caracas, Venezuela.
- MINSA (Ministerio de la Salud). (1998). Programas de fortalecimiento de servicios de salud. Serie: Documentos Técnicos. Tecnologías de tratamientos de residuos sólidos de establecimientos de salud. Lima, Perú.
- MINSA (Ministerio de la Salud). (2004). Norma Técnica: Procedimientos para el manejo de los residuos sólidos hospitalarios. Lima, Perú. [Citado: Noviembre, 2005]. Disponible en U.R.L: <http://www.minsa.gob.pe/pvigia>
- Monge G. (1997). Manejo de residuos en centros de atención de salud. Centro Panamericano de Ingeniería Sanitaria y Ciencias del Ambiente. OPS/OMS. Lima, Perú. [Citado: Febrero, 2005]. Disponible en U.R.L: <http://www.cepis.org.pe/eswww/proyecto/repidisc/publica/htd/htd069.html>
- Mora V., Mora Z., Mora H., González V., Galleta G., Díaz R. & García M. (2004). *Diagnóstico de la situación actual de los desechos generados en los centros hospitalarios: Dr. Américo Babó, Uyapar y Raúl Leoni Otero. Ciudad Guayana, Estado Bolívar, Venezuela*. Informe final del Proyecto código N° CI-2-0430-0910/00 presentado a la Comisión de Investigación, Núcleo Bolívar. Universidad de Oriente. 86pp.
- Ruiz M. & Guevara M. (1999). Papel del servicio de limpieza en el manejo de los desechos hospitalarios. *Repertorio Científico*. **5**: 32-35.
- Suárez C., Funes C. & Foo E. (2005). Manejo Interno y Externo de los Desechos Sólidos Domiciliarios y los Generados en los Establecimientos de la salud. *Geominas*. **33**: 41-37.
- Villena J., Cantanhede A., Monge G., Tello P. & Wharwood G. (1994). Manual para el manejo de desechos en establecimientos de salud. Centro Panamericano de Ingeniería Sanitaria y Ciencias del Ambiente. OPS/OMS. Lima, Perú. [Citado: Agosto, 2005]. Disponible en U.R.L: <http://www.cepis.org.pe/eswww/fulltext/repind62/guiamane/manuma.html>
- Wilburn S. & Eijkemans G. (2005). Prevención de lesiones con agujas y de la exposición ocupacional a patógenos de transmisión hemática. *Red Mundial de Salud Ocupacional*. **8**: 7-9.
- Zabala M. (1998). *Manual para el manejo de desechos en establecimientos de salud*. Comité interinstitucional para el manejo de desechos hospitalarios. Fundación Natura / Centro Panamericano de Ingeniería Sanitaria y Ciencias del Ambiente. Ecuador

Recibido el 15/03/2006
Aceptado el 05/10/2006

Revista de revistas

□ GÜRTLERR. E., CECEREM. C., LAURICELLA M. A., PETERSEN R. M., CHUIT R., SEGURA E. L. & COHEN J. E. (2005). **Incidence of *Trypanosoma cruzi* infection among children following domestic reinfestation after insecticide spraying in rural northwestern Argentina.** (Incidencia de infección a *Trypanosoma cruzi* en niños después de reinfestación intradoméstica tras rociamiento intradomiciliario de insecticidas en el área rural noroeste de Argentina. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **73**: 95-103.

Laboratorio de Eco-Epidemiología, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina; Instituto Nacional de Parasitología Dr. Mario Fatała Chaben, Buenos Aires, Argentina; Centro de Estudios Epidemiológicos, Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires, Argentina; Laboratory of Populations, Rockefeller and Columbia Universities, New York, New York

Después del aumento de la reinfestación con *Triatoma infestans* tras un rociamiento con insecticidas, la incidencia de la infección con *Trypanosoma cruzi* en niños se halló positivamente asociada con la abundancia doméstica de *T. infestans* infectados y la presencia de perros o gatos infectados en Amamá, un caserío rural en el noroeste de Argentina. Siete (12.1%) niños seronegativos a *T. cruzi*, sin historia de viajes o transfusión de sangre, convirtieron a seropositivos después de 3 años. Seis casos nuevos vivían en casas altamente infestadas con *T. infestans*, con altas proporciones de triatomíneos infectados con *T. cruzi* y que se habían alimentado de humanos o perros. Los restantes casos nuevos ocurrieron en una baja infestación doméstica detectada al final del periodo de exposición, en la cual muchos triatomíneos se habían alimentado de humanos. Los perros tenían una fuerza de infección 17 veces mayor que la de los niños (4.3% por año). Una vigilancia vectorial sostenida es crucial en áreas de alto riesgo de Enfermedad de Chagas, tales como el Gran Chaco.

□ ROHOUSOVA I., OZENSOY S., OZBE Y. & VOLF P. (2005). **Detection of species-specific**

antibody response of humans and mice bitten by sand flies. (Detección de respuesta anticuerpo especie-específica de humanos y ratones picados por flebótomos) *Parasitology*. **130**: 493-499.

Department of Parasitology, Faculty of Science, Charles University, Vinicna 7, 128 44 Prague 2, Czech Republic, Department of Parasitology, Medical School and Hospital, Ege University, 35100 Bornova-Izmir, Turkey.

La saliva de los flebótomos juega un rol importante en la transmisión de *Leishmania*. Nosotros caracterizamos la respuesta anticuerpo del huésped a la saliva de 3 especies de flebótomos. IgG específica fue observada en sueros de ratones picados experimentalmente así como en individuos habitantes de zonas endémicas de *Leishmania tropica* en Sanliurfa, Turquía. Los sueros de los habitantes de Sanliurfa mostraron altos niveles de IgG contra la saliva de *Phlebotomus sergenti* y *P. papatasi*, las dos especies más abundantes en el área, pero no reaccionaron con la saliva del flebótomos del Nuevo Mundo *Lutzomyia longipalpis*. Los pacientes con lesiones activas de *Le. tropica* poseían niveles significativamente más elevados de IgG anti- *P. sergenti* que los individuos sanos de la misma localidad mientras que los niveles de IgG anti- *P. papatasi* fueron iguales en ambos grupos. Las bandas de las proteínas más abundantes en la saliva de *P. papatasi* y *P. sergenti* reaccionaron con ambos sueros, de humanos y de ratones; sin embargo en *P. papatasi* la IgG de ratón reconoció preferentemente la banda de la proteína 42kDa mientras que la IgG humana reaccionó fuertemente con la banda de 30kDa. Nuestros datos sugieren que la respuesta anticuerpo a la saliva de flebótomos podría ser utilizada para monitorear la exposición de humanos y otros hospedadores a los flebótomos y podría ser utilizada como marcador de riesgos de transmisión de *Leishmania* en áreas endémicas.

□ GRILLET M. E., VILLAMIZAR N. J., CORTEZ J., FRONTADO H. L., ESCALONA M., VIVAS-MARTINEZ S. & BASANEZ M. G. (2005).

Diurnal biting periodicity of parous *Simulium* (Diptera: Simuliidae) vectors in the onchocerciasis Amazonian focus. (Actividad diaria de picada de hembras paras de especies de *Simulium* (Diptera: Simuliidae), vectores de oncocercosis en el foco Amazónico). *Acta Trop.* **94**: 139-158.

Laboratorio de Biología de Vectores, Instituto de Zoología Tropical, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela, Apartado Postal 47072, Caracas 1041-A, Venezuela.

Se describen los patrones horarios de picada de las tres principales especies vectoras de oncocercosis humana en el foco Amazónico entre Venezuela y Brasil, *Simulium guianense* s.l. Wise; *S. incrustatum* Lutz, and *S. oyapockense* s.l. Floch and Abonnenc. Se analizaron las series temporales de capturas horarias del número de hembras paras en cinco comunidades Yanomami durante la estación seca, lluviosa y sus periodos de transición entre 1995 y 2001 mediante el análisis armónico (asumiendo la presencia de un ritmo circadiano) y la correlación periódica (basada en el coeficiente r de Sperman). *Simulium guianense* s.l. mostró un patrón de actividad bimodal, con un pico menor a media mañana y uno mayor a las 16:00 hs. *Simulium incrustatum* exhibió una actividad principalmente unimodal ya sea temprano en la mañana o al mediodía según la localidad. *Simulium oyapockense* s.l. se alimenta durante todo el día, principalmente entre las 10:00 y las 16:00 hs, pero también mostró periodicidad bimodal en algunas localidades. Superponiéndose a los ciclos diarios endógenos especie-específicos, la actividad de las hembras paras mostró variación de acuerdo a la localidad, estación, temperatura del aire y humedad relativa, siendo la actividad de búsqueda del hospedador promovida durante la estación lluviosa donde se observan temperaturas altas y humedad baja, y reducida durante las horas mas calientes de la estación seca y/o de las transiciones. Los presentes resultados se discuten en términos de sus implicaciones para la biología y ecología, así como la epidemiología y control de la oncocercosis en Venezuela.

□ LOSADA S., CHACON N., COLMENARES C., BERMUDEZ H., LORENZO A., POINTIER J. P., THERON A., ALARCON DE NOYA. B. & NOYA O. (2005). ***Schistosoma*: cross-reactivity and antigenic community among different species.** (*Schistosoma*: reactividad cruzada y comunidad antigénica entre diferentes especies). *Exp Parasitol.* **111**: 182-90.

Seccion de Biohelmintiasis, Instituto de Medicina Tropical, Escuela de Medicina Luis Razetti, Facultad de Medicina, Universidad

Central de Venezuela, Apartado 47623, Los Chaguaramos 1041-A, Caracas, Venezuela.

No es inusual encontrar moléculas comunes entre diferentes especies del género *Schistosoma*. Cuando esas moléculas son antigénicas, pueden ser usadas en inmunodiagnóstico y vacunas, pero podrían también ser aplicadas a estudios taxonómicos y evolutivos. Para estudiar la reactividad cruzada y la comunidad antigénica entre diferentes especies de schistosomas, se evaluaron los plasmas de animales de laboratorio infectados con *Schistosoma bovis*, *S. guineensis*, *S. rodhaini*, *S. haematobium* y cuatro cepas de *S. mansoni* con un extracto crudo de vermes adultos de *S. mansoni* por Western blot. Usando un ensayo de antígeno múltiple (MABA), los plasmas de estos animales infectados fueron expuestos a grupos seleccionados de péptidos sintéticos de Sm28GST, Sm28TPI, Sm elastasa, Sm97, Sm32, Sm31 y Sm Catepsina L. Los resultados aquí presentados demuestran una reactividad cruzada diferencial y comunidad antigénica entre los grupos Mansoní y Haematobium, lo cual es relevante, como una nueva herramienta adicional para estudios filogenéticos de schistosomas así como para fines diagnósticos y para vacunas.

□ RODRIGUEZ - MORALES A. J., SANCHEZ E., VARGAS M., PICCOLO C., COLINA R., ARRIA M. & FRANCO-PAREDES C. (2006). **Pregnancy outcomes associated with *Plasmodium vivax* malaria in northeastern Venezuela.** (Complicaciones durante el embarazo asociadas a malaria por *Plasmodium vivax*, en el noreste de Venezuela). *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **74**: 755-757.

Instituto Experimental José Witremundo Torrealba, Universidad de Los Andes, Trujillo, Venezuela; Infectious Diseases Service, Hospital Santos Anibal Dominicki, Carúpano, Sucre, Venezuela; Division of Infectious Diseases, Emory University, Atlanta, Georgia; Hospital Infantil de Mexico, Federico Gómez, Mexico City, Mexico.

Aún cuando *Plasmodium vivax* es cada día más reconocido como una importante causa de morbilidad en mujeres embarazadas en áreas de baja transmisión malárica de Asia, poco se conoce acerca de los perfiles clínicos y epidemiológicos de *P. vivax* en mujeres embarazadas de América Latina. Nosotros describimos las características clínicas y los resultados del embarazo en una serie de 12 casos de malaria por *P. vivax* en mujeres complicadas de alguna manera por abortos o partos prematuros y en otros casos con grados significantes de anemia y trombocitopenia en una población donde *P. vivax* es endémico en el noreste de Venezuela.

INDICE ACUMULADO POR MATERIA, Vol XLVI , 2006

REVISIONES

Teniasis/Cisticercosis: Avances en diagnóstico inmunológico y molecular (Ferrer E.)	1
Impacto de la biología molecular, genómica y proteómica en el estudio de los Kinetoplastida (Ramírez J. L.).....	137

PARASITOLOGIA

Concordancia del diagnóstico malárico en Venezuela, año 2003 (Cáceres J. L. <i>et al.</i>)	49
Presencia de <i>Trypanosoma cruzi</i> en tejidos de ratas Wistar infectadas experimentalmente y sus fetos (Alarcón M. <i>et al.</i>)	137
Investigaciones sobre la transmisión vertical de <i>Trypanosoma cruzi</i> en ratas Wistar crónicamente infectadas (Moreno E. <i>et al.</i>)	149
Detección de infecciones subclínicas por <i>Trypanosoma vivax</i> en bovinos de fincas ganaderas de Mérida, Venezuela (Bolívar A. M. <i>et al.</i>)	87

ENTOMOLOGIA

The finding of <i>Rhodnius pallescens</i> Barber, 1932 (Reduviidae: Triatominae) in palm trees (<i>Attalea butyracea</i>) in north Costa Rica. (Zeledón R. <i>et al.</i>).....	15
Estructura y dinámica poblacional de <i>Triatoma sordida</i> Stål 1859 en una comunidad de <i>Butia yatay</i> en Argentina (Bar M. E.)	21
Concentraciones letales (CL50 y CL95) y dosis diagnósticas de fenitrotión y lambdacialotrina para <i>Lutzomyia evansi</i> (Diptera: Psychodidae) de Los Pajones, estado Trujillo, Venezuela (Alvarez L. <i>et al.</i>)	31
Mecanismos de resistencia a insecticidas organosintéticos en una población de <i>Anopheles aquasalis</i> Curry (Diptera: Culicidae) del estado Aragua (Figueroa Acosta L. E. <i>et al.</i>)	39
Revisión de la subfamilia Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) en Cuba (Hernández González Y. & González Broche R.)	107

Una nueva especie de <i>Culicoides</i> originaria de Venezuela (Diptera: Ceratopogonidae) (Perruolo G.)	115
--	-----

Acción patógena de una cepa venezolana de <i>Beauveria bassiana</i> para <i>Musca domestica</i> (Diptera: Muscidae) (Scorza-Dagert J. V. & Cova L. J.)	119
---	-----

Control temporal de moscas caseras (<i>Musca domestica</i>) en galpones avícolas mediante nebulizaciones con conidias de <i>Beauveria bassiana</i> (Cova L. J. & Scorza-Dagert J. V.)	131
--	-----

TERAPEUTICA

Síntesis de un complejo antimonial pentavalente (Ulamina) y su aplicación experimental para el tratamiento de leishmaniasis cutánea localizada en Venezuela (Scorza-Dagert J. V. <i>et al.</i>)	59
---	----

BIOLOGÍA GENERAL

Evaluación de factores de reproducción para detectar posible contaminación genética en cepas consanguíneas de ratones (Rosa de Jesús <i>et al.</i>)	161
---	-----

SALUD AMBIENTAL

Valuación de corrosión e incrustación en instalaciones hidráulicas de una planta de potabilización en el estado Bolívar, Venezuela (Mora Arellano V. & Cedeño J. L.)	67
---	----

Determinación de emisiones de solventes volátiles en un laboratorio de docente y de investigación de ingeniería química, Valencia, Venezuela (Mujica V. & Pérez C.)	79
--	----

Diagnóstico del sistema de recolección de desechos generados en el Hospital Ruiz y Páez, Ciudad Bolívar, estado Bolívar, Venezuela (Rodríguez G. <i>et al.</i>)	169
---	-----

INDICE ACUMULADO POR AUTORES, Vol. XLVI , 2006

A

Alarcón M.: 137, 149
Alfaro S.: 15
Alvarez L.: 31
Añez, N.: 87
Araujo S.: 137, 149
Ayala C.: 49

B

Bar M.E.: 21
Bolívar A.M.: 87
Borges R.: 149

C

Cáceres J.L.: 49
Campos E.: 40
Cedeño J.L.: 67
Colmenares M.: 137
Cova L.J.: 119, 131
Crisante G.: 87

D

de Jesús R.: 161
Duran Y.: 31

F

Ferrer E.: 1
Figueroa Acosta L.E.: 39

G

García-Lugo P.: 87
González A.: 31
González Broche R.: 107
Gutiérrez H.: 15

H

Hernández González Y.: 107

I

Itriago M.: 49

L

Lugo de Yarbuh A.: 137, 149

M

Mago N.: 169
Marín Álvarez M.: 39

Molina de Fernández D.: 39

Mora Arellano V.: 67, 169

Morales C.: 59

Morales J.A.: 15

Moreno E.: 137, 149

Moreno S.C.: 149

Mujica V.: 79

O

Oviedo M.: 31

P

Payares G.: 137

Pérez C.: 79

Pérez Pinto E.: 39

Perruolo G.: 115

Petit de Pena Y.: 59

Q

Quintero A.C.: 149

R

Ramírez A.: 49

Ramírez J.L.: 137

Rodríguez G.: 169

Rojas A.: 87

Rojas E.: 59

S

Scally M.: 15

Scorza B., J.V.: 59

Scorza-Dagert J.V.: 59, 119, 131

Suárez J.: 31

T

Teixeira M.G.: 87

Terán E.: 49

Torres E.: 161

Torres J.: 15

V

Vaccari E.: 49

Vargas J.A.: 15

Vázquez L.: 59

Z

Zeledón R.: 15

AGRADECIMIENTOS

El Comité Editorial del Boletín de Malariología y Salud Ambiental,
agradece su colaboración a los árbitros del Vol. XLVI N° 2, 2006:

Nestor Añez	Centro de Investigaciones Parasitológicas “J.F. Torrealba”, Universidad de los Andes, Mérida, Venezuela
Segundo Berroeta	Decanato de Medicina, Universidad Centro-Occidental “Lisandro Alvarado” (UCLA); Barquisimeto, Venezuela
Rafael Bonfante-Garrido	Decanato de Medicina, Universidad Centro-Occidental “Lisandro Alvarado” (UCLA); Barquisimeto, Venezuela
Rafael Borges	Instituto de Biomedicina, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela
Cléber Galvao	Laboratório Nacional e Internacional de Referência em Taxonomia de Triatomíneos, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 21045-900.
Leidi Herrera	Instituto de Zoología Tropical, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela
Renzo N. Incani	Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo, Valencia, Venezuela
Magda Magris	Centro Amazónico de Investigaciones en Enfermedades Tropicales, (CAICET), Puerto Ayacucho, Venezuela
Rodolfo Marcano	Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela, Maracay, Venezuela
Milena Mazzarri	Dirección de Vigilancia Epidemiológica, Ministerio de Salud, Maracay, Venezuela
Darjaniva Molina de Fernández	Servicio Autónomo Instituto de Altos Estudios “Dr Arnoldo Gabaldon”, Ministerio de Salud, Maracay, Venezuela
Victor Mora Arellano	Escuela de Ciencias de la Salud, Universidad de Oriente, Bolívar, Venezuela
Walter Mosca	Instituto de Biomedicina, Universidad Central de Venezuela, Caracas
Viky Mujica	Facultad de Ingeniería, Universidad de Carabobo, Valencia, Venezuela
Oscar Noya	Instituto de Medicina Tropical, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela
Frances Osborn	Instituto de Investigaciones en Biomedicina y Ciencias Aplicadas, Universidad de Oriente, Cumaná, Venezuela
Zulay Niño	Facultad de Ingeniería, Universidad de Carabobo, Valencia, Venezuela
Armando Notz	Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela, Maracay, Venezuela
José V. Scorza B.	Centro de Investigaciones “J.W. Torrealba”, Universidad de los Andes, Trujillo, Venezuela
Gustavo Spinelli	División de Entomología, Museo de La Plata, Paseo del Bosque s/n, 1900 La Plata, Argentina
Ludmel Urdaneta	Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo, Maracay, Venezuela
Servio Urdaneta	Instituto de Zoología Tropical, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela
Omar Verde	Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Central de Venezuela, Maracay, Venezuela
Rodrigo Zeledón	Laboratorio de Zoonosis, Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional, Heredia, Costa Rica.

Nota: El Comité Editorial también agradece la valiosa ayuda de Henry Rupp M.A., North Brunswick, New Jersey, U.S.A., por la traducción de las Instrucciones a los Autores y la revisión de los resúmenes en Inglés editados en este volumen.

BOLETÍN DE MALARIOLOGÍA Y SALUD AMBIENTAL GUÍA PARA LOS AUTORES

Presentación y redacción

Las contribuciones deben ser inéditas, escritas en español, inglés o portugués.

Cada trabajo se acompañará de una declaración firmada por el autor de correspondencia, en la que se especifique que no ha sido publicado previamente, que no se presentará en otra revista antes de conocer la decisión de publicación del Boletín y que el manuscrito ha sido leído y aprobado por todos los autores. Se deberá usar caracteres de estilo Times New Roman o Arial que midan 12 puntos. Todos los márgenes serán de una pulgada (2,4 cm).

La primera página debe incluir el título del trabajo, breve y específico, con máximo de 15 palabras, a continuación los nombres y los apellidos completos de todos los autores, nombre de la institución a la cual pertenecen y la dirección postal. Indicar el autor de correspondencia y su dirección electrónica.

Todos los artículos tendrán título y resumen en español e inglés. Es necesario también un título corto para su inclusión en el encabezado de las páginas pares. Los resúmenes, con un máximo de 15 –20 líneas, son contentivos de los aspectos más relevantes y principales conclusiones del trabajo. No deben utilizarse en los resúmenes abreviaturas, referencias o notas a pie de página. Al pie del resumen se incluirá una lista de 3 hasta 5 palabras claves, en español e inglés, que reflejen el contenido del documento. Se utilizarán como palabras claves únicamente aquellas que son aceptadas por bases de datos internacionales, las cuales pueden ser consultadas en las siguientes direcciones:

Palabras claves (Español): <http://decs.bvs.br/E/homepagee.htm>

Key Words (Inglés): <http://www.nlm.nih.gov/mesh/>

En el texto de los artículos originales se deberá seguir el siguiente orden: Resumen en español, Introducción, Materiales y métodos, Resultados, Discusión, Agradecimientos, Título y Resumen en inglés, Referencias y Anexos (Tablas y Figuras) en hojas aparte.

En las investigaciones en humanos, animales y el ambiente, deben ser tomados en consideración acuerdos internacionales sobre los aspectos éticos, por tanto debe ser expresamente citada en el trabajo la revisión y aprobación por un Comité de Bioética debidamente identificado.

Los artículos incluirán en los Agradecimientos, los apoyos recibidos de instituciones públicas o privadas para la realización del estudio, así como las relaciones personales o institucionales que han contribuido en la obtención y análisis de los resultados.

Para las referencias bibliográficas citadas en el texto se utilizará el nombre del autor y el año de la publicación entre paréntesis. Ejemplo:
(Scorza, 1988)

Si se trata de dos autores, ambos serán citados. Ejemplo:
(Scorza & Rojas, 1990)

Cuando son más de dos autores, se citará el nombre del primer autor, seguido por *et al.*, y el año correspondiente de la publicación. Ejemplo:
(Scorza *et al.*, 1988)

En el caso que los autores sean sujeto de la oración, solamente el año se escribirá entre paréntesis.

Ej. Scorza *et al.* (1999) demostraron que.....

La presentación de las referencias bibliográficas, se hará en orden alfabético y de acuerdo a las siguientes normas: Si se trata de revistas o publicaciones periódicas: apellido (s) del autor (es), inicial del nombre (s), (año), título del artículo, abreviatura de la revista (en cursiva), volumen (en negrita) y número de las páginas.

Ejemplo:

Scorza J.V. & Rojas E. (1990). La leishmaniasis tegumentaria venezolana: problemática contemporánea en el estado Trujillo. *Soluciones, Bol. Dir. Malariol. San. Amb.* **30**: 1-6.

Si el trabajo es publicado en un Suplemento debe citarse.

Cuando se trata de seis ó más autores, figurarán los apellidos e iniciales de los primeros 6 y se añadirá la expresión *et al.*

Ejemplo:

Bonfante G.R., Urdaneta I., Alvarado J., Anzola N.H., Torrealba J., Saldivia M.E. *et al.* (1995). Phlebotomine sand flies in five endemic leishmaniasis foci in Lara state, Venezuela. *Bol. Dir. Malariol. San. Amb.* **35** (Supl. 1): 53-62.

Si se trata de libros: apellido (s) del autor (es), inicial (es) del nombre (s), (año), título del libro, ediciones, casa editora y lugar de publicación (ciudad, país). Ejemplo:

Mosqueda C. G. (1974). *Hipótesis estadística con aplicaciones*. 2ª edición. Ed. Sobre Visión CA, Caracas, Venezuela.

Si se trata del capítulo de un libro: apellido (s) del autor (es), inicial (es) del nombre (s), (año), título del capítulo. página (s). En: Título del libro (en cursiva), apellido (s) e inicial (es) del editor del libro, edición, casa editora, lugar de publicación (ciudad), país:

Bertelli A., Donati L. & March J. (1968). Proteases inflammatory reaction. pp. 66-75. En: *Inflammation Biochemistry and Drug Interaction*. Eds. Bertelli A. & Houck J.C. 2ª ed. Excerta Med., London, U.K.

Citas tales como “datos no publicados” y “comunicación personal” no deben ser incluidas en la lista de referencias, serán incluidas en el texto (en cursiva). En relación a Trabajos en prensa, sólo pueden ser colocados en la lista de referencias, artículos ya aceptados y se citará la revista.

Los autores deben ajustarse al contenido de los Códigos de Nomenclatura Internacional y al Sistema de Medidas Internacionales (SI). Este último se basa en el sistema métrico

decimal según el cual los símbolos de las unidades no toman la terminación del plural (5 km y no 5 kms) ni van seguidos de punto (10 mL y no 10 mL.).

Las tablas y figuras, deben estar referidas oportunamente en el texto y serán debidamente identificadas con el número en el orden correlativo, títulos, fuentes (cuando sea necesario) y leyendas.

Las figuras se presentarán utilizando símbolos claros que permitan identificar puntos que requieran ser resaltados o reducidos. Se identificarán con su número y en hojas apartes se presentarán las leyendas correspondientes.

Las fotografías o imágenes deben ser escaneadas o digitalizadas a una resolución no menor a 300 dpi y guardadas bajo el formato o extensión JPG; de no poder cumplir con estos requerimientos enviar original de la fotografía o imagen con su debida protección o sobrecubierta. En casos especiales se considerará la posibilidad de la publicación de las figuras, fotografías o imágenes en color.

En el caso de las microfotografías y dibujos, tratar de la misma manera que las fotografías e imágenes y señalar el aumento o escala correspondiente. En relación a Mapas y Planos, cada uno en una hoja aparte con su leyenda correspondiente en un formato de 11,3 x 18,4 cms. como máximo.

La extensión de los artículos no debe ser mayor de 20 páginas en papel tamaño carta (28 x 21,5 cm), escritas a doble espacio.

Envío de los artículos

Los trabajos deben ser enviados a los editores del Boletín preferiblemente por vía electrónica (bmsave@yahoo.com) o por correo aéreo o terrestre en sobre contentivo de la carta dirigida a los Editores y el artículo en un CD en lenguajes compatibles con Microsoft® Windows®, con original y una (1) copia.

Igualmente, para el envío de toda correspondencia relacionada o solicitando constancias, referencias, sugerencias, observaciones y otros deberán dirigirse a la atención al Editor, por correo especial a la dirección:

Boletín de Malariología y Salud Ambiental,
antiguo Edificio de Malariología, Av. Bermúdez Sur,
Maracay, Edo. Aragua -Venezuela.
Teléfonos: (58-0243) 2325633 / 2320833 / 2322645.
Fax: (58-0243) 2325633
E-mail: bmsave@yahoo.com

Sobre el arbitraje y la aceptación de los artículos

Los trabajos sometidos para publicación en el Boletín de Malariología y Salud Ambiental serán sometido a un proceso de revisión y arbitraje. El plazo para la respuesta a los autores dependerá de la complejidad del tema y de la disponibilidad de los especialistas en el área.

En una primera revisión el Comité Editorial seleccionará los artículos con base en los criterios generales y objetivos de la revista. Seguidamente el artículo es enviado a dos (2) especialistas en el área específica. Los Editores y el Comité Editorial estarán atentos a los posibles conflictos de interés que puedan inhabilitar los árbitros para evaluar un determinado manuscrito.

Estos examinarán la calidad científica del manuscrito independientemente y emitirán su opinión razonada, recomendando o no la aceptación del artículo para la publicación. El trabajo con las observaciones y sugerencias de los árbitros será devuelto al Autor de correspondencia quien deberá enviar la nueva versión con una explicación detallada sobre los cambios efectuados, acatando las recomendaciones o, de no aceptarlas, argumentando las razones del porqué no las aceptan.

Es competencia del Comité Editorial la decisión final acerca de la publicación del artículo, una vez que haya verificado el cumplimiento de las condiciones señaladas y analizado la respuesta de los autores.

Toda decisión se comunicará por escrito al Autor de correspondencia con la mayor rapidez posible.

Después del arbitraje, los manuscritos se someterán a un procesamiento editorial que puede incluir, en caso necesario, su condensación y la supresión o adición de cuadros, ilustraciones y anexos. La versión editada (prueba de imprenta) se remitirá al Autor principal para su revisión y aprobación y para que conteste cualquier pregunta adicional del editor.

El Boletín de Malariología y Salud Ambiental se reserva todos los derechos legales de los manuscritos aprobados para su publicación, así como el derecho de hacer los ajustes y cambios que aseguren la calidad de la publicación. Sin embargo, no se hace responsable de los conceptos u opiniones expresados en el trabajo. Los originales no se devolverán en ningún caso.

Los Editores, el Comité Editorial y los árbitros se declaran formalmente no autorizados para utilizar con fines privados o particulares, la información obtenida a través de la revisión de los manuscritos. Así mismo, se respetará el derecho a la confidencialidad de los revisores y editores.

Una vez publicado el trabajo, el autor de correspondencia recibirá vía e-mail la versión PDF y 20 separatas por correo.

BOLETÍN DE MALARIOLOGÍA Y SALUD AMBIENTAL

INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

Style and format

Contributions should be unpublished and written in Spanish, English or Portuguese.

Each work should be accompanied by a signed declaration by the corresponding author in which he specifies that the work has not been previously published and that it has not been presented to another publication prior to a decision about publishing in the Bulletin of Malariology and Environmental Health and that the manuscript has been read and approved by all the authors. Font should be Times New Roman or Arial, 12 points. All margins should be 2.4 cm (0.9 inch).

The first page should include the title of the work, brief and specific, with a maximum of 15 words, the complete names of all the authors, the name of the institution for each author and the postal address. The corresponding author and his electronic address should be indicated.

All articles will have a title and abstract in Spanish and English. A short title is necessary for the running title in the headers of the even pages. The abstracts, with a maximum length of 15—20 lines, summarize the most relevant aspects and the principal conclusions of the work. Abbreviations or footnotes should not be used in the abstract. At the end of the abstract, there should be a list of 3 to 5 key words, in Spanish and English, which reflect the content of the document. Use only key words that are accepted by international data bases, which can be consulted at the following site:

Key words (Spanish): <http://decs.bvs.br/E/homepage.htm>

Key words (English): <http://www.nlm.nih.gov/mesh/>

The text of articles should be in the following order: Abstract in Spanish, Introduction, Materials and methods, Results, Discussion, Conclusions, Acknowledgement, Title and Summary in English, References and Annexes (Tables and Figures on separate pages).

In investigations of humans, animals and the environment, consideration should be given to international accords on ethical aspects, which should be expressly cited the work with review and approval by a properly identified Bioethics Committee.

Articles will include in the Acknowledgement the support received from public or private institutions for completion of the study as well as the people or institutions which have contributed in the obtaining and analysis of the results.

For bibliographic references cited in the text, place the name of the author and the year of publication in parentheses: (**Scorza, 1988**)

Two-author citations are cited as follows:
(**Scorza & Rojas, 1990**)

When there are more than two authors, cite the name of the first author, followed by *et al.* and the year of publication of the cited reference; e.g. (**Scorza et al., 1988**)

In the event the authors may be the subject of a sentence, only the year is placed in parentheses; e.g. **Scorza et al. (1999)** demonstrated that....

Bibliographical references will be listed in alphabetical order in the following manner:

If the work is a journal or periodical publication: name(s) of author(s), initial of the first name(s), (year), title of the article, abbreviated name of the journal in italics, volume in bold type, and the page numbering.

Example:

Scorza J.V. & Rojas E. (1990). La leishmaniasis tegumentaria venezolana: problemática contemporánea en el estado Trujillo. *Soluciones. Bol. Dir. Malariol. San. Amb.* **35**: 1-6.

If the work is a supplement and when there are 6 or more authors, list the names and initials of the first 6 and add *et al.*

Example:

Bonfante G. R., Urdaneta L., Alvarado J., Anzola N. H., Torrealba J., Saldiva M. E. *et al.* (1995) Phlebotomine sand flies in five endemic leishmaniasis foci in Lara state, Venezuela. *Bol. Dir. Malariol. San. Amb.* **35** (Supl. 1): 53-62.

If the work is a book: list the name(s) of the author(s), initials of first name(s), (year), title of the book, edition, publishing house and place of publication (city and country).

Example:

Mosqueda C. G. (1974). *Hipótesis estadística con aplicaciones*. 2nd edición. Ed. Sobre Visión CA, Caracas, Venezuela.

If the work is a chapter in a book: list the name(s) of author(s), initial(s) of first name(s), (year), title of the chapter, and page(s). Give book title (in italics), name(s) and initial(s) of the editor(s) of the book, the edition, the publishing house, and place of publication (city and country).

Example:

Bertelli A., Donati L. & March J. (1968). Proteases inflammatory reaction. pp. 66-75. In: *Inflammation Biochemistry and Drug Interaction*. Eds. Bertelli A. & Houck J.C. 2nd ed. Excerta Med., London, U.K.

Citations such as “no date of publication” and “personal communication” should not be included in the list of references and should be shown in the text in italics. Regarding works in press, only articles already accepted and cited in the article may be placed in the list of references.

Authors should arrange the content to conform to the Code of International Nomenclature and International System of Measurement (SI). This is based on the metric system in which units do not have plural endings (5 km not 5 kms) nor are they followed by periods (10 mL not 10 mL.).

Tables and figures should be referred to appropriately in the text and will be properly identified in correlative order: titles, sources (when necessary) and legends.

Presented figures will use clear symbols that need to be highlighted or reduced. They will be identified with their number, corresponding legends will be put on separate pages.

Photographs or pictures should be digitized or scanned with a resolution of no less than 300 dpi and saved in JPG format; if these requirements cannot be met, the photographs or pictures should be sent with appropriate protective cover. In special cases, the possibility of publishing photographs or pictures in color will be considered.

Microphotographs and drawings will be treated in the same manner as photographs and pictures and enlargement or scale indicated. Maps and plans should be on a separate page with their corresponding legend with a maximum size of 11.3 x 18.4 cm (4.45 x 7.25 inch).

Papers should be no longer than 20 pages on paper 28 x 21.5 cm (8.5 x 11 inch) as a maximum size.

Article submission

Preferably papers should be sent to the editors of the Bulletin electronically (bmsave@yahoo.com) or by air or terrestrial mail in an envelope with a letter directed to the editors and with the article on a CD in language compatible with Microsoft® Windows® with the original and one (1) copy.

Likewise, all related correspondence or documentary proof, references, suggestions, remarks and other matters should be directed by mail to the editor at the following address:

**Boletín de Malariología y Salud Ambiental,
Antiguo Edificio de Malariología, Av. Bermúdez Sur,
Maracay, Ed. Aragua – Venezuela.
Telephone: (58-0243) 2325633 / 2322645.
Fax: (58-0243) 2325633
E-mail: bmsave@yahoo.com**

Review and acceptance of articles

Articles submitted for publication in the Bulletin of Malariology and Environmental Health will undergo a process of review and refereeing. The period for responding to authors will depend on the complexity of the paper and the availability of specialists in the field.

In the first review the Editorial Committee will select articles on the basis of the general criteria and objectives of the Bulletin. Next the article will be sent to two (2) specialists in the specified area. The editors and the Editorial Committee will be seek to avoid possible conflicts of interest that could disqualify referees from evaluating a particular manuscript.

These specialists will evaluate the scientific quality of the manuscript and will submit their reasoned opinions, recommending, or not recommending, acceptance of the article for publication. The work with the observations and suggestions of the referees will be returned to the corresponding author who will send a new version with a detailed explanation of the changes made, accepting the recommendations or not and presenting the reasons for not accepting them.

The Editorial Committee has the final decision concerning the publication of the article once they have verified compliance with indicated conditions and have analyzed the response of the authors.

All decisions will be sent by letter to the corresponding author as quickly as possible.

After the review, manuscripts will be subject to an editorial process which may include, in the event it is necessary, its condensation and the deletion or addition of charts, illustrations and annexes. The edited version (galley proof) will be sent to the principal author for his review and approval and his reply to any additional questions from the editor.

The Bulletin of Malariology and Environmental Health reserves the legal rights to the manuscripts approved for its publication as well as the right to make adjustments or changes which will insure the quality of the publication. However, it is not responsible for the ideas or opinions expressed in the work. The originals will not be returned under any circumstances.

The editors, the Editorial Committee and the referees formally state they are not authorized to use for private or personal ends information obtained through review of the manuscripts. In the same way they will respect the right of confidentiality of the reviewers and editors.

Once the work is published, the corresponding author will receive by e-mail a PDF version and 20 offprints by mail.

BOLETÍN DE MALARIOLOGÍA Y SALUD AMBIENTAL

(ISSN-1690-4648)

(antes: Boletín de Malariología y Saneamiento Ambiental)

El Boletín de Malariología y Salud Ambiental es una revista científica que publica artículos sobre diferentes aspectos de la Medicina Tropical (incluyendo patología, estudios clínicos, experimentales y terapéuticos, estudios sociales, epidemiología y control), Parasitología (protozoología, helmintología, entomología, malacología, bioquímica, inmunología, biología molecular, genética), Ingeniería Sanitaria y Salud Ambiental.

Es objetivo de la revista publicar nuevos conocimientos y metodologías para el entendimiento de la dinámica de la transmisión de enfermedades infecciosas virales y parasitarias y sus vectores, dentro de su contexto eco- y socio-epidemiológico, en apoyo y para el diseño y manejo oportuno y adecuado de los programas de prevención y control y la salud ambiental.

El Boletín de Malariología y Salud Ambiental es una publicación periódica semestral con un (1) volumen y dos(2) números (Julio y Diciembre) por año, distribuida nacional e internacionalmente en formato impreso y en formato electrónico a través de la siguiente dirección de Internet: <http://www.iaesp.edu.ve>

El Boletín está estructurado en nueve Secciones

- I.- **Artículos Originales.** Aportes inéditos en las áreas antes mencionadas de Medicina Tropical, Parasitología, Ingeniería Sanitaria, Salud Ambiental.
 - II.- **Revisiones** sobre los temas de competencia del Boletín.
 - III.- **Notas Científicas y/o Tecnológicas.** Comunicaciones cortas sobre hallazgos y/o resultados preliminares, nuevas técnicas y metodologías.
 - IV.- **Reportes Epidemiológicos.** Actualización de los datos epidemiológicos sobre distribución geográfica y demográfica, prevalencia e incidencia.
 - V.- **Revista de revistas.** Resúmenes de artículos publicados en otras revistas o de Trabajos Especiales de Grado.
 - VI.- **Forum.** Discusión acerca de controversias sobre análisis de situaciones, programas, proyectos o intervenciones de salud.
 - VII.- **El Hombre y la Ciencia.** Biografía de Científicos que se han destacado a nivel nacional y/o internacional en el área de la Salud y del Saneamiento Ambiental.
 - VIII.- **Cartas al Editor.** Comunicaciones dirigidas a la redacción relacionadas con tópicos de interés para difusión en el Boletín de Malariología.
 - IX.- **Noticias.** Información sobre reuniones científicas nacionales e internacionales, Congresos, Simposios, Talleres y otros eventos relevantes.
-

