



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

PERFIL PROTEICO DE LA HEMOLINFA DE
Triatoma pallidipennis INFECTADO CON
Trypanosoma cruzi

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A
P R E S E N T A:

Wendy Beatriz Espinosa De Aquino



DIRECTOR DE TESIS:
Dra. Bertha Espinoza Gutiérrez

México D.F.

2010



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: Dra. Elsa Guadalupe Escamilla Chimal

VOCAL: Dra. Laura del Carmen Vargas Parada

SECRETARIO: Dra. Bertha Espinoza Gutiérrez

1er SUPLENTE: Dra. Deyanira Pérez Morales

2º SUPLENTE: M. en C. Ignacio Martínez Martínez

SITIO DONDE SE DEESARROLLÓ EL TRABAJO: instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM. Departamento de Inmunología. Laboratorio de Tripanosomiasis Americana.

ASESOR DEL TEMA: Dra. Bertha Espinoza Gutiérrez

SUSTENTANTE: Wendy Beatriz Espinosa De Aquino

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue dirigido por la Dra. Bertha Espinoza Gutiérrez en el laboratorio de estudios sobre tripanosomiasis americana del Departamento de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, con el apoyo del proyecto DGAPA (UNAM), IN 229209.

Agradezco a la Dra. Bertha Espinoza por permitirme realizar mi trabajo de investigación en su laboratorio.

Al Dr. Ricardo Alejandro por proporcionar el material biológico para la realización de este trabajo.

Al M. en C. Ignacio Martínez por su asesoría técnica a lo largo del proyecto.

Al jurado asignado por sus aportaciones que mejoraron y enriquecieron este trabajo

DEDICATORIA

A mis padres, Daisy y Oscar por su amor y apoyo que me han brindado siempre y que sé me seguirán dando. A mi hermano favorito, Rodrigo, por todas las risas y peleas y todos los momentos que hemos pasado juntos.

A mi abuela, sin la cual no habría sobrevivido durante mi paso por la carrera. A mis otros papás Marú y Jorgito, que han estado conmigo siempre.

A todos los demás de la familia por los momentos increíbles que hemos pasado juntos.

A mis amigas de toda la vida Marthita Luz, Lucía y Brenda, que me han acompañado en todos los momentos importantes de mi vida.

A mis biólogos favoritos Johana, Rafa, Claudia, Irina, Melisa y Gisel, con los que he compartido tantas experiencias maravillosas.

A mis grandes amigas Natalia, Yeya y Guiedha por todos los momentos nuevos e interesantes que hemos pasado.

A mis compañeros del laboratorio, por los momentos que hicieron más pasable el trabajo y todo el tiempo en el laboratorio, y sin los cuales muchas veces no hubiera comido: Nacho, Deya, Natalia, Mary, Diana, Ana, Ale, Mirna, Eréndira y Julio.

ÍNDICE

	Pág.
RESUMEN.....	1
I. INTRODUCCIÓN.....	2
1.1. ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR INSECTOS.....	2
1.1.1. Eficiencia y especificidad de los vectores.....	2
1.2. ENFERMEDAD DE CHAGAS.....	4
1.2.1. Parásito.....	4
1.2.2. Ciclo de vida.....	5
1.2.3. Formas de transmisión.....	6
1.2.4. Manifestaciones clínicas.....	7
1.2.5. Epidemiología.....	8
1.3. INSECTOS TRIATOMINOS.....	9
1.3.1. Taxonomía.....	9
1.3.2. Distribución.....	10
1.3.3. Ciclo de vida.....	11
1.3.4. Morfología.....	12
1.3.5. Fisiología.....	13
1.3.5.1. Alimentación, digestión, nutrición y excreción.....	13
1.3.5.2. Sistema circulatorio.....	14
1.3.6. Capacidad vectorial.....	15
II. ANTECEDENTES.....	16
2.1. <i>Triatoma pallidipennis</i>	16
2.2. INTERACCIONES VECTOR-PARÁSITO.....	16
2.3. PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS CONTRA PARÁSITOS FLAGELADOS.....	17
III. JUSTIFICACIÓN.....	19
IV. HIPÓTESIS.....	20
V. OBJETIVOS.....	21
5.1. OBJETIVO GENERAL.....	21

5.2. OBJETIVOS PARTICULARES.....	21
VI. MATERIAL Y MÉTODOS.....	22
6.1. INSECTOS UTILIZADOS.....	22
6.2. COLECTA DE HEMOLINFA.....	22
6.3. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS.....	22
6.4. ELECTROFORESIS.....	23
6.5. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS.....	23
6.6. PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS POLICLONALES.....	23
6.7. WESTERN BLOT.....	24
6.8. DETECCIÓN DE PROTEÍNAS DE BAJO PESO MOLECULAR.....	24
6.9. DETECCIÓN DE GLICOPROTEÍNAS.....	25
VII. RESULTADOS.....	26
7.1. PROTEÍNAS PRESENTES EN LA HEMOLINFA DE <i>T. pallidipennis</i>	26
7.2. ANTICUERPOS POLOCLONALES CONTRA PROTEÍNAS DE LA HEMOLINFA DEL VECTOR.....	26
7.3. CAMBIOS EN LAS PROTEÍNAS DE LA HEMOLINFA DEL INSECTO DURANTE UNA CINÉTICA DE INFECCIÓN.....	27
7.3.1. Colecta de hemolinfa.....	28
7.3.2. Perfil proteico de la hemolinfa durante la cinética de infección.....	28
7.3.3. Detección de cambios en las proteínas con los anticuerpos policlonales.....	31
7.3.4. Proteínas de bajo peso molecular.....	35
7.4. GLICOPROTEÍNAS.....	39
VIII. DISCUSIÓN.....	41
8.1. PERFIL PROTEICO DE LA HEMOLINFA DE <i>T. pallidipennis</i> INFECTADO CON <i>T. cruzi</i>	41
IX. CONCLUSIONES.....	45
X. PERSPECTIVAS.....	45
XI. REFERENCIAS.....	46

Resumen

Los insectos de la subfamilia *Triatominae* (Hemiptera: Reduviidae) son los vectores del parásito hemoflagelado *Trypanosoma cruzi*, agente causal de la Enfermedad de Chagas, una de las principales enfermedades parasitarias en América Latina. La interacción vector-parásito juega un papel crucial para el establecimiento del parásito en el insecto y su posterior transmisión a los huéspedes vertebrados. Este trabajo pretende identificar cambios en los componentes del sistema circulatorio del insecto *Triatoma pallidipennis*, un vector de importancia epidemiológica en el país, provocados por la presencia del parásito en su tracto digestivo. Muchos de los reportes sobre interacción triatomino-*T. cruzi* están realizados en insectos Sudamericanos, de ahí la relevancia de este trabajo, ya que las interacciones entre los vectores mexicanos y las cepas que transmiten son desconocidas. Al analizar la hemolinfa se encontraron proteínas que se expresan únicamente cuando el vector está infectado, principalmente de bajos pesos moleculares (9 y 6kDa). Por su parte los insectos no infectados expresan una proteína de 16kDa que no se observa cuando el parásito está presente, y el patrón proteico al día 41post infección cambia de forma radical en estos insectos, aumentando la cantidad de proteínas entre los pesos 49 y 26kDa. Con el fin de analizar cambios específicos en los componentes de la hemolinfa, se produjeron anticuerpos policlonales contra las proteínas de mayor expresión (200, 110, 73, 64 y 45kDa). El suero α -73kDa da un reconocimiento monoespecífico en el peso esperado, por otra parte, los sueros α -45 y α -64kDa muestran un reconocimiento en la banda de esos pesos y una más en 110kDa; el suero α -110kDa reconoce una proteína de este peso, una de 45kDa y una de 26kDa; el suero de α -200kDa muestra un débil reconocimiento en la región de 200kDa y 100kDa. Con estos sueros se dio seguimiento al patrón de proteínas expresadas en insectos infectados y no infectados, se observó que los cambios ocurrieron principalmente al día 41, en donde los insectos no infectados dejan de expresar proteínas de 110, 100 y 26kDa, que fueron reconocidas por los sueros α -110kDa y α -200kDa y expresan proteínas de 55 y 50kDa, reconocidas por el suero α -73kDa.

Con esto comprobamos que hay modificaciones en las proteínas del sistema circulatorio de esta especie cuando se encuentra infectada con *T. cruzi*.

I. Introducción

1.1. Enfermedades transmitidas por insectos

Una gran proporción de las infecciones más serias que afectan a los humanos son transmitidas por artrópodos, muchas de ellas son enfermedades tropicales de importancia mundial, por ejemplo la malaria, fiebre amarilla, enfermedad del sueño, dengue, filariasis y enfermedad de Chagas, entre otras (Busvine 1975).

En el pasado, la importancia de las enfermedades dependía en gran medida, del impacto que éstas tenían sobre las poblaciones civilizadas; es por esto, que las violentas y letales epidemias de Europa tenían más importancia que las raras enfermedades que afectaban los trópicos, las cuales fueron misteriosas y desconocidas hasta el siglo XIX. Con el inicio de la exploración y colonización, estas enfermedades fueron contraídas por los exploradores, por lo que empezaron a llamar la atención. Pero no fue sino hasta finales del siglo XIX que comenzaron los esfuerzos por descubrir las formas en las que éstas se propagaban. En 1877, Patrick Manson descubrió mientras trabajaba en China un parásito nemátodo de humanos (*Wuchereria bancrofti*) en mosquitos de la especie *Culex pipiens fatigans*. Esto proporcionó la primera evidencia de que un organismo patógeno del hombre puede llevar a cabo una parte su desarrollo en un organismo invertebrado (Busvine 1975, Service 1980)

Durante los siguientes 50 años se descubrió que una gran cantidad de insectos están implicados en la transmisión de diversas enfermedades. En esta época de descubrimientos, el reporte original de Carlos Chagas, médico brasileño, fue único en la historia de la medicina, pues él solo describió con gran detalle el ciclo de transmisión del parásito (vectores, huéspedes y un nuevo organismo infeccioso) y las manifestaciones clínicas agudas del primer caso humano descrito para esta enfermedad, conocida como Tripanosomiasis Americana o Enfermedad de Chagas (Service 1980, Rassi Jr *et al.* 2010).

1.1.1. Eficiencia y especificidad de los vectores

En el curso de la evolución se han dado una serie de adaptaciones que permiten a los parásitos alternar entre dos organismos de diferentes tamaños: un animal grande o planta y un animal pequeño como los artrópodos (principalmente insectos). Se ha visto que esta alternancia es benéfica ya que provee de un reservorio más grande y longevo y es más probable que un gran número de insectos adquieran el parásito en un amplio periodo. Por otro lado, los parásitos que pertenecían originalmente a organismos vertebrados encuentran una nueva y más extensa forma de transmisión (Busvine 1975). Cuando las enfermedades que afectan a humanos y animales se transmiten por artrópodos, se considera a estos últimos como “vectores” responsables de la propagación de la enfermedad, y los vertebrados son los reservorios de la infección (Busvine 1975, Service 1980).

El hecho de vivir en más de un huésped provocó la selección de algunas adaptaciones que permiten a los parásitos sobrevivir. Entre éstas se encuentran modificaciones en el metabolismo, sistemas de defensa y mecanismos de transmisión.

a) Modificaciones metabólicas. La proliferación en el nuevo huésped debe implicar adaptaciones similares a las necesarias durante el parasitismo original. Esto incluye el desarrollo de sistemas de enzimas capaces de absorber y metabolizar fuentes de alimento de los tejidos del nuevo huésped y protección contra el sistema inmune. Estas modificaciones bioquímicas son complejas y pueden ser las responsables de que algunos microorganismos tengan un número limitado de vectores y huéspedes. En Sudamérica, el tripanosoma de la Enfermedad de Chagas puede desarrollarse en varias especies de chinches triatomínicos y por consiguiente muchas de éstas pueden dispersar la enfermedad al humano en las heces contaminadas. Sin embargo, sólo pocos triatomínicos viven en una estrecha relación con el hombre y por ello se consideran vectores de importancia médica. Ocurre algo similar con las moscas tse-tse, entre las cuales sólo algunas que se alimentan del hombre son capaces de transmitir la enfermedad del sueño, producida por otro tripanosoma. En otras enfermedades existe una gran especificidad de los parásitos con su insecto vector, no sólo por su ecología o comportamiento, sino porque éste se puede desarrollar y multiplicar sólo en ciertas especies; tal es el caso de la malaria, que es transmitida al humano únicamente por mosquitos del género *Anopheles*, debido a que el parásito de humanos no es capaz de sobrevivir en otro género de insectos (Busvine 1975).

b) Mecanismos de transmisión. Los mecanismos de transmisión muestran tendencias evolutivas hacia las rutas más eficientes. La forma más simple de transmisión es la mecánica en la cual el vector no se parasita. En estos casos los vectores actúan simplemente como un vehículo para llevar al parásito de un sitio a otro, un ejemplo de esta forma de transmisión son las moscas de casa, las cuales visitan las heces humanas en busca de alimento o un lugar para poner huevos y después caminan sobre los alimentos. Favoreciendo la transmisión de gérmenes que producen enfermedades entéricas que se transmiten por la vía oral-fecal. Este tipo de vector accidental no es muy eficaz, ya que depende del corto periodo de tiempo en que el vector permanece contaminado.

Otra forma de transmisión es la proliferación del parásito en la faringe o intestino del vector, en donde los parásitos se multiplican y son regurgitados en la siguiente comida, como ocurre en la transmisión de *Leishmania* por las moscas de la arena *Phlebotomus* y *Lutzomia* (Busvine 1975, Service 1980).

En otros casos, los patógenos se multiplican en el intestino del insecto, pasan por el tracto digestivo y salen con las heces, así se vuelven infectivos y pueden entrar a un nuevo huésped; para que esto suceda, las heces deben ser acarreadas hacia pequeñas heridas, abrasiones de la piel o conjuntivas. El tifus de los piojos y la enfermedad de Chagas son dos ejemplos de enfermedades transmitidas de esta forma.

En un ciclo más complejo, los microorganismos no se limitan sólo al intestino, sino que invaden otros tejidos del vector y lo dejan completamente parasitado, de forma que sólo puede infectar a un vertebrado cuando es ingerido por éste y así únicamente infectan a un huésped a la vez. En otras ocasiones, los parásitos viajan a través del cuerpo del

invertebrado hasta llegar a las glándulas salivales para salir durante el proceso de alimentación (picadura), de esta forma obtienen una entrada fácil al sistema sanguíneo de los huéspedes vertebrados y pueden infectar a más individuos. Este es el ciclo de transmisión fundamental de un gran número de enfermedades graves incluyendo la malaria, la enfermedad del sueño, la fiebre amarilla, el dengue, las filariasis entre otras (Busvine 1975).

- c) Mecanismos de defensa. La supervivencia del parásito en el insecto es crucial para que se complete su ciclo de vida y se vuelvan infectivos para pasar al vertebrado. Es por esto que se ha dado una coevolución que ha promovido el desarrollo de estrategias basadas en los mecanismos de defensa de ambos, que implican proteínas de superficie en células del vector y en los microorganismos que facilitan el desarrollo o la interrupción del ciclo de vida del parásito en el invertebrado (Busvine 1975, García *et al.* 2007)

1.2. Enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas, también conocida como Tripanosomiasis Americana, es una zoonosis endémica de América Latina y es considerada como una de las enfermedades más importantes de la región en términos de impacto económico y social. Históricamente la enfermedad se ha asociado a comunidades rurales pobres, sin embargo, recientemente ha surgido como una infección en las ciudades e incluso ha traspasado los bordes del continente (Buscaglia & Di Noria 2003, Gascon *et al.* 2010).

El agente etiológico de la enfermedad es el protozooario flagelado *Trypanosoma cruzi*, el cual es transmitido a más de 150 especies de mamíferos principalmente por insectos de la subfamilia *Triatominae* (Hemiptera; Reduviidae) (Buscaglia & Di Noria 2003, Noireau *et al.* 2009). En México los insectos transmisores se reportaron en 1928 y 12 años después se describió el primer caso humano (Guzmán Bracho 2001).

1.2.1. Parásito

Trypanosoma cruzi pertenece al *subphylum* Mastigophora del *phylum* Sarcomastigophora, clase Zoomastigophora, orden Kinetoplastida, familia *Trypanosomatidae*. Son organismos flagelados con una estructura característica llamada cinetoplasto, la cual está constituida por DNA extranuclear localizado en un punto específico de la mitocondria. *T. cruzi* (Figura 1.1) está incluido en la sección estercolaria, junto con otros grupos de tripanosomas que desarrollan un estadio infectivo en el tracto digestivo de invertebrados y son transmitidos a los mamíferos a través de las heces de los insectos. El subgénero *Schizotrypanum* se da a los tripanosomas que se multiplican en los vertebrados de manera intracelular (WHO 2002). El parásito está considerado como una sola especie que comprende una mezcla de poblaciones que circulan entre humanos, vectores, reservorios silvestres y animales domésticos (García *et al.* 2007, Noireau *et al.* 2009).

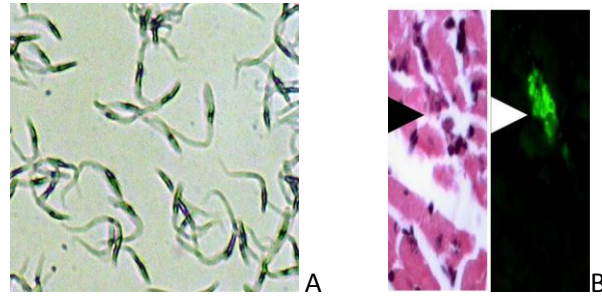


Figura 1.1. (A) Epimastigotes, forma replicativa en insectos, en cultivo. (B) Nido de amastigotes en tejido cardiaco, forma replicativa en vertebrados, teñido con hematoxilina-eosina (izq) y Fitz C (der). Fotografías tomadas por la M.C. María Luisa Martínez (A) y por la M.C. Andrea Vizcaíno (B). Laboratorio de estudios sobre tripanosomiasis IIB-UNAM.

1.2.2. Ciclo de vida

El ciclo de vida de *T. cruzi* comprende diferentes estadios de desarrollo en insectos y mamíferos (Figura 1.2): tripomastigote metacíclico, tripomastigotes sanguíneos, amastigote y epimastigote, que se identifican por la posición del cinetoplasto con respecto al núcleo (Santos Bush 1979, García *et al.* 2007). El ciclo comienza cuando el insecto vector se alimenta de sangre contaminada con tripomastigotes sanguíneos, los cuales pasan al intestino del insecto donde se transforman a epimastigotes los cuales se adhieren al intestino medio y posterior y comienzan a multiplicarse por fisión binaria. Cuando aumenta la población en el intestino algunos pasan al recto, que es la parte terminal del intestino, en donde se anclan y se transforman a tripomastigotes metacíclicos (metaciclogénesis) los cuales son eliminados con las heces y la orina, e infectan a los huéspedes vertebrados (Buscaglia & Di Noria 2003, García *et al.* 2007, Rassi Jr *et al.* 2010). Mientras el vector se alimenta de un mamífero va depositando heces con tripomastigotes metacíclicos, que penetran al organismo por heridas o abrasiones en la piel que pueden ser provocadas por la picadura del insecto o por el mismo huésped y a través de mucosas o conjuntivas. Una vez dentro del hospedero mamífero el parásito puede invadir cualquier tipo de célula nucleada, aunque tiene preferencia por células cardiacas, macrófagos, neuronas y células gliales (González Cappa & Durante de Isola 1994). En las células sufre una transformación a amastigote, forma esférica sin flagelo, que se multiplica intracelularmente por fisión binaria. Los parásitos lisan la célula y algunos se transforman a tripomastigotes, que son capaces de invadir nuevas células o pasan al torrente sanguíneo, en donde podrán ser tomados nuevamente por los insectos vectores.

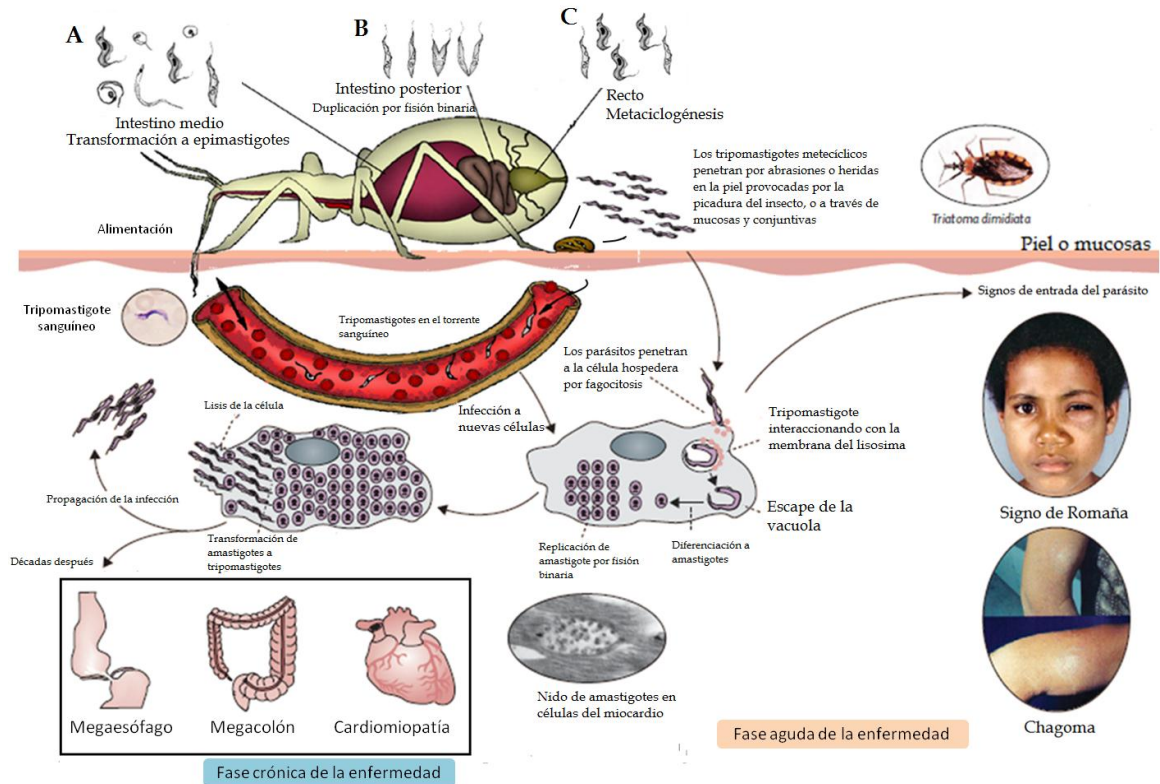


Figura 1.2. Ciclo de vida del parásito que requiere de un huésped vertebrado y un insecto vector, el ciclo comienza cuando un insecto no infectado se alimenta de un mamífero parasitado con *T. cruzi*, ingiere los tripomastigotes de la sangre que pasarán a su estómago (A) y se transformarán a epimastigotes (B) donde comenzarán a multiplicarse, por último llegarán al recto del insecto, donde ocurrirá la metacicloogénesis (C) que transformará a los epimastigotes a tripomastigotes metacíclicos que son la fase infectiva para los mamíferos, dentro de éstos el parásito podrá invadir cualquier célula nucleada y transformarse en amastigote, estadio replicativo, se comenzará a multiplicar hasta lisar la célula, algunos parásitos seguirán en forma de amastigotes e infectarán células contiguas y otros se transformarán a tripomastigotes sanguíneos y pasarán a circulación. Se muestran las principales patologías que el parásito puede causar en el humano y los signos por donde penetró el parásito en el humano. Modificado de Garcia *et al.* 2007 y Rassi Jr *et al.* 2010.

1.2.3. Formas de transmisión

La infección por *T. cruzi* puede ser transmitida por diferentes vías (Tabla 1.1). Es transmitida principalmente a los humanos y a más de 150 especies de mamíferos por los insectos hematófagos reduviideos de la subfamilia *Triatominae*. La infección depende fundamentalmente de la convergencia, en determinado tiempo y lugar, del agente etiológico, del insecto vector y del hospedero mamífero, todo dentro de un contexto geográfico favorable y de un conjunto de factores sociales y económicos. Lo que debe permitir la nidificación, alimentación y reproducción de los vectores y los reservorios y la convivencia de los mismos (Carcavallo *et al.* 1985).

Otra vía de transmisión que contempla a los insectos vectores de forma indirecta es la vía oral, la cual consiste en ingerir alimentos contaminados por heces de vectores. Se piensa que esta puede ser la vía más frecuente de infección, ya que los reservorios pueden infectarse al lamerse la piel contaminada con deyecciones de los vectores o en el caso de mamíferos insectívoros, al ingerir un triatomino infectado (Carcavallo *et al.* 1985). Recientemente, se han reportado varias brotes en algunas regiones de América del sur debida a esta forma de transmisión (Revisado en Gascon *et al.* 2010, Rassi Jr. *et al.* 2010).

Las vías de infección no entomológicas pueden presentarse en áreas de mejor calidad de vida y pueden ocurrir en países no endémicos, entre los que se incluye la transfusión de sangre, por donación de órganos infectados con el parásito y la transmisión vertical de madre a hijo (Carcavallo *et al.* 1985, Rassi Jr *et al.* 2010, Gascon *et al.* 2010).

Tabla 1.1. Epidemiología, manifestaciones clínicas, y diagnóstico de las diferentes formas de adquirir la Enfermedad de Chagas. Modificado de Rassi Jr *et al.* 2010

	Distribución geográfica	Población afectada	Tiempo de incubación	Presentación clínica	Diagnostico	Mortalidad
Vectorial	Países endémicos	Niños y adolescentes	1 a 2 semanas	Fiebre asintomática; malestar general, linfadenopatía hepatoesplenomegalia, edemas subcutáneos; señales de entrada del parásito (Chagoma y Signo de Romaña); miocarditis, meningoencefalitis	Detección del parásito por microscopia, hemocultivos, inmunodiagnóstico	Baja (<5-10%) en casos sintomáticos
Transfusional	Países endémicos y no endémicos	Adultos	8-120 días	Mismas que la forma vectorial sin los signos de entrada	Igual a la vectorial	Variable
Congenital	Países endémicos y no endémicos	Nonatos y niños menores de un año	Poco más de unas semanas	Asintomática; aborto, muerte neonatal, nacimiento prematuro, bajo peso al nacer; hipotonicidad, fiebre, hepatoesplenomegalia, problemas respiratorio, anemia; miocarditis, meningoencefalitis, megavíceras, oedema.	Microhematocrito con sangre periférica del cordón umbilical del neonato; dos o más más muestras en el primer mes de vida; inmunodiagnóstico en los primeros 6-9 meses de edad.	Desconocida
Oral	Región del Amazonas, epidemias regionales	Individuos de cualquier edad que pertenezcan a la misma comunidad o población	3-22 días	Misma que la transfusional más dolor de cabeza, mialgia, vómito, dolor abdominal, diarrea y hemorragia digestiva	Igual a la vectorial	Alta (8-35%)

1.2.4. Manifestaciones clínicas

La enfermedad de Chagas pasa por dos fases sucesivas, una fase aguda y una crónica (Figura 1.3). La fase aguda dura de 6 a 8 semanas. Una vez que ha pasado, la mayoría de las personas infectadas aparentan ser saludables y no hay evidencia de algún daño en el organismo que se pueda detectar. En este caso la infección puede ser diagnosticada únicamente por métodos serológicos o pruebas parasitológicas. Esta es la forma crónica asintomática de la enfermedad y es comúnmente llamada forma indeterminada, la cual persiste indefinidamente en la mayoría de las personas infectadas. Sin embargo, años después se puede pasar a la fase crónica sintomática (10-40% de los individuos infectados) y dependiendo del área geográfica, se pueden dar lesiones en diferentes órganos, principalmente en el corazón y el sistema digestivo. Estas condiciones se conocen como la forma digestiva o cardíaca crónica de la enfermedad de Chagas,

respectivamente. La fase crónica puede durar toda la vida en los individuos infectados y llevar a la muerte (WHO 2002, Rassi Jr *et al.* 2010).

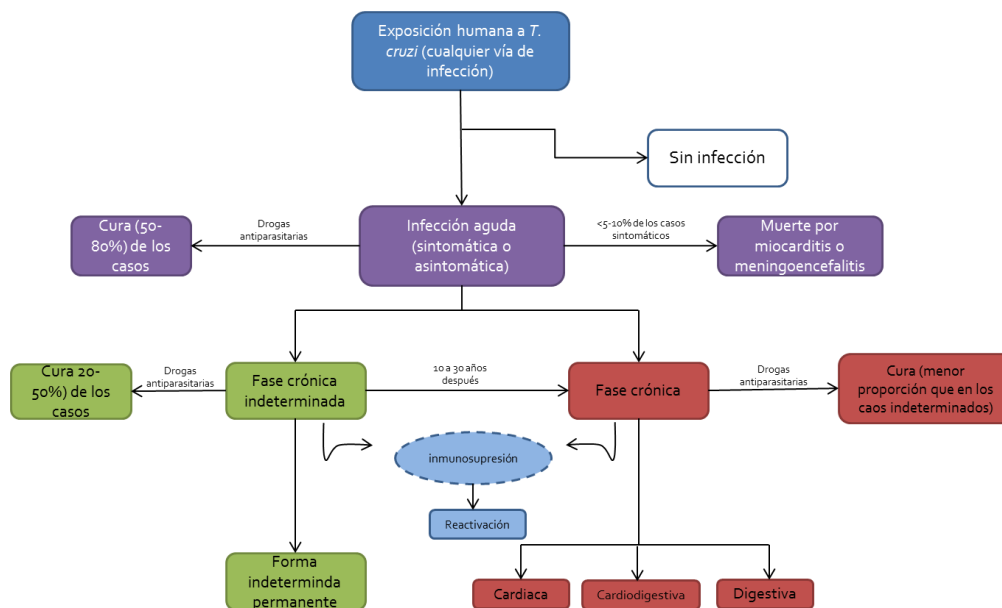


Figura 1.3. Patología de la enfermedad de Chagas. Rutas patológicas que puede llevar la enfermedad, al contraer el parásito por cualquier vía, infección aguda, crónica asintomática y crónica sintomática. Modificado de Rassi Jr *et al.* 2010

1.2.5. Epidemiología

La enfermedad de Chagas originalmente estaba asociada con áreas rurales de América Latina en donde ocurría la transmisión vectorial. Sin embargo en los últimos 20 años, los programas de control vectorial (como la Iniciativa del Cono Sur para la eliminación de la enfermedad y la iniciativa de Centro América) y el tamizaje sistemático en los bancos de sangre han contribuido a la reducción sustancial de nuevos casos de infección y disminuido el riesgo de contraer la enfermedad (Rassi Jr. *et al.* 2010). Sin embargo, la prevalencia e incidencia de la enfermedad, así como la mortalidad, están en constante cambio debido a la tasa de migración de personas de las áreas endémicas hacia las ciudades tanto en Latinoamérica y Norteamérica, como a Europa y Asia (Rassi Jr. *et al.* 2010, Schmunis & Yadon 2010).

De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (WHO, por sus siglas en inglés), en 1985 existían 100 millones de personas en América Latina de las cuales un 25% de la población se encontraba en riesgo de contraer la enfermedad; la prevalencia en los países endémicos era de 17.4 millones de casos (WHO 2002). Para 2005 la Organización Panamericana de la Salud (PAHO, por sus siglas en inglés) reportó 7.7 millones de casos confirmados, de los cuales se atribuían 41,200 nuevos casos anuales tan sólo por transmisión vectorial, con un total de 1.4% de prevalencia en América Latina. Para México la incidencia ha variado de 1.6 millones a 1.1 millones de personas infectadas con el parásito, de las cuales un tercio se localizaba en áreas rurales. (Guzmán Bracho 2001, PAHO 2006).

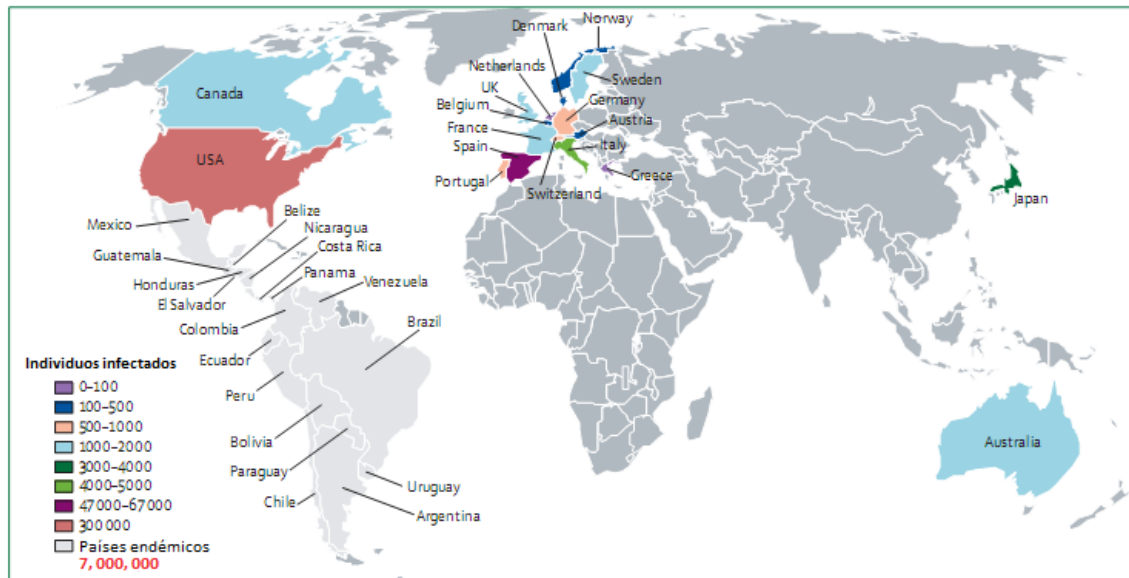


Figura 1.4. Distribución mundial de la Enfermedad de Chagas. Los países endémicos se marcan en gris y el resto de los países se colorean de acuerdo a los casos confirmados de la enfermedad que presentan. Modificado de Rassi Jr. *et al.* 2010.

Esta enfermedad ha cobrado importancia a nivel mundial debido a los altos índices de migración de los países Latinoamericanos (Figura 1.4); en Estados Unidos, Canadá, Europa y Asia se ha convertido en un importante problema de salud, en donde se ha observado un aumento de personas infectadas. El destino más común de los latinoamericanos es E.U.A. en donde se han identificado 300 167 individuos infectados con *T. cruzi*, mientras que en España, el segundo país con mayor número de inmigrantes, se han registrado de 47,000 a 67,000 casos (Noireau *et al.* 2009, Rassi Jr. *et al.* 2010, Gascon *et al.* 2010).

1.3. Insectos Triatominos

Los vectores de *T. cruzi* son insectos que pertenecen al orden Hemiptera, familia Reduviidae, subfamilia *Triatominae*. Son una amplia familia de insectos hematófagos que contiene más de 130 especies repartidas en cinco tribus y 17 géneros diferentes, de las cuales, la mayoría son vectores potenciales de la enfermedad de Chagas y más de la mitad de las especies han sido encontradas con infección natural por *T. cruzi* (WHO 2002, Dujardin *et al.* 2002, García *et al.* 2007).

1.3.1. Taxonomía

La clasificación tradicional de los Hemípteros se divide en dos subórdenes (Homoptera y Heteroptera). Los Reduviidae constituyen una de las familias de Heteroptera con gran diversidad y una extensa distribución (Dujardin *et al.* 2002). La siguiente clasificación de la familia se propuso en 1984:

Reino: Animalia

Phyllum: Arthropoda

Clase: Insecta

Subclase: Pterygota

Orden: Hemiptera

Suborden: Heteroptera

Familia: Reduviidae

Subfamilia *Triatomianae*

Tribu Alberproseniini

Tribu Bolboderini

Tribu Cavernicolini

Tribu Linshcosteini

Tribu Rhodniini

Tribu Triatomini

La adaptación a la hematofagia, que es la principal característica biológica de los triatominos, incluye a todos los estadios ninfales y adultos, tanto hembras como machos y está asociada a la costumbre de frecuentar los nidos de aves y madrigueras de pequeños mamíferos (Dujardin *et al.* 2002, Noireau *et al.* 2009)

Aunque se han infectado experimentalmente una variedad de artrópodos con *T. cruzi* sólo los triatominos son epidemiológicamente importantes en la transmisión de la enfermedad de Chagas (Lent & Wygodzinsky 1979).

1.3.2. Distribución

El área de distribución de los triatominos está entre los paralelos 45°S y 40°N y a altitudes de 200 a 1500 msnm. Localizados principalmente en áreas tropicales, sin embargo, algunas especies se pueden encontrar en regiones templadas o frías (ej. *Triatoma patagónica* y *T. infestans*), como la Patagonia o el norte de E.U.A (WHO 2002). La mayoría de las especies se localizan en América, a excepción del género *Linshcosteus* que se encuentra en la India y *T. rubrofasciata* que se distribuye en las islas del Caribe (Noireau *et al.* 2009).

En Sudamérica y Centro América las especies de mayor importancia en la transmisión de *T. cruzi* al humano son *T. infestans*, *Rhodnius prolixus* y *T. dimidiata* (Figura 1.5). Por su parte, en México se conocen 32 especies de vectores, de los cuales, más de la mitad se han encontrado infectados con el parásito (Vidal Acosta 2000, Martínez *et al.* 2006, Rassi Jr. *et al.* 2010).

Entre las especies endémicas reportadas en México, se encuentran: *T. phyllosoma*, *T. picturata*, *T. pallidipennis*, *T. mazzottii*, *T. mexicana* y *T. bassolsae*, las cuales forman el complejo *Phyllosoma* (Martínez *et al.* 2006). Estas especies se distribuyen principalmente hacia el centro del país y tienen una alta importancia epidemiológica debido a sus porcentajes de infección con *T. cruzi* y sus índices de colonización (Vidal Acosta 2000, Guzmán Bracho 2001, Dujardin *et al.* 2002, Martínez *et al.* 2006). Además, recientemente se ha reportado la capacidad de entrecruzamiento entre varias especies del complejo (Martínez *et al.* 2006, 2010).

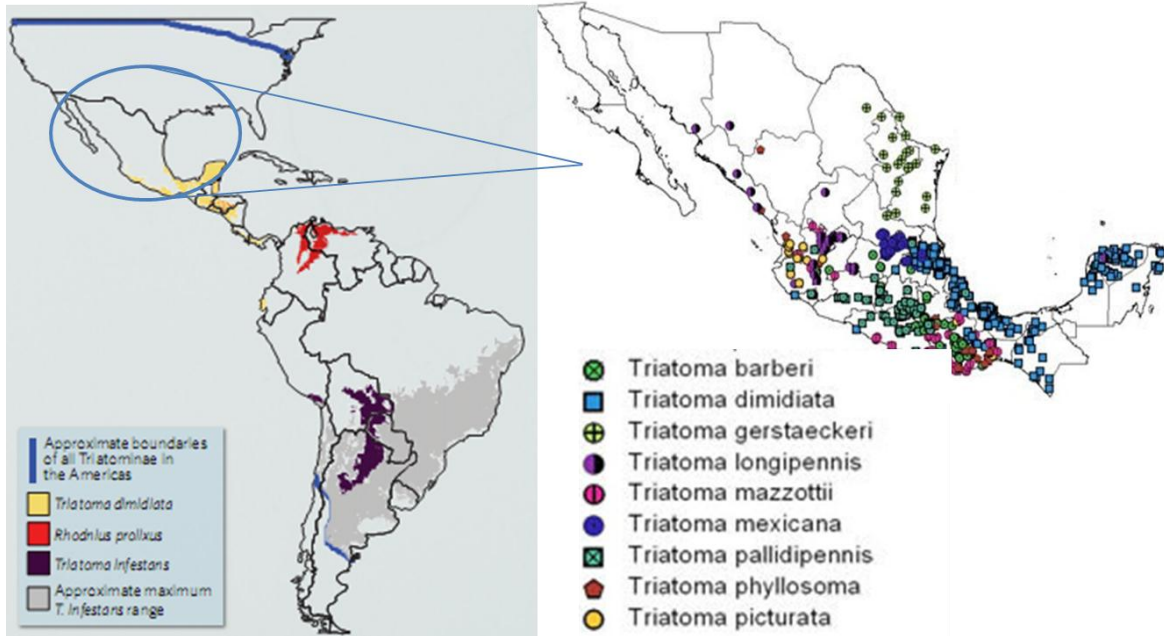


Figura 1.5. Distribución de los principales vectores de *T. cruzi* en el continente. En el mapa se ejemplifica que en México existen 9 especies de importancia médica, mientras que en el resto de Latinoamérica hay únicamente 3 especies de importancia médica. Modificado de Chagmex y Grayson 2010.

1.3.3. Ciclo de vida

Los triatominos presentan un desarrollo hemimetábolo que comprende el huevo, cinco estadios larvarios (conocidos como ninfas) y el imago, los estadios larvarios son muy similares a los adultos y no presentan una metamorfosis completa (Figura 1.6). El desarrollo completo del insecto puede durar de cinco meses hasta un año, dependiendo de la especie (Dujardin *et al.* 2002, Noireau *et al.* 2009). Las larvas recién eclosionadas son de un color rosado que va oscureciéndose con el endurecimiento progresivo de la quitina. Unos días más tarde, son capaces de tomar su primer alimento de sangre, sin embargo, si no hay una fuente de alimento cerca pueden recurrir a la cleptohematofagia, que consiste en alimentarse de un triatomino que se acaba de alimentar de sangre, o estercofagia, alimentándose de las heces de otros triatominos con lo que podrían adquirir *T. cruzi* sin necesidad de alimentarse de un mamífero. Esto último aunado a que son insectos hematófagos estrictos en todos sus estadios ninfales y en ambos sexos aumenta la probabilidad de infección natural con *T. cruzi* (WHO 2002, Dujardin *et al.* 2002, Noireau *et al.* 2009).

1.3.4. Morfología

Las características morfológicas generales de los hemípteros son: un par de alas semi-membranosas que recubren completamente otro par de alas completamente membranosas, piezas bucales constituyendo una pieza robusta, ojos compuestos, antenas divididas en cuatro artejos y lateralmente insertadas, articulaciones membranosas entre el segundo y tercer artejo del rostro, ausencia de glándulas de esencia en el lado dorsal del abdomen (Figura 1.7). El tamaño va

desde unos milímetros en ninfas de 1° estadio hasta 3 cm en adultos en algunas especies y puede verse afectado por el ambiente en el que se desarrollan (Dujardin *et al.* 2002, Noireau *et al.* 2009).



Figura 1.6. Estadios morfológicos durante el ciclo de vida de *T. pallidipennis*, desde huevo hasta adulto. Tomado de Tay Zavala *et al.* 2008.

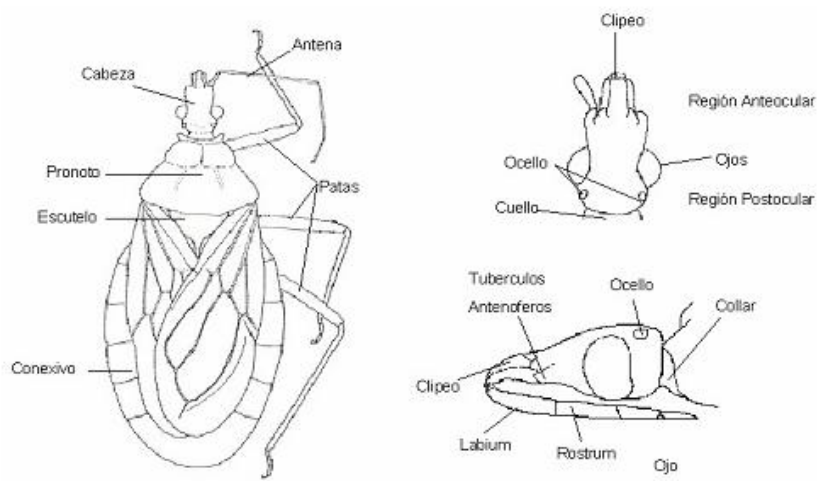


Figura 1.7. Morfología externa de la porción de la cabeza y la parte dorsal (donde se encuentran las alas) de los vectores de la Enfermedad de Chagas. Tomado de Lent & Wygodzinsky, 1979.

Los adultos son más grandes que los estadios ninfales y presentan estructuras como los ocelos, genitales externos y en la mayoría de las especies, las alas membranosas bien desarrolladas. Las hembras se reconocen porque generalmente son más grandes que los machos y el ápice abdominal termina en V, mientras que el de los machos está redondeado. Los colores que generalmente presenta este grupo de insectos son el negro y el pardo como color predominante, además del amarillo, naranja y rojo (Lent & Wygodzinsky 1979, Dujardin *et al.* 2002).

1.3.5. Fisiología

1.3.5.1. Alimentación, Digestión, Nutrición y Excreción

Los triatominos son un grupo estrictamente hematófago lo que se asocia con la evolución de adaptaciones morfológicas y fisiológicas que facilitan la localización del huésped y la rápida alimentación nocturna, entre otras cosas. Estos insectos han evolucionado para convertirse en eficientes receptores de calor, lo que les permite localizar a la presa en la oscuridad; su aparato bucal está adaptado para la penetración de la piel de los vertebrados, la ubicación de vasos sanguíneos apropiados y factores anticoagulantes en la saliva, que permiten una alimentación eficiente (Carcavallo et al 1985). Durante la alimentación, la endocutícula abdominal se plastifica lo que desencadena la distensión abdominal y produce el reflejo de defecación, esto permite que los insectos sean capaces de ingerir una cantidad de sangre equivalente a varias veces su propio peso. Después de la alimentación los triatominos pueden vivir durante meses sin ingerir agua y conservan una producción de orina muy concentrada. Por otra parte en el recto, que es donde se lleva a cabo la metaciclologénesis de *T. cruzi*, se reabsorben materiales necesarios y se acidifica el contenido con precipitados de ácido úrico y otros aniones orgánicos (Carcavallo 1985, Nation 2008).

En los insectos hematófagos la sangre es almacenada en la parte anterior del intestino medio sin que la digestión suceda. Eventualmente pasan a la parte posterior en pequeñas cantidades en donde se secretan las enzimas digestivas y se da la absorción de nutrientes. Es por esto que solo una pequeña proporción del alimento es digerida por vez y las enzimas nunca se mezclan en su totalidad con el alimento ingerido debido a esto los triatominos pueden sobrevivir largos periodos de inanición (Rockstein 1973, Carcavallo 1985, Nation 2008). Los insectos hematófagos que efectúan comidas sanguíneas muy abundantes tienen una cantidad mínima de material indigerible para eliminar a partir del intestino medio, pero debe excretar rápidamente gran parte del agua de su alimentación. Para esto el principal órgano de excreción son los túbulos de Malpighi que extraen los materiales de la hemolinfa y los descargan dentro del intestino donde se mezclan frecuentemente con los materiales no digeridos. Esta excreción es rápida como resultado de la estimulación de los túbulos por una potente hormona diurética liberada en la hemolinfa inmediatamente después de la alimentación (Rockstein 1973, Carcavallo 1985).

La alimentación de sangre puede resultar tóxica debido al grupo hemo (una molécula tóxica que puede provocar radicales de oxígeno reactivos que permiten la oxidación de los lípidos). La degradación de la hemoglobina en el intestino de los hematófagos libera grandes cantidades de este compuesto, lo que puede alterar la permeabilidad de la membrana. Para esto los insectos han desarrollado varios mecanismos para contener sus propiedades tóxicas, que incluyen la formación de agregados de esta molécula, propiedades antioxidantes en la hemolinfa, proteínas de unión al grupo hemo y su conversión metabólica a conjugados más hidrofílicos que facilitan su excreción. Además de este inconveniente, los insectos que se alimentan de sangre se enfrentan al problema de que ésta es rica en proteínas y agua, pero carece de nutrientes esenciales como los

carbohidratos y vitaminas. Es por esto que los insectos se han asociado a microorganismos que se desarrollan en su intestino y que se pasan de generación en generación. Esta relación es mutuamente benéfica, ya que los simbioses proveen nutrientes tales como vitaminas y aminoácidos y los insectos les proporcionan un ambiente propicio para establecerse. Los tiratominos están asociados a una serie de microorganismos, principalmente bacterias, que les proporcionan vitaminas, en especial complejo B, que es indispensable para su desarrollo y sobrevivencia (Rockstein 1973, Caracavallo 1985, Nation 2008).

1.3.5.2. Sistema circulatorio

El fluido circulatorio de los insectos es llamado hemolinfa. La hemolinfa es un fluido acuoso que contiene iones, moléculas y células. Sin embargo, la hemolinfa de los insectos rara vez contiene pigmentos respiratorios, por lo que no transporta oxígeno pero transporta una cantidad significativa de dióxido de carbono. Todos los intercambios químicos entre los tejidos están mediados vía hemolinfa: la transportación de hormonas, distribución de nutrientes que vienen del intestino y transporte de los desechos que son removidos a los órganos excretores (Figura 1.8). Los cambios locales en la presión de la hemolinfa son importantes en la termorregulación, en el proceso de muda y en la expansión de nueva cutícula (Gullan 2005, Nation 2008).

La hemolinfa sirve también como reserva de agua, está constituida principalmente de plasma, que es una solución acuosa de iones inorgánicos, lípidos, azúcares, aminoácidos, proteínas, ácidos orgánicos y otros compuestos. Se caracteriza por una alta concentración de aminoácidos y fosfatos orgánicos y contiene de trealosa, el azúcar más utilizado en los insectos para producir energía (Rockstein 1973, Gullan 1005, Nation 2008).

Las proteínas de la hemolinfa se pueden detectar por medio de electroforesis y éstas pueden cambiar con el estado fisiológico, edad, sexo y otros factores. Las proteínas que pueden estar presentes en la hemolinfa son enzimas, proteínas con acción antibacterial (las lisozimas y fenoloxidasas que actúan como agentes protectores que pueden modificar químicamente potenciales toxinas, bacterias, parásitos, larvas y otros cuerpos extraños), proteínas de transporte (que acarrean sustancias hidrofóbicas, lipoforinas), proteínas de almacenamiento (hexamerinas), y otras proteínas con funciones específicas como las ferritinas (que forman complejos con hierro) e

incluso hormonas juveniles (Rockstein 1973, Kanost *et al.* 1990, Nation 2008).

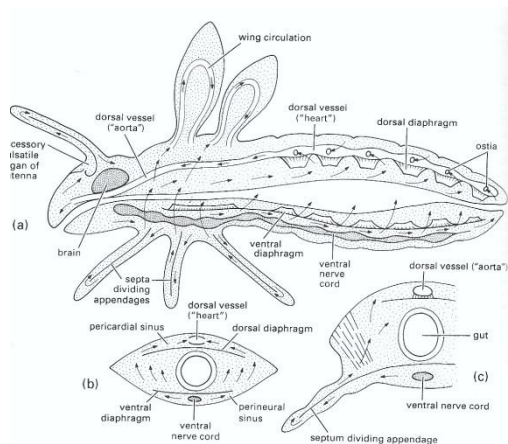


Figura 1.8. Esquema del sistema circulatorio de los insectos, en el cual el fluido principal es la hemolinfa, que recorre todo el cuerpo intercambiando iones y moléculas. (a) diagrama de todo el cuerpo, (b) corte transversal del abdomen y (c) parte del tórax con un apéndice (Gullan, 2005).

Por otro lado la hemolinfa también contiene células llamadas hemocitos, que pueden ser de diferentes tipos (principalmente plasmotocitos, granulocitos y prohemocitos), todos ellos nucleados. Sus funciones básicas son:

- Fagocitosis: ingestión de partículas pequeñas y sustancias como los metabolitos
- Encapsulación de parásitos y otro tipo de materiales ajenos al cuerpo
- Coagulación de la hemolinfa
- Almacenaje y distribución de nutrientes

La hemolinfa provee de diferentes tipos de protección y defensa en contra de heridas físicas, la entrada de organismos infecciosos, parásitos, u otras sustancias ajenas al insecto y en ocasiones acciones en contra de los depredadores (Gullan 2005).

Heridas en los integumentos provocan un proceso de curación que implica hemocitos de coagulación y plasma. Un coágulo en la hemolinfa se forma para sellar la herida y reducir la pérdida de hemolinfa y la entrada de bacterias. Si entran organismos o partículas patógenas al cuerpo del insecto, se produce una respuesta inmune, la cual incluye mecanismos de fagocitosis, encapsulación, y formación de nódulos mediados por hemocitos, así como una respuesta humoral con enzimas y otras proteínas (lysozimas, prohenoloxidasas, lectinas y péptidos). Además algunos neuropéptidos pueden participar en la respuesta inmune celular por intercambio de señales entre el sistema endócrino y el sistema inmune (Gullan, 2005).

1.3.6. Capacidad vectorial

Todos los trabajos sobre adaptación mutua entre el parásito y el insecto concluyen que la mejor adaptación ocurre entre la cepa local del parásito y el vector local correspondiente. También se ha visto que la viabilidad del parásito en el tracto digestivo del vector depende del número de parásitos ingeridos, el estado nutricional del triatomino, la cepa del parásito, componentes tripanolíticos, enzimas digestivas, lectinas, bacterias residentes en el intestino y el sistema endocrino del insecto (García & Azambuja 1991, Dujardin *et al.* 2002, Noireau *et al.* 2009)

La hematofagia es un carácter indispensable al rol vectorial, porque permite al insecto infectarse y le obliga a un contacto frecuente y prolongado con su fuente de alimento. Aunado a esto, el reflejo de defecación es crucial para la transmisión de *T. cruzi* que se transmite por las deyecciones. El tiempo que tarda en defecar un triatomino durante o después de la alimentación influye en su capacidad de transmitir el parásito (Dujardin *et al.* 2002).

Un aspecto fundamental para determinar la importancia médica de un insecto en la transmisión de la enfermedad es la domesticidad, que se entiende como el grado de adaptación al hombre o a su ambiente doméstico. Menos del 5% de las especies de *Triatominae* presentan una adaptación al hábitat humano más o menos avanzada, lo que indica que no es un proceso fácil y que la adaptación completa no es un evento frecuente (WHO 2002, Dujardin *et al.* 2002, Noireau *et al.* 2009). En México las especies mejor adaptadas al ambiente doméstico y que por lo tanto son

consideradas como los principales vectores son *T. barberi*, *T. dimidiata* y *T. pallidipennis*, las cuales también cuentan con una amplia distribución en diferentes zonas geográficas del país (Vidal Acosta 2000, Dujardin *et al.* 2002, Magallón Gastélum *et al.* 2006, Martínez *et al.* 2006).

II. Antecedentes

2.1. *Triatoma pallidipennis*

El insecto que elegimos como modelo de estudio fue *T. pallidipennis* debido a que es uno de los principales vectores en la región centro y oeste del país. Especie descrita por Stal en 1872 en el género *Meccus*, en 1927 se transfiere al género *Triatoma*. Usinger en 1944, la considera como subespecie de *T. phyllosoma* integrando un complejo. En 1979 Lent y Wygodzinsky establecen la especie *Triatoma pallidipennis* (Carcavallo *et al.* 1985) y en 2006 el grupo de Espinoza y Cols. proponen que ésta sea una subespecie del complejo *Phyllosoma*, dadas sus similitudes genéticas y la posibilidad de cruzamientos entre las especies de este complejo (Martínez *et al.* 2006, 2010). La especie se ubica en México, en los estados de Colima, Guerrero, Jalisco, Michoacán, Estado de México, Morelos, Nayarit, Puebla, Querétaro, Veracruz y Zacatecas (Zárate & Zárate 1985, Martínez *et al.* 2006), predomina en zonas secas y semidesérticas, a veces modificadas por actividades agropecuarias. Regiones de veranos calientes y lluvias estacionales coinciden en casi toda su área de distribución con una altitud entre 300 y 2,500 msnm (Carcavallo 1985). Es una especie que en el aspecto silvestre convive especialmente con roedores y armadillos. Frecuentemente coloniza viviendas y peridomicilios (Carcavallo 1985). Ha sido encontrada infectada por *T. cruzi* hasta en un 98% en el estado de Morelos, en donde es el principal transmisor del parásito (Carcavallo *et al.* 1985, Zárate & Zárate 1985, Vidal Acosta 2000, Enger *et al.* 2004). Se pueden alimentar de diferentes animales, entre aves y mamíferos, incluido el humano, de los que son capaces de ingerir hasta seis veces su peso. En el estadio ninfal IV se ha observado que pueden comer entre 236 y 1,602mg de sangre. Si bien, esta especie es considerada dentro de los vectores principales en el país, debido a sus altos índices de infección con *T. cruzi*, son organismos cuyo tiempo de defecación es lento durante su ingesta de sangre, en relación con otras especies de la zona (Carcavallo 1985, Vidal Acosta 2000, Dujardin *et al.* 2002, Tay Zavala *et al.* 2008). El ciclo huevo-adulto puede tomar de 260 a 308 días. Los adultos pueden vivir varios meses y las hembras son capaces de poner hasta 600 huevos a lo largo de su vida (Carcavallo 1985, Tay Zavala *et al.* 2008). El macho mide entre 2.8 y 3.5cm de longitud, mientras que la hembra entre 3.4 y 3.6cm. Son de color negro con manchas anaranjadas o amarillas que se sitúan de manera alterna en el conectivo y casi la mitad del corio blanco, la cabeza es tres veces más larga que ancha y los ojos son prominentes (Tay Zavala *et al.* 2008). Es una especie de gran actividad motora. En el caso de los adultos, se ha observado que el ciclo lunar influye su atracción, aumentando en luna nueva y se interrumpe en luna llena y cuarto creciente (Carcavallo *et al.* 1985)

2.2. Interacciones Vector-Parásito

Dentro de los insectos vectores, los parásitos tienen sitios específicos para su desarrollo. Los cinetoplastidos, *Leishmania* sp. y *T. cruzi*, se limitan al tracto digestivo, mientras que los tripanosomas africanos se localizan en el tracto digestivo y pasan a las glándulas salivales de las

moscas que los transmiten. Otros tripanosomas como *T. rangeli*, se pueden encontrar en el intestino, hemolinfa y pasar a las glándulas salivales. Durante su desarrollo dentro de los insectos, los parásitos sufren grandes cambios morfológicos e incluso pueden cambiar sus proteínas de superficie para interactuar con tejidos específicos esenciales para su sobrevivencia, desarrollo e infectividad para los huéspedes vertebrados (Boulanger *et al.* 2006, Busvine 1975).

Recientemente se han realizado estudios sobre la fisiología, desarrollo e interacciones ecológicas entre los insectos y los parásitos que transmiten (Hu & Aksoy 2006, Yassine & Osta 2010), esto se debe a que queda la incógnita sobre si los parásitos producen alteraciones en sus vectores y qué tanto les pueden afectar, y qué tan viable es que el parásito sea patógeno para el insecto que lo transmite (Elliot *et al.* 2003).

Estudios realizados en la relación *T. cruzi-Triatomianae* no han demostrado algún efecto negativo directo del parásito sobre el vector, porque se considera que el parásito es inocuo para el insecto (Schaub 1989). Sin embargo, en los últimos años se comprobó que el parásito puede afectar de forma indirecta el comportamiento de los vectores y su fisiología (Botto Mahan *et al.* 2006, 2008). Por ejemplo, los insectos infectados con *T. cruzi* presentan una disminución en el peso corporal y en las gónadas, aumento en el tiempo que tardan en pasar al siguiente estadio y los hábitos de alimentación-defecación se ven alterados, siendo los insectos infectados los que aumentaron la frecuencia de la ingesta de sangre y disminuyeron su tiempo de defecación. Estos efectos pueden indicar que la presencia del parásito es un factor estresante para el insecto y que hay una competencia por nutrientes, lo que obligaría al insecto a buscar más veces alimento, y esto a su vez favorecería la transmisión del parásito a los huéspedes mamíferos (Schaub 1989, Botto Mahan *et al.* 2006, 2008).

La mayoría de esos trabajos se centran en parámetros morfológicos de los insectos, solamente hay un estudio realizado en el que se utiliza la hemolinfa para comparar las alteraciones que pudieran sufrir los insectos en presencia del parásito, midiendo la concentración de aminoácidos libres, en los que se observaron cambios después de ocho días de infectados (Schaub 1989).

2.3. Péptidos antimicrobianos contra parásitos flagelados

Un componente importante en la respuesta del sistema inmune de los insectos es la producción de un arsenal de péptidos antimicrobianos (AMP), muchos de los cuales se producen en el cuerpo graso o los hemocitos y son liberados hacia la hemolinfa. Esta respuesta inmune está basada en el reconocimiento de agentes extraños en el insecto, tienen una baja especificidad y actúa contra una gran cantidad de microorganismos, no generan memoria inmunológica pero pueden ser sintetizados a tasas metabólicas relativamente bajas, lo que permite al vector almacenar grandes cantidades de los mismos (Paskewitz & Christensen 1996, López *et al.* 2003).

Se considera que la respuesta inmune en los insectos infectados con protozoarios flagelados está mediada por lectinas, ya que los principales agentes causales de enfermedades que se encuentran dentro de este grupo, no traspasan la barrera del intestino y por lo tanto no entran en contacto con la hemolinfa. Por esta razón la inducción y síntesis de los AMP no puede ser atribuida

a la migración de los parásitos al sistema circulatorio ni asociada a los daños provocados en estos tejidos (Boulanger *et al.* 2006).

Para el caso de los parásitos de la familia *Kinetoplastidae* que se transmiten por la picadura de sus vectores, como *Leishmania* sp. y *T. brucei* sp., se han identificado varios de estos AMP, siendo en la relación *Glossina-T. brucei* en donde se han identificado más (defensinas, cecropinas, attaccinas y dipterocinas), que se inducen una semana después de la entrada del parásito (Boulanger *et al.* 2006). En el caso de *Triatominae-T. cruzi*, se ha identificado un solo AMP (defensina) en la hemolinfa que actúa durante infecciones bacterianas, y una cecropina en el intestino, inducida por bacterias, y que puede eliminar parásitos como *T. cruzi* (Beard *et. al.* 2001, López *et al.* 2003).

Después de la infección con bacterias o parásitos que infectan el tracto digestivo, los AMP son detectados en este órgano, y sistemáticamente en la hemolinfa, a la cual no entran los flagelados. En el caso de las infecciones bacterianas, el pico máximo de expresión se alcanza a las 24 horas post-infección. La cinética en los patrones de inducción de los AMP, seguida a la ingestión de los cinetoplastidos varía de acuerdo al estadio de desarrollo, lo que sugiere que las proteínas de superficie que expresan estos parásitos y que cambian de un estadio a otro puedan estar implicadas en esta variación (Boulanger *et al.* 2006).

III. Justificación

El sistema circulatorio en los insectos, la hemolinfa, cumple diversas funciones. Es por eso que estudiar las proteínas que lo componen en vectores de importancia médica es importante para conocer más acerca de su interacción con los parásitos que transmiten.

Además, es importante conocer aspectos de la biología de los insectos mexicanos, ya que la mayor parte de los estudios fisiológicos y de interacción parásito-vector sobre triatominos se refieren principalmente a tres especies: *R. prolixus*, *T. infestans* y *Panstrongylus megistus*, las cuales se distribuyen en el cono Sur del continente. Cabría esperar que si en las cepas del parásito hay diferencias observables, es muy probable que las haya también en los insectos vectores y sus relaciones.

IV. Hipótesis

Aun cuando se sabe que *T. cruzi* no traspasa la barrera del intestino, es posible que la presencia del parásito modifique la homeostasis del insecto, lo que se podría reflejar en la composición proteica del sistema circulatorio.

V. Objetivos

5.1. Objetivo general

Identificar proteínas presentes en la hemolinfa de una especie mexicana de insectos transmisores de *Trypanosoma cruzi*, y determinar si se modifica durante la infección con el parásito.

5.2. Objetivos particulares

- Caracterizar el patrón proteico de la hemolinfa de ninfas de 5º estadio de *Triatoma pallidipennis* en presencia y ausencia de *T. cruzi*.
- Determinar si existen cambios en las glicoproteínas de la hemolinfa de *T. pallidipennis* durante una infección con *T. cruzi*.
- Caracterizar a las proteínas de la hemolinfa de *T. pallidipennis* que se modifiquen en presencia de *T. cruzi*.

VI. Material y Métodos

6.1. Insectos utilizados

Los triatominos utilizados para este estudio fueron proporcionadas por el Dr. Ricardo Alejandro del laboratorio de entomología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional.

Los insectos se mantuvieron a una temperatura de 25 a 28°C; para los grupos experimentales la alimentación consistió, una sola vez, en sangre de ratones infectados con *T. cruzi* cepa Ninoa (aislada a partir de un caso agudo en el estado de Oaxaca, Monteón *et al.* 1996) en el punto máximo de infección con 2.5×10^6 parásitos por ml. Posteriormente los insectos infectados y no infectados se sustentaron con conejos.

La presencia de parásitos se comprobó al revisar las heces de las ninfas experimentales cada vez que se extraía hemolinfa, éstas se diluían en PBS y se observaba al microscopio óptico.

6.2. Colecta de Hemolinfa

La hemolinfa se colectó de ninfas de 5º estadio de *T. pallidipennis*, debido a que es este estadio del ciclo de vida contiene mayor cantidad de hemolinfa que el resto (Nation 2008). Las muestras utilizadas para la producción de anticuerpos policlonales se obtuvieron de insectos infectados con *T. cruzi*. La colecta se realizó através de una punción en la membrana que se encuentra entre la coxa y el trocanter, en la unión de la tercera extremidad con el tórax, el líquido fluía más al ejercer presión en el abdomen, el cual se recogió en capilares no heparinizados, se cuantificó con una micropipeta y se mezcló con amortiguador de lisis (urea 7M, tiourea 2M, CHAPS 4%, trizma base 0.0008g/ml) con inhibidores de proteasas (EDTA 12mM, PMSF 1mM, pepstatin 0.001mM y leupeptin 0.1mM) en una relación de 1:3 (hemolinfa/amortiguador de lisis) para extraer las proteínas de la muestra. La muestra se mantuvo a -20°C hasta su uso.

Para la obtención de una cinética de expresión de proteínas, la hemolinfa se obtuvo de dos grupos experimentales de 5 individuos hembra y un grupo control del mismo número de individuos, mantenido bajo las mismas condiciones. Las colectas se realizaron a los días 0, 3, 10, 17, 31 y 41 posteriores a la primera alimentación, con el ratón. En este experimento la muestra se mezcló con un amortiguador anticoagulante (0.098mM NaOH, 0.146M NaCl, 0.017M EDTA, 0.041M ácido cítrico pH 4.5) (Mead *et al.* 1986) en una relación 1:1, se centrifugó a 9000g durante 5 minutos y se separó el plasma del paquete celular. El sobrenadante se colocó en un nuevo vial y se mantuvo en congelación hasta su uso.

6.3. Cuantificación de proteínas

Se realizó utilizando el kit comercial “2D-Quant Kit” (Amersham Biosciences) el cual permite la determinación de proteínas en presencia de tiourea. Se prepara una curva estándar con concentraciones conocidas de albúmina de suero bovino (BSA) y volúmenes establecidos de la muestra. Las proteínas se precipitan, sedimentan y reaccionan con el reactivo de trabajo, lo cual resulta en una señal colorida que se lee a una absorbancia de 480nm. Los valores de la curva estándar se utilizaron para trazar una gráfica en la que los valores de densidad óptica de las muestras se interpolan para obtener la concentración de cada una.

Al utilizar un amortiguador libre de tiourea (anticoagulante) la cuantificación de proteínas se realizó mediante una modificación del método de Lowry, utilizando el sistema de DC Protein Assay de BioRad, el cual emplea una curva estándar de BSA y da una señal colorida que se lee a una absorbancia de 655nm.

6.4. Electroforesis

La separación de las proteínas de la hemolinfa se realizó por medio de electroforesis en geles de Duodecil Sulfato de Sodio (SDS-PAGE por sus siglas en inglés) de 0.75mm de grosor (30%acrilamida/0.8%bisacrilamida) al 12%, con un gel concentrador del 4%, de acuerdo al método de Laemmli 1970. Se utilizaron 20µg de proteína de cada muestra en el primer experimento y en el caso de la cinética sólo 6µg, posteriormente se calentaron por 5 minutos a 100°C en amortiguador de carga (trizma base 200mM, β-mercaptoetanol 20%, SDS 8%, azul de bromofenol 0.4%, glicerol 40%). El corrimiento se realizó en presencia del amortiguador de electroforesis (trizma base 0.12M, glicina 1M, SDS 0.01M) a 150V. Al finalizar los geles se tiñeron con azul Coomassie.

6.5. Análisis de proteínas

La captura de imágenes se realizó en el Gel Logic 200 Imaging System de Kodak y se analizaron con el programa Molecular Imaging Kodak. Se determinó el peso molecular de las bandas de proteínas construyendo gráficas con los datos de los marcadores (PM) y la movilidad relativa (Rf), y se extrapolaron las Rf de las proteínas de las muestras.

6.6. Producción de anticuerpos policlonales

Para la producción de los anticuerpos se eligieron 5 proteínas presentes en la hemolinfa, que fueran abundantes y estuvieran presentes en todas las muestras analizadas. Las cuales fueron de los siguientes PM: 200, 110, 73, 64 y 45kDa. Cada una fue inoculada en un conejo hembra (cepa Nueva Zelanda) para la obtención de anticuerpos.

La muestra inocular se efectuó de la siguiente manera: se realizó una electroforesis SDS-PAGE en un gel preparativo al 12% en el que se colocaron 2mg de proteínas en un volumen aproximado de 200µl. El gel se preparó para transferir su contenido a membranas de nitrocelulosa (Schleicher & Schuell de poro 20µm) con un sistema de transferencia húmeda (BioRad). La transferencia se realizó a 100V por 1 hora 15 minutos en presencia de un amortiguador de

transferencia (trizma base 0.025M, glicina 0.2M, metanol 20%). La membrana se tiñó con un colorante no permanente, Rojo Ponceau (Sigma P7170), para comprobar que el proceso se haya efectuado correctamente y se destinó en presencia de PBS. Con esta tinción se localizan las proteínas de los pesos mencionados y la banda completa se corta de la membrana y se termina de desteñir. Una vez que la membrana destiñó totalmente se corta en pedazos muy pequeños y se añadió 1ml de DMSO por cada 1cm² de tira en donde se dejó por una hora a temperatura ambiente. Al termino de este tiempo se le agregó 1ml de amortiguador de carbonatos (carbonato de sodio 0.27M, bicarbonato de sodio 0.69M) muy despacio y en continua agitación, esta mezcla se centrifugó a 10 000g durante un minuto, se descargó el sobrenadante y se añadió 1ml de PBS al botón que quedó y se resuspendió totalmente, el procedimiento se repitió cuatro veces más, hasta que al final la proteína quedó completamente suspendida en PBS. Esto se suspendió en adyuvante completo de Freund en una proporción 1:1 (Gibco) para la primera inoculación subcutánea en el conejo. Dos inoculaciones más fueron aplicadas cada 15 días pero empleando adyuvante incompleto de Freund (Gibco) y se realizó una sangría de prueba. Al no obtener resultados se continuó con el esquema de inmunización en tres ocasiones más. Los conejos fueron sacrificados 23 semanas después de la primera inoculación para obtener la sangre total y separar el suero. Los sueros pre-inmunes (los cuales se obtuvieron previos a la primera inmunización) e inmunes de cada conejo fueron analizados por Western Blot (WB), cada suero se denominó de acuerdo a la proteína inoculada. Los sueros se guardaron a -20°C hasta su uso.

6.7. Western Blot

Para este análisis se obtuvieron nuevas muestras de hemolinfa de insectos infectados, las cuales se cargaron en un gel de poliacrilamida al 12% para la separación de proteínas; después de la electroforesis se realizó la transferencia a membranas de nintrocelulosa (Schleicher & Schuell de poro 20µm). Se cortaron tiras de la membrana de 3mm de grosor, que contenían 2µg de proteína aproximadamente, las cuales se bloquearon con leche descremada al 10% en PBS durante 12 horas a 4°C en agitación constante para inhibir los sitios de unión inespecíficos. Posteriormente, las membranas fueron incubadas con los sueros inmunes y pre-inmunes en una dilución 1:500 en leche descremada al 10% en PBS durante 2 horas a temperatura ambiente y agitación constante. A continuación, las membranas se lavaron 10 minutos tres veces con PBS-Tween20 al 0.1% cada vez y al terminar se incubaron con un anticuerpo secundario que reconocía IgG's de conejo (Zymed 81-6120) acoplado a peroxidasa de rábano (HRP) en una dilución 1:1000 en PBS-Tween20 0.1% por 2 horas a temperatura ambiente y agitación constante. En último lugar las membranas se lavaron tres veces con PBS-Tween20 al 0.1%, 10 minutos cada vez y se revelaron con el sustrato 3,3-diaminobenzidina de SIGMA-ALDRICH (0.5mg/ml de PBS) y 0.02% de peróxido de Hidrógeno (H₂O₂), la reacción se detuvo con agua (Sambrook *et al.* 1989).

Se siguió el mismo procedimiento para detectar las proteínas de pesos específicos durante el curso de una infección con el parásito en el insecto.

6.8. Detección de proteínas de bajo peso molecular

En 1987 Schägger y Von Jagow reportaron un método de electroforesis que separaba mejor las proteínas de bajo peso molecular, utilizando tricina como el donador de iones en un sistema de SDS-PAGE en vez de la glicina, el cual fue utilizado para los siguientes experimentos.

Se realizaron geles de poliacrilamida al 9.8 y 15% que se prepararon con un amortiguador de Tris.Cl/SDS pH 8.45 y glicerol. Las muestras se calentaron previamente 5 minutos a 100°C en presencia del amortiguador de muestra de tricina (trizma base 0.1M, glicerol 24%, SDS 8%, DTT 0.2M, azul Coomasie G-250 0.02%). El gel con dos tipos de amortiguadores de corrida, el amortiguador del cátodo (trizma base 0.1M, tricina 0.1M, SDS 0.1%, pH 8.25) que va a la parte superior de la cámara, y el amortiguador del ánodo (trizma base 0.2M, pH 8.9) el cual se coloca en la parte inferior de la cámara, se utilizaron marcadores de peso preteñidos de bajo peso molecular (Sigma C6210-1VL). Los geles se corrieron a 30V por una hora y después a 150V por 1 hora y 15 minutos. Al terminar el corrimiento se fijaron en una solución de metanol 50%, ácido acético 10% por 30 minutos y después se tiñeron con una solución de azul Coomasie G-250 0.025% y ácido acético 20% por una hora y se destiñeron con una solución de ácido acético al 10%.

6.9. Detección de glicoproteínas

Para detectar la presencia de proteínas glicosiladas por medio de WB se utilizaron dos lectinas biotiniladas: Concanavalina A (ConA) (Pierce 39902) que reconoce residuos de manosa y glucosa, y lectina de *Psophocarpus tetragonolobus* (Sigma L-3014) la cual detecta residuos de N-acetil D-galactosamina.

Se utilizaron 4µg de proteína de las muestras de hemolinfa del día 31p.i. de los grupos de insectos infectados. Se corrieron en geles de poliacrilamida al 12% y las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Schleicher & Schuell de poro 20µm) para la realización del Western Blot.

Las tiras de membrana se bloquearon con leche descremada al 10% en PBS durante 12 horas a 4°C, posteriormente se realizaron tres lavados con PBS1X-Tween20 0.1% de 10 minutos cada uno y se incubaron en presencia de la lectina correspondiente. La Con A se incubó en leche descremada al 10% en PBS y la lectina de *P. tetragonolobus* en PBS-Tween20 al 0.1%, durante 2 horas a temperatura ambiente y agitación constante. Se realizaron tres lavados con PBS-Tween20 0.1% de 10 minutos cada uno, la segunda incubación fue en presencia de estreptoavidina acoplada a HRP (Amersham RPN 1231) en PBS-Tween20 por 2 horas a temperatura ambiente y agitación constante. El revelado se efectuó en presencia del sustrato 3,3-diaminobenzidina de SIGMA-ALDRICH (0.5mg/ml de PBS) y 0.02% de peróxido de Hidrógeno (H₂O₂), la reacción se detuvo con agua (Sambrook *et al.* 1989, Dodge & Heimer 2001).

VII. Resultados

7.1. Proteínas presentes en la hemolinfa de *T. pallidipennis*

Se obtuvo un extracto de proteínas de la hemolinfa de ninfas en 5º estadio de *T. pallidipennis*, con esta muestra se realizó un perfil proteico que se comparó con muestras obtenidas con anterioridad en el laboratorio, que correspondían a insectos infectados y no infectados con el parásito.

En la figura 7.1 se muestra que el perfil proteico de la hemolinfa de estos insectos es muy homogéneo. Sin importar la presencia del parásito encontramos varias proteínas que se comparten en la mayoría de las muestras, las cuales abarcan un amplio rango de pesos moleculares. Debido a que cada insecto proporciona una pequeña cantidad de hemolinfa, fue necesario coleccionar de varios individuos para extraer la suficiente cantidad para trabajar.

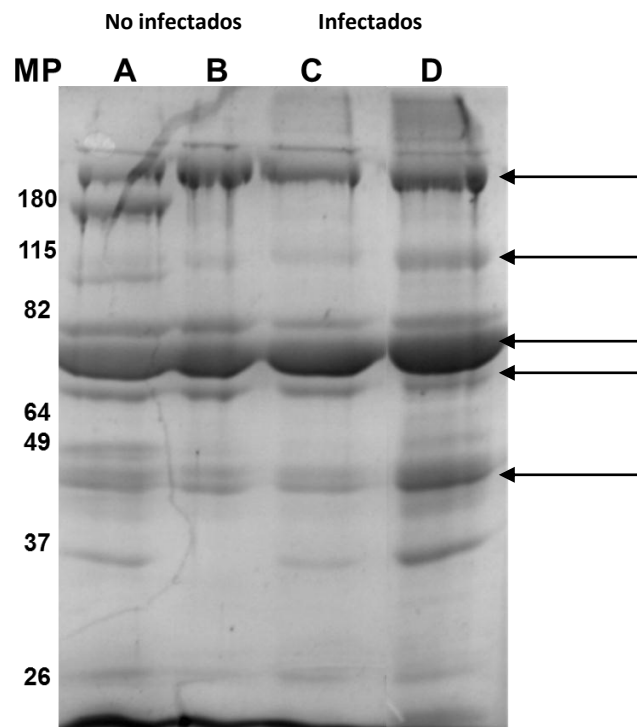


Figura 7.1. Patrón proteico de la hemolinfa de *T. pallidipennis* en SDS-PAGE. Gel (acrilamida 12%) comparativo entre muestras de hemolinfa de insectos no infectados (A, B) e infectados con *T. cruzi* (C, D). Las flechas indican las proteínas utilizadas para la producción de anticuerpos. Cada carril contiene 20µg de proteína de un grupo de insectos, la tinción se realizó con Azul Coomassie.

7.2. Anticuerpos policlonales contra proteínas de la hemolinfa del vector

Teniendo identificadas algunas proteínas que se mantuvieron constantes en la hemolinfa de esta especie de vector procedimos a la producción de anticuerpos utilizando bandas de pesos específicos.

El análisis por WB de los sueros inmunes muestra que cuatro conejos dieron una señal fuerte en el peso molecular esperado, mientras que el conejo inoculado con la proteína de 200kDa fue el que dio la señal más débil (Figura 7.2).

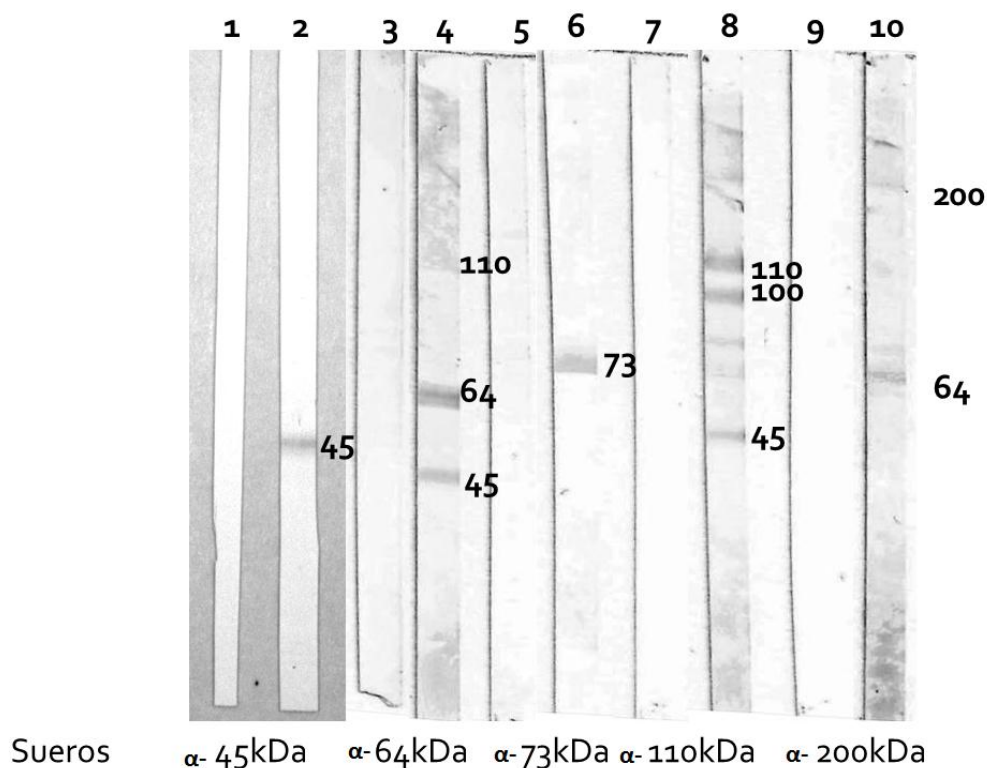


Figura 7.2. Western Blot de los sueros inmunes obtenidos de conejos en membrana con hemolinfa de *T. pallidipennis* infectado con *T. cruzi* 5µg de proteína por carril. Primer anticuerpo: suero de conejo preinmune (columnas nones) e inmune (columnas pares) diluido 1:500. Segundo anticuerpo (Goat α-IgG conejo, Zymed 81-6120) diluido 1:8000. Los pesos moleculares (kDa) de las proteínas identificadas se indican a lado de cada una.

Obtuvimos un resultado heterogéneo con los sueros, debido a que el único suero que dio un reconocimiento monoespecífico en el peso esperado fue el α-73kDa. Por otra parte, en ensayos posteriores se determinó que el suero α-45kDa, que únicamente tenía un reconocimiento en 45kDa, presenta también una señal en 110kDa. Mientras que, con dos sueros tenemos reconocimiento en la proteína esperada y dos más tanto en pesos mayores como menores; el suero α-64kDa señala una proteína principal de 64kDa, además de otras dos en 45 y 110kDa, y el suero α-110kDa presenta una señal muy intensa tanto en 110kDa como en 100 y 45kDa, ambas con menor intensidad. Por último, el suero α-200kDa muestra un reconocimiento intenso en 64kDa y una señal débil en la zona de 200kDa.

7.3. Cambios en las proteínas de la hemolinfa del insecto durante una cinética de infección

Conociendo ya el perfil proteico de la hemolinfa de *T. pallidipennis* y teniendo los anticuerpos como herramienta para monitorear proteínas de pesos específicos, se procedió a

colectar hemolinfa durante una infección con *T. cruzi* para determinar si las proteínas en la hemolinfa de los insectos infectados se veían afectadas por la presencia del parásito.

7.3.1. Colecta de hemolinfa

Para el fin señalado anteriormente, se colectó hemolinfa en dos experimentos independientes con insectos infectados con *T. cruzi* y un grupo de insectos control. Los tres grupos se mantuvieron en las mismas condiciones y la colecta de hemolinfa se realizó a los mismos días post-infección en el caso de los insectos infectados y post-alimentación para el grupo control, los días de colecta se muestran en la tabla 7.1.

Tabla 7.1. Cinética de infección de *T. pallidipennis* de insectos infectados con *T. cruzi* y no infectados

Días post infección	0			3			10			17			31			41		
	1	2	C	1	2	C	1	2	C	1	2	C	1	2	C	1	2	C
Grupos	1	2	C	1	2	C	1	2	C	1	2	C	1	2	C	1	2	C
Individuos	5	5	5	5	5	5	5	5	5	4	5	5	3	4	4	3	3	4
Alimentación	RI	RI	R	--	--	--	--	--	--	C	C	C	C	C	C	--	--	--
Parásito en heces	O	O	O	O	O	O	O	O	O	X	X	O	X	X	O	X	X	O

Ratón infectado con T. cruzi (RI) *Sin alimentar (--)* *Presencia (X)*
Ratón no infectado (R) *Conejo (C)* *Ausencia (O)*

La infección fue monitoreada durante todo el tiempo que duró el experimento y se observó a partir del día 17 post-infección la presencia de tripomastigotes metacíclicos en las heces de los insectos del grupo experimental 1 los cuales también se observaron en el grupo 2, aunque en menor cantidad. Una vez establecida la infección, seguimos observando los parásitos en las heces de los insectos en los días posteriores.

7.3.2. Perfil proteico de la hemolinfa durante la cinética de infección

Al concluir la colecta de hemolinfa de cada grupo experimental y el control, se realizó el perfil proteico de la hemolinfa de todas las muestras, con el cual podríamos comparar si las proteínas de los insectos infectados difieren de las que se encuentran en los insectos sin el parásito.

En la figura 7.3 se muestran los gels de electroforesis en condiciones reductoras de cada grupo, a primera vista observamos que la cantidad de bandas de proteínas es mayor a la que obtuvimos en el primer experimento para determinar el patrón proteico. Observamos que las proteínas se distribuyen en dos grandes áreas del gel, en la parte superior que va de pesos moleculares de más de 180kDa a 49kDa y hacia la parte inferior, de 37 a 26kDa, dejando un área entre 49 y 37kDa en la que no hay presencia de proteínas, a excepción del día 41 de los insectos control en el que se presenta un abundante bandeo en esa área.

En los tres grupos observamos proteínas de los siguientes pesos moleculares: 241,196, 110, 70, 59, 47, 43, 21, 15 y 14kDa, que son muy abundantes y se mantienen constantes a lo largo de la infección, las cuales concuerdan con varias de las proteínas constitutivas que encontramos en las primeras muestras.

Por otro lado, uno de los principales cambios que observamos en los tres geles es que en los primeros días de la cinética se observa una banda de 45kDa, la cual desaparece los días 10 y 17 de la infección y en su lugar aparecen dos bandas de menor intensidad, una de 46kDa y otra de 42kDa.

Las mayores diferencias que pudimos encontrar entre los insectos infectados y no infectados se presentan claramente al 41 post-infección, en el cual se presenta una mayor cantidad de proteínas en los insectos control, bandas que no se presentaron en ningún otro grupo en ningún momento de la cinética, la mayoría de ellas en la región de 37 a 26kDa. Además una de las proteínas abundantes y constitutivas de la hemolinfa, de 110kDa, que se presenta en todos los insectos infectados y no infectados a lo largo de la infección, desaparece en el día 41 de los insectos control.

En el área de 26 a 19kDa observamos diferencias entre los tres grupos, lo que puede deberse a las diferencias que existentes entre los individuos utilizados para cada grupo, lo que incluye su grado de desarrollo o sus condiciones fisiológicas.

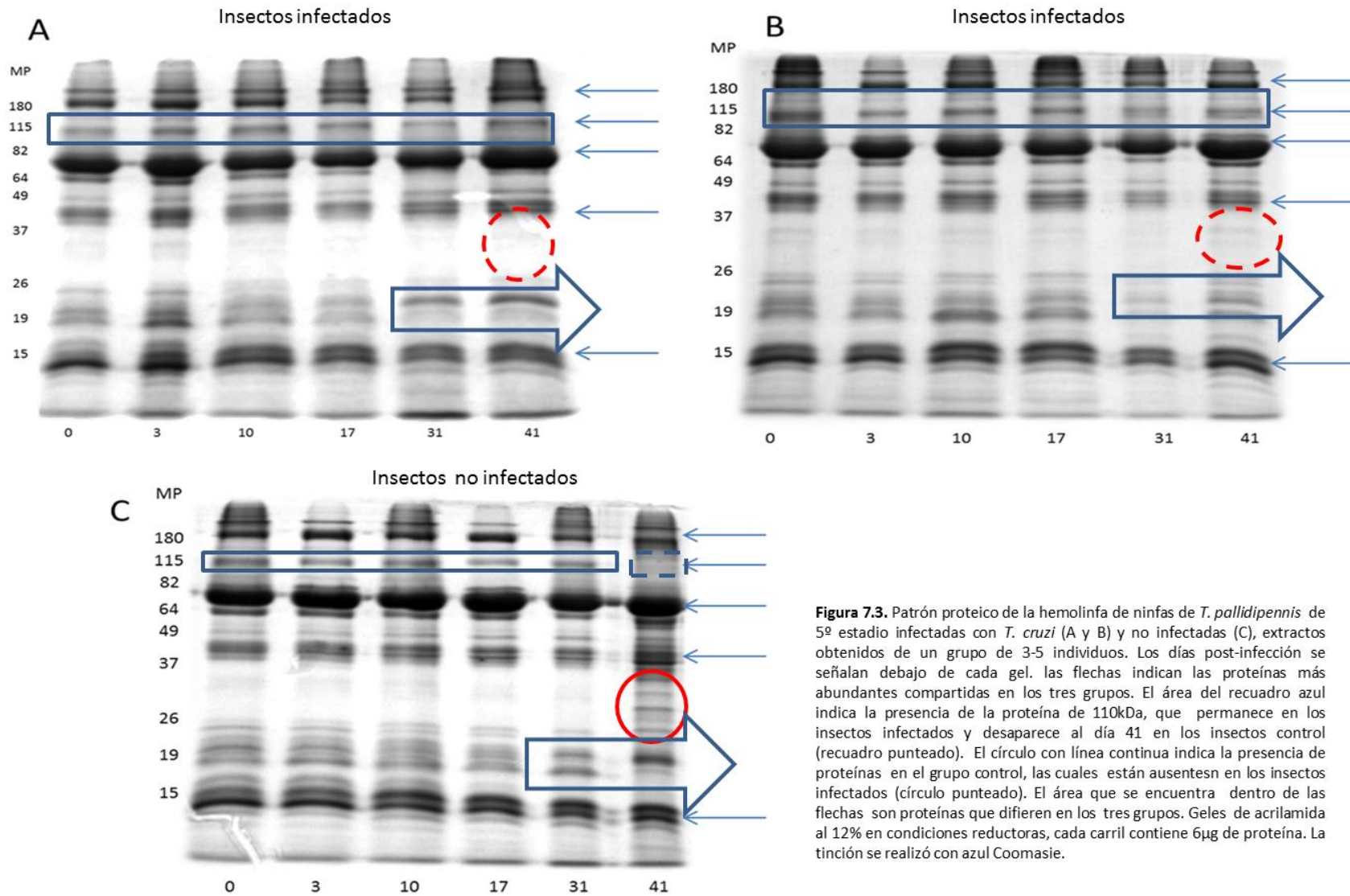


Figura 7.3. Patrón proteico de la hemolinfa de ninfas de *T. pallidipennis* de 5º estadio infectadas con *T. cruzi* (A y B) y no infectadas (C), extractos obtenidos de un grupo de 3-5 individuos. Los días post-infección se señalan debajo de cada gel. las flechas indican las proteínas más abundantes compartidas en los tres grupos. El área del recuadro azul indica la presencia de la proteína de 110kDa, que permanece en los insectos infectados y desaparece al día 41 en los insectos control (recuadro punteado). El círculo con línea continua indica la presencia de proteínas en el grupo control, las cuales están ausentes en los insectos infectados (círculo punteado). El área que se encuentra dentro de las flechas son proteínas que difieren en los tres grupos. Geles de acrilamida al 12% en condiciones reductoras, cada carril contiene 6µg de proteína. La tinción se realizó con azul Coomassie.

7.3.3. Detección de cambios en las proteínas con los anticuerpos policlonales

Se procedió a monitorear proteínas de pesos específicos con los sueros producidos. En la figura 7.4 se muestran los blots de los sueros que reconocen proteínas que no cambian entre los insectos infectados y el grupo control. Si bien, observamos que la proteína de 45kDa en el análisis electroforético desaparece y es sustituida por dos proteínas a lo largo del tiempo, esto también se reconoció con los sueros α -45kDa, siendo más evidente hacia el día 10. Sin embargo, la proteína de 46kDa no es reconocida por este suero el día 41 a pesar de que una proteína del mismo peso no desaparece en los análisis de proteínas totales. El suero α -64kDa, por su parte, mantiene un reconocimiento en las bandas de 110kDa las cuales permanecen constantes a lo largo de la infección. También reconoce una banda de 45 y una de 64kDa que disminuyen su concentración en los insectos infectados, pero no desaparecen. En los experimentos realizados con este suero surgieron problemas de técnica y es por eso que no se muestra el día 31p.i.

Los cambios significativos entre insectos infectados y no infectados se muestran en la figura 7.5, en la cual se presentan los blots correspondientes a los sueros α -73, α -110 y α -200kDa. Con el suero α -73kDa observamos un reconocimiento de una banda muy abundante en 73kDa, la cual corresponde a la proteína abundante que se observa en el perfil proteico de la hemolinfa de todos los insectos analizados hasta el momento. Este suero por otra parte reconoce dos bandas de 55 y 50kDa que están presentes en los insectos no infectados en el día 41p.i. que es cuando el grupo control presenta un aumento en la cantidad de proteínas presentes en la hemolinfa.

Por su parte, los sueros α -110 y α -200kDa muestran un reconocimiento de proteínas que están presentes únicamente en insectos infectados con *T. cruzi*, en el caso del suero α -110kDa la cual desaparece en los insectos control el día 41. En el caso de suero α -200kDa, como ya habíamos visto, no da señal en el peso esperado, aun así reconoce una banda de 100kDa, la que muestra una fuerte expresión en los insectos infectados mientras que en el grupo control se observa débil y termina por desaparecer.

Las proteínas que reconocen cada suero se resumen en la tabla 7.2.

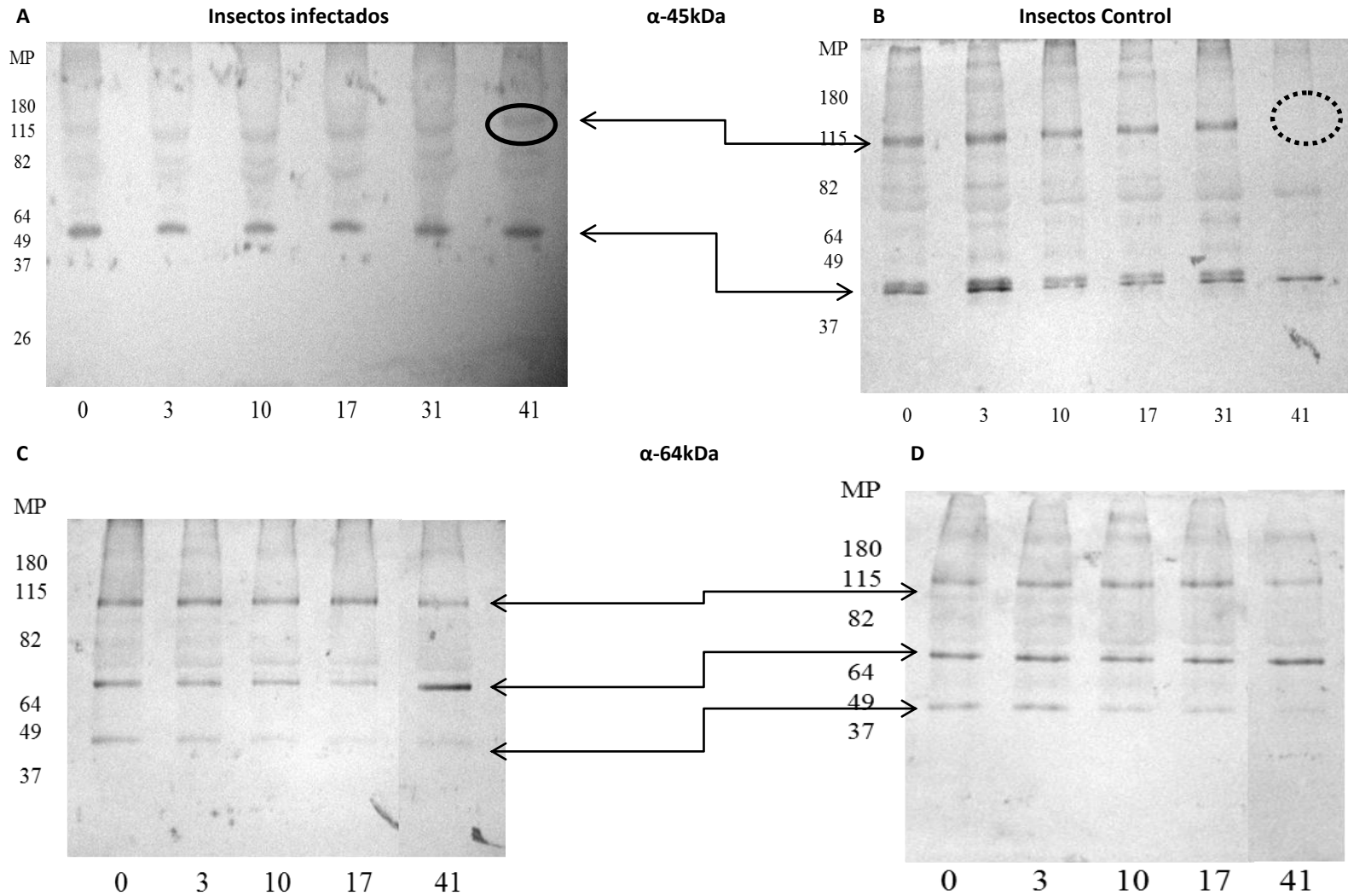


Figura 7.4. Western Blot utilizando sueros inmunes de conejo contra proteínas de 45kDa (A,B) y 64kDa (C,D). Los días de la cinética esa cinética están indicados debajo de cada imagen. Las flechas indican las proteínas que reconocen los sueros. Cada membrana contiene 4 μ g de proteína por muestra. Los sueros se utilizaron en una dilución 1:500 y el segundo anticuerpo (Goat α -IgG de Conejo Zymed 81-6120) a 1:8000. En los insectos infectados se muestra un blot representativo de dos experimentos independientes de los grupos de insectos infectados.

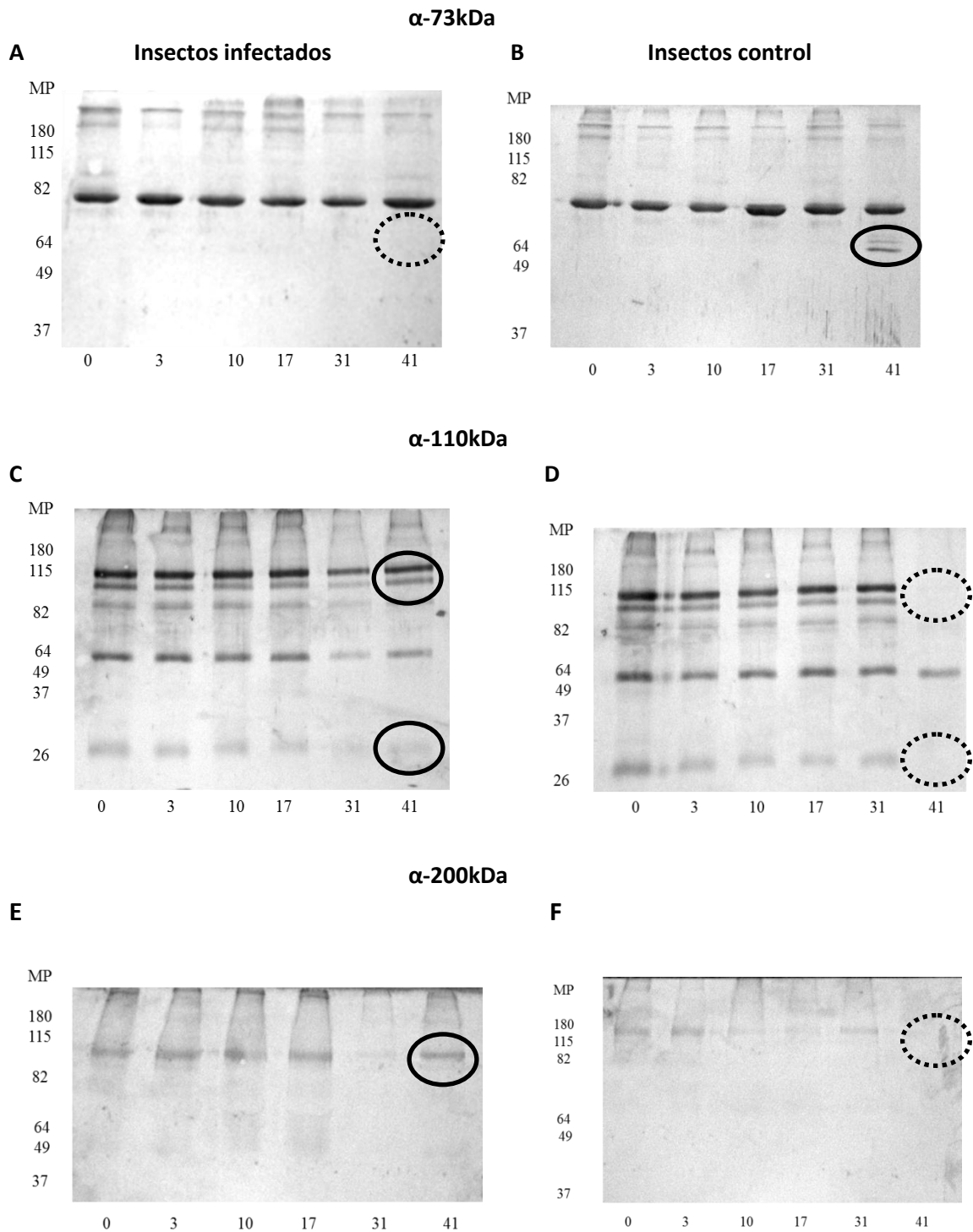


Figura 7.5. Western Blot utilizando sueros inmunes contra proteínas de 73kDa (A,B), 110kDa (C,D) y 200kDa (F,G). Los círculos de línea continua representan la presencia de proteínas que están ausentes en el grupo de insectos contrario, los círculos de línea punteada señalan las proteínas ausentes. Insectos infectados (A,C,E) insectos no infectados (B,D,F). Cada muestra contiene 4 μ g de proteína, los sueros inmunes se utilizaron en una dilución 1:500 y el segundo anticuerpo (Goat α -IgG de Conejo Zymed 81-6120) en una dilución 1:8000.

7.3.4. Proteínas de bajo peso molecular

El análisis realizado hasta ese momento mostró que había diferencias en las proteínas de la hemolinfa de los insectos del grupo control y los grupos experimentales, sin embargo, con los geles de acrilamida al 12% tenemos el perfil de 200 a 10kDa, por lo que realizamos experimentos para ampliar el rango de definición de los geles hacia pesos moleculares menores. Para esto se utilizaron geles de tricina con los cuales se pueden separar péptidos de hasta 1kDa.

Las proteínas que se pueden separar con esta técnica son preferentemente hidrofóbicas (Schägger 2006), por lo que al realizar los primeros experimentos con las muestras de la cinética y el grupo control observamos diferencias con respecto al patrón proteico que ya habíamos establecido.

En la figura 7.6 podemos identificar desde la proteína de 110kDa, la cual está presente en los insectos infectados y desaparece en los insectos control al día 41, señalada con una flecha. Un cambio que observamos es con la proteína de 73kDa, la cual era la más abundante en todas las muestras que se han analizado, en estos geles se separa en dos, de 80 y 75kDa que a su vez son muy abundantes. Por otro lado, tenemos una pérdida de proteínas en la región de 26 a 19 kDa, que se debe a que esta zona no se resuelve bien en este tipo de geles. Por debajo de esta zona tenemos las bandas de 15 y 14kDa, pesos que había sido asignados con los geles de glicina, sin embargo en estos experimentos observamos que las bandas se encuentran por encima del marcador de 16kDa, lo que les daría un peso de 18 y 17kDa.

Por otro lado, observamos que proteínas de bajo peso molecular están presentes en mayor abundancia en los insectos parasitados, una banda de 9kDa, la cual desaparece al día 31. En los insectos control esta banda se observa tenue pero constante hasta el día 31 y en el día 41p.i. aparecen dos bandas de 9 y 8kDa muy abundantes. Los insectos infectados cuentan con una banda de 6kDa que permanece constante y aumenta su expresión al día 41, la cual no se observa en los control mas que en los días 17 y 31p.i. Sin embargo, probamos con un poro más cerrado de acrilamida para separar aún más las proteínas de bajo peso molecular que se pudieran encontrar en la hemolinfa.

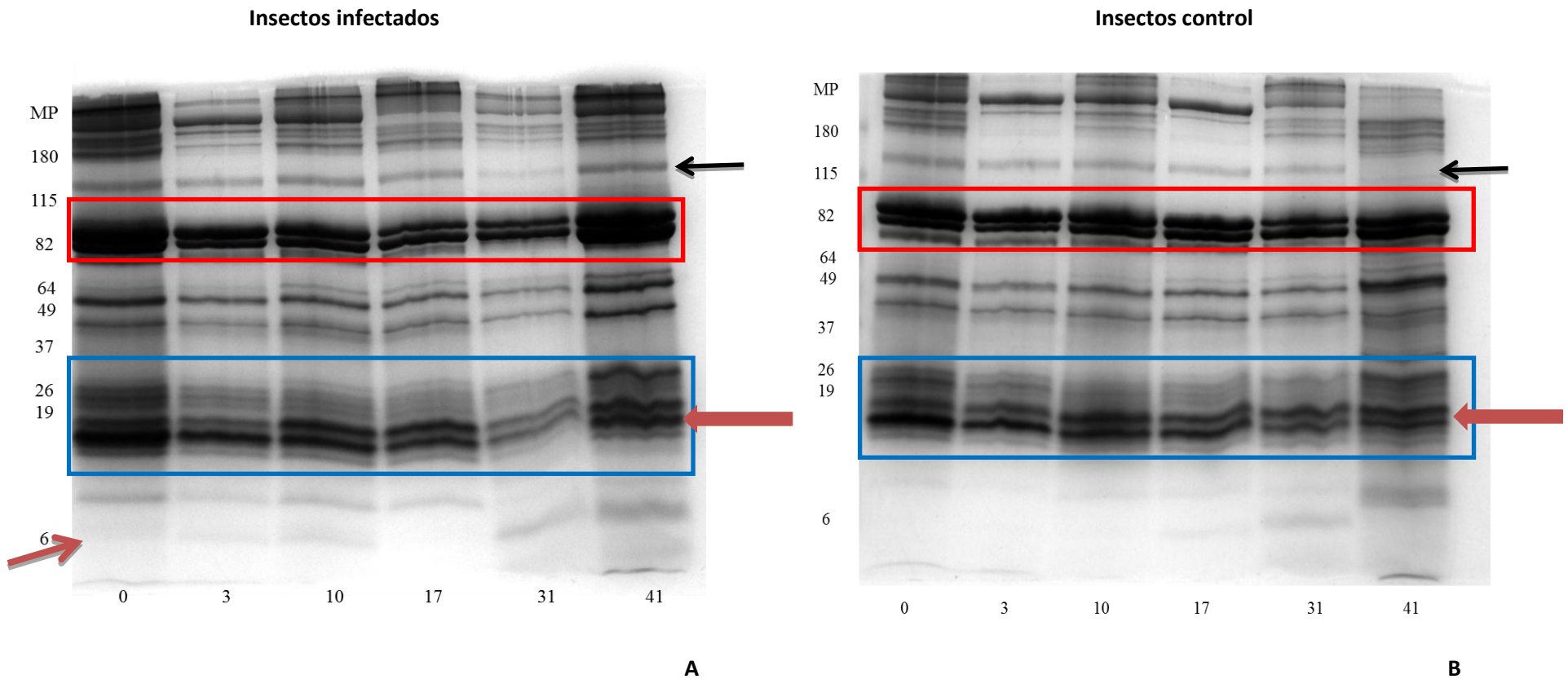


Figura 7.6. Electroforesis Tricina SDS-PAGE gels de acrilamida al 9.8%. Gel representativo de los grupos de insectos infectado (A), gel del grupo de los insectos control (B). En el recuadro rojo se señala la proteína de 73kDa que era abundante y resultaron ser dos. La zona de 26 a 19kDa se muestra en el recuadro azul, la cual presente una menor cantidad de proteínas. La flecha negra señala la proteína de 110kDa y la flecha roja una 6kDa presente sólo en los insectos infectados. Se cargaron 6 μ g de proteína por muestra y la tinción se realizó con azul Coomassie.

A. Insectos infectados

B. Insectos control

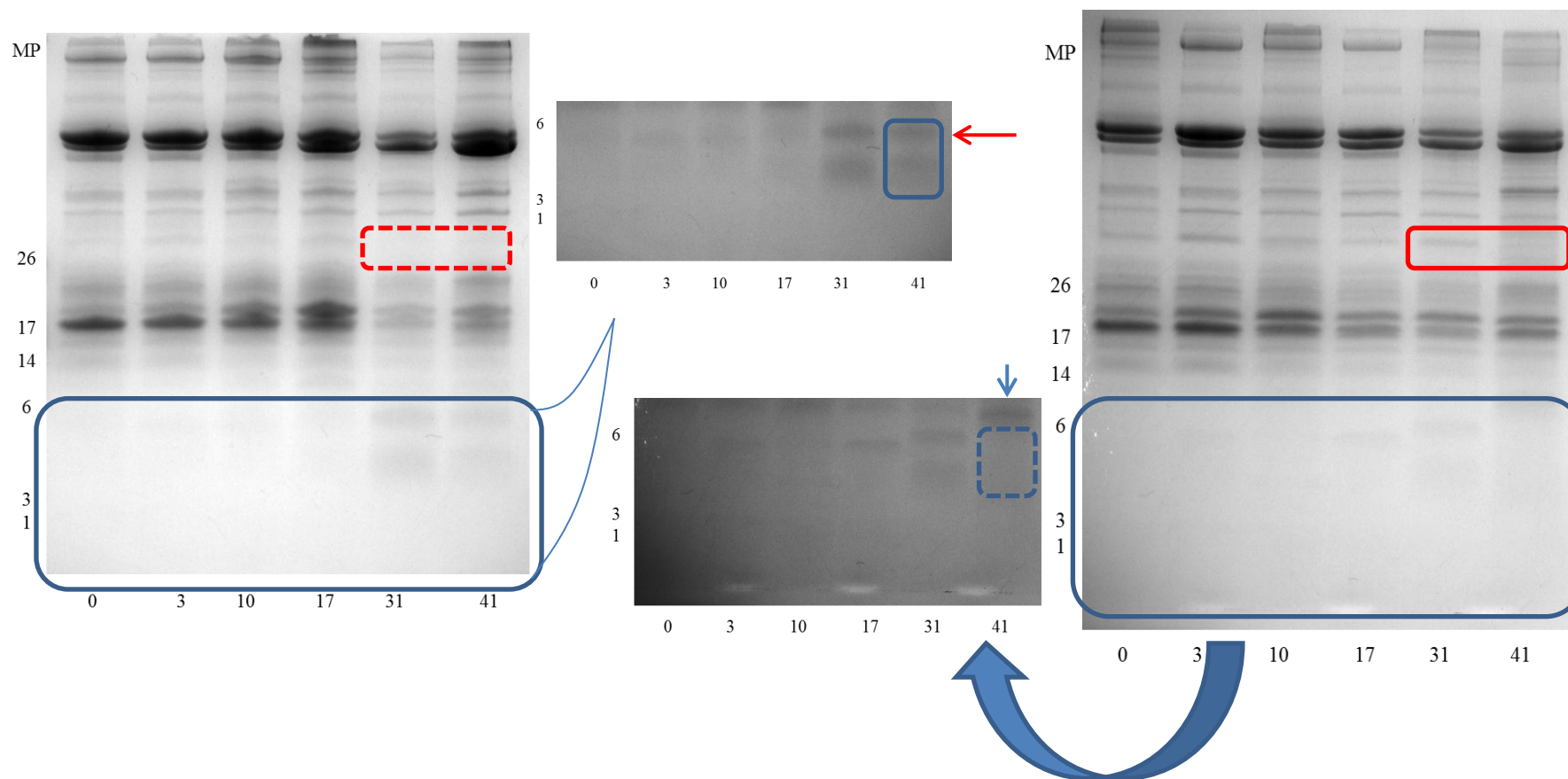


Figura 7.7. Electroforesis Tricina SDS-PAGE gels de acrilamida al 15%. Gel representativo de dos experimentos independientes de insectos infectados (A), gel del grupo de los insectos control (B). Los recuadros azules indican la región del gel que en donde se aumentó el contraste para apreciar mejor las bandas. Los cuadros azules pequeños indican las proteínas presentes sólo en insectos infectados (línea continua) y ausentes en los insectos control (línea punteada). La flecha roja señala la proteína de 5kDa presente en insectos infectados y la flecha azul la de 7kDa que sólo se observa en los insectos no infectados. En el recuadro rojo está señalada una proteína de 38kDa que desaparece en insectos infectados. Se cargaron 6µg de proteína por muestra y la tinción se realizó con Azul Coomassie.

Los resultados presentados en la figura 7.7 muestra una separación de proteínas por electroforesis Tricina SDS-PAGE en condiciones reductoras en geles al 15% de acrilamida. En estos geles obtenemos una menor cantidad de proteínas por arriba de 80kDa, debido a que en la malla del gel las proteínas de alto peso molecular no entran. Observamos el doblete de proteínas de 80 y 75kDa que es muy abundante en la parte superior del gel. Con este experimento encontramos dos nuevas diferencias entre insectos infectados y el grupo control. En los infectados se presenta una banda de proteínas de 5kDa que permanece toda la cinética de infección, la cual podría ser la banda de 6kDa identificada en el experimento anterior, y una banda de 4kDa que se presenta únicamente en los últimos días en los insectos infectados. Estas últimas proteínas en los insectos no infectados se observan claramente en el día 31p.i. y desaparecen al día 41. Sin embargo, en éstos tenemos una proteína de 7kDa abundante que no se encuentra en el otro grupo. En contraparte observamos una proteína de 38kDa que desaparece en los insectos infectados y se mantiene en los insectos control.

Todas las diferencias encontradas entre los triatominos infectados con *T. cruzi* y los del grupo control se resumen en la tabla 7.3.

Tabla 7.3. Diferencias en las proteínas de insectos infectados y no infectados con *T. cruzi*

Ninfas hembra de 5º estadio de <i>T. pallidipennis</i>	Infectadas con <i>T. cruzi</i>	Control	
	Diferencias		
Patrón proteico Electroforesis SDS-PAGE	Proteína de 110kDa permanece en toda la cinética	Proteína de 110kDa desaparece al día 41	
	Escasez de proteínas en la zona de 37 a 27kDa	Mayor abundancia de proteínas en la región de 37 a 26kDa en el día 41	
	Ausencia de una banda de 16kDa	Proteína de 16kDa que desaparece al día 31	
	Sueros	Proteínas	
Western Blot	α-73kDa	No se observan bandas de otros pesos a 73kDa	Aparecen las proteínas de 55 y 50kDa al día 41
	α-110kDa	Se mantienen las proteínas de 110,100 y 26 hasta el final del experimento	Desaparecen las proteína de 110, 100 y 26kDa al día 41
	α-200kDa	Se mantiene la proteína de 100kDa hasta el final	Desaparece la proteína de 100kDa
	Diferencias		
Tricina SDS-PAGE	Presencia de una banda de 6kDa	Sin banda de 6kDa	
	Banda de 110kDa permanece hasta el día 41	Banda de 110kDa desaparece al día 41	
	Mayor expresión de una banda de 9kDa que permanece hasta el día 41	Banda de 9kDa presente sólo los días 17 y 31	
	Proteína de 13kDa más abundante hasta el día 31	Aumenta la concentración de la proteína de 13kDa al día 41	
	Proteína de 5kDa presente en toda la cinética de infección	Proteína de 5kDa presente en menor abundancia y desaparece al día 31	
	Aparece una banda de 4kDa los días 31 y 41	Banda de 4kDa presente en menor concentración sólo el día 31	
	Desaparece banda de 38kDa el día 31	Permanece banda de 38kDa hasta el día 31	

7.4. Glicoproteínas

Como complemento del perfil proteico de la hemolinfa de estos insectos se realizaron experimentos con lectinas, proteínas que reconocen azúcares en otras proteínas, con lo que obtuvimos el perfil de glicoproteínas de la hemolinfa (figura 7.8), específicamente proteínas que tienen residuos de N-acetil D-galactosamina, glucosa y manosa.

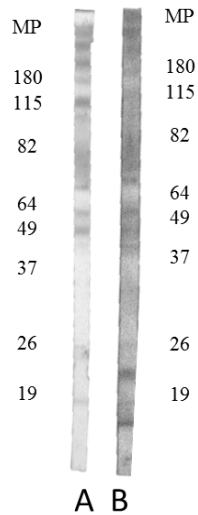


Figura 7.8. Western Blot utilizando lectinas que reconocen residuos de manosa y glucosa, Con A (A) y con residuos de N-acetil D-galactosamina, lectina de *P. tetragonolobus* (B). Hemolinfa de insectos infectados al día 31p.i. Cada carril contiene 6µg de proteína.

Observamos que gran parte de las proteínas de la hemolinfa contienen alguno de los tres residuos de azúcares o los tres, desde las proteínas de alto peso molecular hasta proteínas de 10kDa. En la tabla 7.4 se muestra un resumen de las glicoproteínas presentes en la hemolinfa y los azúcares que contienen.

Este experimento se realizó únicamente con muestras de insectos infectados, debido a problemas con la estandarización de la técnica y falta de tiempo. Sin embargo, podemos observar que hay una gran cantidad de proteínas en la hemolinfa que se encuentran glicosiladas principalmente en áreas de altos pesos moleculares y hasta 37kDa, en donde se observa un patrón similar al obtenido con los geles de acrilamida. Hay que hacer notar que la proteína más abundante en la hemolinfa, de 73kDa, no se encuentra glicosilada con ninguno de estos tres residuos.

Tabla 7.4. Glicoproteínas presentes en la hemolinfa de *T. pallidipennis* infectado con *T. cruzi*.

Proteínas kDa	Residuos de azúcares
261	1, 2
243	1
226	1,2
190	1
124	1,2
110	1
102	2
83	2
64	1,2
58	2
46	1,2
45	1,2
42	1,2
34	2
31	2
24	1,2
20	2
18	1
16	2

Glucosa y manosa (1), N-acetil D-galactosamina (2)

VIII. Discusión

Las enfermedades transmitidas por vectores se encuentran entre las que más afectan a la población humana y el manejo de éstas tradicionalmente se ha centrado en controlar la población de vectores o aumentar la resistencia de los humanos a la enfermedad, e incluso en tratar de erradicarla (Elliot *et al.* 2003). No obstante, hay ciertas enfermedades llamadas zoonosis que no se pueden atacar de esta forma, debido a que no sólo los humanos son afectados por los parásitos que las causan, sino que cuentan con reservorios en animales salvajes y domésticos, y aunado a eso, los insectos vectores no son de una sola especie que pudiera ser erradicada. Tal es el caso de la Enfermedad de Chagas, en la que tenemos una gran cantidad de especies capaces de transmitir el parásito, más de 150 especies de mamíferos reservorios y diferentes formas de transmisión que pueden traspasar los límites del continente americano, del cual es endémica.

En Latinoamérica la principal forma de transmisión de la enfermedad es por los insectos vectores, siendo éstos responsables de la mayoría de los casos reportados en las áreas endémicas. Es por esto que el estudio de las relaciones que hay entre vectores y parásitos es importante, debido a que son estas interacciones las que favorecerán o interrumpirán el desarrollo del parásito en el insecto y por lo tanto su transmisión (Paskewitz & Christensen 1996, Mello *et al.* 1999, Azambuja *et al.* 1999, 2005a, Elliot *et al.* 2003).

El presente estudio muestra las diferencias en las proteínas de la hemolinfa entre los insectos que están interaccionando con *T. cruzi* y los que no, lo que podrá ampliar el conocimiento que existe de las relaciones parásito-vector.

8.1. Perfil proteico de la hemolinfa de *T. pallidipennis* infectado con *T. cruzi*

Los estudios que se han realizado en la hemolinfa de los triatominos, se han centrado principalmente en los vectores sudamericanos, proporcionando poca información con respecto a los mexicanos, que pertenecen a géneros e incluso tribus diferentes, es por eso que un análisis sobre este sentido es importante para tener mayor conocimiento en las interacciones vector-parásito.

En estos trabajos se han descrito proteínas de la hemolinfa que tienen funciones de almacenaje de nutrientes o transporte de éstos (Chinzei *et al.* 1994). Tal es el caso de las lipoproteínas, las cuales tienen como funciones transportar lípidos entre los tejidos del insecto, por lo tanto, pueden pasar de la hemolinfa al intestino y viceversa, lo que señala que hay un constante intercambio de diferentes tipos de proteínas entre el intestino y el hemocele (Grillo *et al.* 2003).

Las principales proteínas de la hemolinfa de los insectos son las lipoforinas (LP) y las proteínas de almacén (SP), las cuales tienen funciones en el desarrollo, metamorfosis y reproducción. En la mayoría de estos insectos las SP se encuentran abundantes en la hemolinfa de los estadios larvales y se utilizan para formar la cutícula y fuente de aminoácidos para otro tipo de proteínas que están implicadas en la ecdisis (Kanost 1990). Sin embargo, en triatominos se han encontrado también en abundante cantidad en los estadios adultos. Estos insectos pueden permanecer durante varios meses sin alimentarse, dependiendo de las condiciones y estadio de desarrollo, por lo que las SP podrían tener una función de reserva de nutrientes, que serán utilizados durante las épocas de inanición, lo que conllevaría a que

durante este tiempo puedan disminuir su expresión, la cual aumentará al momento de una nueva comida (Chinzei *et al.* 1994). Las SP son proteínas hexaméricas de 450-480kDa de peso molecular en su estado nativo, compuestas de subunidades cuyo peso molecular se encuentra entre 72 y 75kDa y son sintetizadas en el cuerpo graso y secretadas a la hemolinfa (Chinzei *et al.* 1994). Nosotros encontramos una proteína muy abundante en este peso molecular, de hecho es la banda que más abunda en todas las muestras de hemolinfa utilizadas, la cual podría corresponder a una proteína de almacén. Debido a que ésta no modificó de forma drástica su expresión podría corroborar que sea una SP, ya que los insectos utilizados nunca estuvieron sin alimentarse más de dos semanas, por lo que no tuvieron que recurrir a sus nutrientes almacenados y así la proteína conservó su abundancia. Las subunidades de las SP se encuentran en los rangos de peso de nuestra proteína de 73kDa, la cual cuenta con un suero que únicamente la reconoce a ella (figura 7.5A), que además es muy abundante, con lo que también podríamos suponer que se trate de una proteína de almacén.

Por otro lado también las LP están compuestas por diferentes subunidades, una de cadena pesada (LP-H) y otra de cadena ligera (LP-L), que permanecen constantes en el paso de ninfas a adultos. Los pesos calculados para las subunidades de la LP se calculan en 200 y 75kDa respectivamente, lo que nos deja de nuevo con una proteína abundante en el área de 70-75kDa, lo que aumentaría la expresión de proteínas en esa región de los geles que separan las proteínas por peso molecular. Con los geles de tricina esta banda muy abundante de 73kD se separó en dos, una de 75kDa y otra de 72kDa, ambas con una expresión mayor al resto de las proteínas. Si tomamos en cuenta que los geles de tricina separan las proteínas hidrofóbicas y tanto las SP y LP transportan nutrientes, entre ellos lípidos, es posible que estas dos bandas que tenemos en esa región pertenezcan a las proteínas SP y LP-L.

En cuanto a la expresión de estas proteínas entre los insectos infectados y no infectados, no observamos diferencias importantes, en los dos grupos permanecen constantes, lo que indicaría que no hay un déficit de nutrientes entre los insectos que tienen al parásito en su sistema.

Para el caso de las proteínas que se expresan diferencialmente entre los insectos infectados y no infectados, observamos que hay algunas que únicamente se expresan en las chinches que presentan el parásito, lo que podría deberse a que éste modifica de alguna forma la homeostasis del insecto y se pone en marcha mecanismos que controlen esta intromisión, los cuales se ven reflejados en la hemolinfa, que es el principal órgano de comunicación en el cuerpo del insecto.

Se ha visto que la infección con parásitos flagelados es controlada dentro de los insectos por lectinas, proteínas que pueden aglutinar células y que se unen a residuos de azúcar presentes en la superficie de la membrana. Las lectinas de los insectos están presentes en diferentes tejidos y han demostrado tener actividad de opsoninas que facilitan la fagocitosis por parte de los hemocitos a moléculas extrañas al cuerpo (Mello *et al.* 1999, Boulanger *et al.* 2006). En *Rhodnius prolixus* se identificó una lectina de la hemolinfa de 40kDa que interacciona con tripanosomas, promoviendo la unión de éstos con los hemocitos y evita su eliminación por parte del sistema inmune (Ratcliffe *et al.* 1996, Mello *et al.* 1999). Sin embargo, esta lectina no se purificó de insectos infectados con *T. cruzi*, pero sí se probó *in vitro* en el parásito y con *T. rangeli*, en donde se observó que promovía la unión de hemocitos con estos parásitos lo que permitía la sobrevivencia en la hemolinfa pero promovía la eliminación de estadios específicos de *T. rangeli* que debían estar presentes en este fluido, además presentó actividad de tirosín

cinasa (Mello *et al.* 1999). Con todo esto se observó que había grandes diferencias entre esta lectina de triatomíneos en comparación con las de otros insectos portadores de tripanosomas, en donde estas proteínas son responsables de la eliminación de los parásitos. En el presente trabajo se observaron algunas diferencias en esta área de peso molecular, 40kDa, pero estos cambios fueron de proteínas que aparecían o sólo estaban presentes en los insectos control, en donde tenemos una proteína de 38kDa que desaparece de los insectos infectados al día 31 p.i. y que se mantiene constante en los insectos control. También observamos que una banda de 45kDa se divide en dos bandas con el paso del tiempo, lo que sucede en los dos grupos de insectos. No obstante, tenemos bandas de proteínas en ese peso molecular que pudieran corresponder a la lectina encontrada en *R. prolixus*, pero sería de esperarse que los insectos infectados presentaran una sobreexpresión de ésta, que podría ser utilizada para permitir el establecimiento del parásito. Sin embargo, debemos recordar que no sólo es una proteína la que interacciona la que está implicada en esta relación, sino que es todo un sistema complejo que ha permitido el establecimiento de este *T. cruzi* en los triatomíneos.

En un trabajo en el que se probaron tres diferentes cepas de *T. cruzi* interaccionando en el intestino y hemolinfa de los insectos, se encontró que los carbohidratos presentes en la superficie de los parásitos eran importantes para que la infección se pudiera establecer, tanto en el intestino como en la hemolinfa, en donde naturalmente los parásitos no se encuentran (Mello *et al.* 1996). Esto de forma indirecta relaciona las lectinas con el éxito o fracaso de la infección con *T. cruzi* en sus insectos vectores. En este trabajo se encontraron glicoproteínas en los insectos infectados en un amplio rango de pesos moleculares; se sabe que las lectinas son proteínas que contienen azúcares, por lo que podríamos esperar que algunas de estas proteínas glicosiladas que se observan en los insectos infectados puedan ser lectinas, que están facilitando la estancia de *T. cruzi* en el insecto, lo que se tendría que corroborar al hacer la comparación de los insectos y no infectados.

Uno de los sistemas de defensa presentes en los insectos son los péptidos antimicrobianos (AMP), que son moléculas que reconocen un amplio rango de microorganismos y sirven como señal para que éstos sean eliminados (Paskewitz & Christensen 1996). Hay pocos reportes para este tipo de péptidos en insectos triatomíneos, existe uno en donde se describe una defensina, que se expresa durante una infección bacteriana en el cuerpo gordo y el intestino (López *et al.* 2003). Los AMP son de pesos moleculares bajos y es por eso que el análisis para detectar proteínas de pesos moleculares bajos era importante, ya estas moléculas podrían jugar un papel crucial para el establecimiento de los parásitos en los vectores.

Los principales AMP que se han descrito hasta el momento son las dipterocinas, attacinas (20kDa), cecropinas (4kDa), lisosimas de tipo C (14-17kDa) y defensinas (4kDa), los cuales están implicados principalmente en las infecciones bacterianas o por hongos (Paskewitz & Christensen 1996). Algunas teorías sugieren que la forma de transmisión de *T. cruzi* podría ser una forma de evitar el sistema inmune de los insectos, el cual se encuentra en la hemolinfa (López *et al.* 2003), lo que se corrobora con el hecho de que los parásitos no pueden sobrevivir en la hemolinfa por más de un día, en la mayoría de las cepas (Mello *et al.* 1996). Con los análisis de los geles de tricina, encontramos diferencias importantes entre los insectos infectados en áreas de bajo peso molecular, teniendo así un aumento en la expresión en una banda de proteínas de 13kDa en el día 0 de los insectos infectados que disminuyó a los siguientes días, también encontramos un péptido de 6-5kDa que se presentó

abundantemente en éstos durante todos los días analizados, y un péptido más de 4kDa que apareció y aumentó su expresión los días 31 y 41 p.i. Nuestros resultados sugieren que estos péptidos podrían ser AMP debido a que se encuentran en el rango de pesos moleculares reportados para otros insectos. La presencia de estos péptidos podría estar relacionada a cambios en los parásitos e incluso en la densidad de su población o señales que se producen en el intestino. Boulanger y cols. (2006) mencionan que los AMP se expresan en vectores de tripanosomátidos a diferentes tiempos después de ingeridos los parásitos, lo que se puede relacionar con los cambios morfológicos que sufren dentro del insecto. En los vectores de *T. cruzi*, éste completa su ciclo de vida de 15 a 21 días después de ser ingeridos (Azambuja *et al.* 2005b, Garcia *et. al.* 2007), siendo para estos días cuando se pueden observar los tripomastigotes metacíclicos en las heces del vector. Nuestra cinética contempla los días 10 y 17 post-infección, a estos días cada individuo de los grupos de insectos infectados fueron revisados para verificar que el parásito haya completado su paso por el tracto digestivo del vector, por lo que un experimento en donde se monitoreen las proteínas de bajo peso molecular en los primeros días de infección reflejaría si los cambios en los estadios inducen cambios o aumento en los AMP.

Uno de los cambios más importantes que observamos fue el aumento en la cantidad de proteínas que se expresaron en los insectos control al día 41 de la infección. En estos insectos el tiempo en el que se realiza la ecdisis para pasar de un estadio a otro depende en gran medida de la ingesta de sangre, cuando los insectos se alimentan hasta saciarse pueden comenzar los cambios necesarios para que el insecto pase al siguiente estadio de desarrollo (Dujardin *et. al.* 2002). Nosotros tomamos ninfas de 5º estadio que tenían pocos días de haber pasado a ese estadio, por lo que estarían en esta etapa de su desarrollo durante algún tiempo, la cinética de infección que realizamos duró 40 días, suficiente para que los insectos pudieran pasar a adultos, sin embargo ninguno realizó el cambio. El aumento en la cantidad de proteínas al día 41 de los insectos control podría reflejar los cambios que se estaban generando en insecto para pasar a adulto. El cambio de ninfas a adultos es el cambio más importante que sucede en los insectos, ya que es en esta transición en donde se preparan para desarrollarse los órganos sexuales y las alas, caracteres morfológicos ausentes en los estadios ninfales. Una limitante para identificar proteínas que estén presentes durante el cambio de estadio, es que no hay trabajos en donde se describan este tipo de proteínas en los insectos triatominos. Los resultados que obtuvimos podrían relacionarse con el supuesto de que los insectos no infectados pasan al estadio siguiente antes que los insectos infectados, debido a que podríamos eliminar el factor de la alimentación, ya que ambos grupos se alimentaron el mismo tiempo, los mismos días y de los mismos animales. Esto se podría corroborar al realizar experimentos con una población mayor y continuar la cinética hasta que los insectos pasen al siguiente estadio.

En este trabajo observamos que el parásito *T. cruzi* afecta de manera indirecta el sistema circulatorio de los insectos vectores, lo que podría estar relaciona con componentes del sistema inmune del insecto, por competencia por los nutrientes o mecanismos que restauren el equilibrio del sistema cuando el insecto se encuentra parasitado.

IX. Conclusiones

- Encontramos diferencias en la expresión de proteínas de la hemolinfa de ninfas de 5º estadio de *T. pallidipennis* infectados con *T. cruzi* e insectos no infectados, principalmente en el área de bajos pesos moleculares.
- Al día 41 en los insectos no infectados se observó un aumento en la cantidad de proteínas y un cambio en el patrón proteico general en comparación con los insectos infectados.
- Las proteínas de mayor abundancia en la hemolinfa no presentaron cambios significativos por la presencia del parásito.
- Se produjeron anticuerpos que reconocen proteínas de la hemolinfa de diferentes pesos moleculares, algunas de éstas proteínas presentan cambios en su expresión entre insectos infectados y no infectados, principalmente hacia el día 41.
- Se encontraron proteínas glicosiladas con glucosa, manosa y N-acetil D-galactosamina de altos pesos moleculares hasta 37kDa y tres bandas por debajo de los 19kDa.

X. Perspectivas

- Identificar por secuenciación las proteínas contra las que se realizaron los anticuerpos.
- Analizar los cambios en las proteínas cuando la infección de *T. cruzi* no se establece en el intestino.
- Analizar la concentración de proteínas de almacén de nutrientes en la hemolinfa durante más tiempo, en insectos infectados y no infectados

XI.Referencias

1. Azambuja P., D. Feder, C.B. Mello, S.A.O. Gomes, E.S. Garcia. 1999. Immunity in *Rhodnius prolixus*: Trypanosomatid-vector interactions. *Memories Institute Oswaldo Cruz* 94 (Supl. I): 219-222.
2. Azambuja P., E.S. Garcia, N.A. Ratcliffe. 2005a. Gut microbiota and parasite transmission by insect vectors. *Trends in Parasitology* 21:568-572.
3. Azambuja P., E.S. Garcia, N.A. Ratcliffe. 2005b. Towards and understanding of the interactions of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* within the reduviid insect host *Rhodnius prolixus*. *Annals of the Brazilian Academic of Sciences* 77 (3): 397-404.
4. Beard, C.B., E.M. Dotson, P.M. Pennington, S. Eichler, C. Cordon Rosales, R.V. Darvasula. 2001. Bacterial symbiosis and paratransgenic control of vector-borne Chagas disease. *International Journal of Parasitology* 31:621-627.
5. Botto-Mahan, C., P.E. Cattán, R. Medel. 2006. Chagas Disease parasite induces behavioral changes in the kissing bug *Mepraia spinolai*. *Acta Tropica* 98:219-223.
6. Botto-Mahan, C., C.G. Ossa, R. Medel. 2008. Direct and indirect pathways of fitness-impact in a protozoan-infected kissing bug. *Physiological Entomology* 33: 25-30.
7. Boulanger N., P. Bulet, C. Lowenberger. 2006. Antimicrobial peptides in the interactions between insects and flagellate parasites. *Trends in Parasitology* 22:262-268.
8. Buscaglia, C. A., J.M. Di Noia, 2003. *Trypanosoma cruzi* clonal diversity and the epidemiology of Chagas' disease. *Microbes and infections* 5: 419-427.
9. Busvine J. R. 1975. *Arthropod Vectors of Disease* The Camelot Presss Ltd, Southampton. U.K.
10. Carcavallo R. U., J.E. Rabinovich and R.J. Tonn. 1985. Factores biológicos y ecológicos en la enfermedad de Chagas. Tomo I. Centro Panamericano de Ecología y Salud. Organización Panamericana de la Salud. República de Argentina.
11. Chinzei Y., C. Azumi, K. Miura, H. Matsuoka, K. Ando. 1994. Changes in hemolymph proteins and their synthetic activities during development and engorgement, and after juvenile hormone treatment in the kissing bug, *Rhodnius prolixus*. *Journal of insect Physiology* 40:491-499.
12. Dodge G.R., R. Heimer. 2001. Proteoglycans analyzed by composite gel electrophoresis and immunoblotting. En *Proteoglycan protocols*. Iozzo R.V. (Ed). *Methods in Molecular Biology* Vol 171. Humana Press. New Jersey, U.S.A.

13. Dujardin J-P., J. Schofield y F. Panzera. 2002. Los vectores de la Enfermedad de Chagas. Academie Royale des Sciences d'Outre-Mer. Bélgica.
14. Elliot S.L., F.R. Adler, M.W. Sabelis. 2003. How virulent should a parasite be to its vector?. *Ecology* 84: 2564-2574.
15. Enger K. S., R. Ordoñez, M.L. Wilson and J.M. Ramsey. 2004. Evaluation of risk factors for rural infestation by *Triatoma pallidipennis* (Hemiptera: *Triatominae*), a mexican vector of Chagas disease. *Journal of Medical Entomology* 41: 760-767.
16. García E.S., N.A. Ratcliffe, M.M Whitten, M.S. González, P. Azambuja. 2007. Exploring the role of insect host factors on the dynamics of *Trypanosoma cruzi-Rhodnius prolixus* interactions. *Journal of Insect Physiology* 53: 11-21.
17. Garcia E.S., Zambajua P. (1991) Development and interactions of *Trypanosoma cruzi* inside the vector. *Parasitology Today* 7: 240-244.
18. Gascon, J., C. Bern, M.J. Pinaz. 2010. Chagas disease in Spain, the Unites States and other non-endemic countries. *Acta tropica* 115: 22-27.
19. Grayson M. ed. 2010. Chagas Disease. *Nature Outlook*
20. González Cappa S., Durante de Isola E. 1994. Vectores transmisores triatominos, "vinchucas", En Storino R. y J. Milei (Ed.). *Enfermedad de Chagas*. Morsby Doyma Argentina, Buenos Aires.
21. Grillo L.A.M., E.G. Pontess, K.C. Gondim. 2003. Lipophorin interaction with the midgut of *Rhodnius prolixus*: characterization and changes in binding capacity. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 33:429-438.
22. Gullan P.J. 2005. *The insects: an outline of entomology*. Blackwell. E.U.A.
23. Guzmán-Bracho, C. 2001. Epidemiology of Chagas disease in Mexico: an update. *Trends in Parasitology* 17: 372-376.
24. Hu Changyun, S. Aksoy. 2006. Innate immune responses regulate trypanosome parasite infection of tsetse fly *Glossina morsitans morsitans*. *Molecular Microbiology* 60:1194-1204.
25. Kanost M.R., J.K. Kawooya, J.H. Law, R.O. Ryan, M.C.V. Heusden, R. Ziegler. 1990. Insect hemolymph proteins. *Advances in insect Physiology* 22: 299-396.
26. Laemmli U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
27. Lent H. & Wygodzinsky. 1979. Revision of the *Triatominae* (Hemiptera: Reduviidae) and their significance as vector of Chagas Disease. *Bolletín of the American Museum of Natural History* 163:142-520.

28. López L., G. Morales, R. Ursic, M. Wolff, C. Lowenberger. 2003. Isolation and characterization of a novel insect defensin from *Rhodnius prolixus*, a vector of Chagas disease. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 33: 439-447.
29. Magallón Gastélum E., F. Lozano Kasten, M.S. Gutiérrez, A. Flores Pérez, B. Sánchez, B. Espinoza, M.F. Bosseno, S.F. Brenière. 2006. Epidemiological risk for *Trypanosoma cruzi* transmission by species of Phyllosoma complex in the occidental part of Mexico. *Acta Tropica* 97: 331-338.
30. Martínez F. H., G.C. Villalobos, A.M. Cevallos, P.D.I. Torre, J.P. Laclette, R. Alejandro Aguilar, B. Espinoza. 2006. Taxonomic study of the Phyllosoma complex and other *Triatomianae* (Insecta: Hemiptera: Reduviidae) species of epidemiological importance in the transmission of Chagas disease: using ITS-2 and mtCytB sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 41:209-221.
31. Martínez Hernández F., J. A. Martínez Ibarra, S. Catalá, G. Villalobos, P. De la Torre, J.P. Laclette, R. Alejandro Aguilar, B. Espinoza. 2010. Natural crossbreeding between sympatric species of the Phyllosoma complex (Insecta: Hemiptera: Reduviidae) indicate the existence of only one species with morphologic and genetic variations. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 82: 74-82.
32. Mead G.P., N.A. Ratcliffe, L.R. Renwrautz. 1986. The separation of insect hemocyte types on percoll gradients; methodology and problems. *Journal of Insect Physiology* 32: 167-177.
33. Mello C.B., P. Azambuja, E.S. Garcia, N.A. Ratcliffe. 1996. Differential *in vivo* and *in vitro* or three starins of *Trypanosoma cruzi* in the gut and hemolymph of *Rhodnius prolixus*. *Experimental Parasitology* 82:112-121.
34. Mello C.B., Y. Nigam, E.S. Garcia, P. Azambuja, R.P. Newton, N.A. Ratcliffe. 1999. Studies on hemolymph lectin isolated from *Rhodnius prolixus* and its interaction with *Trypanosoma rangeli*. *Experimental Parasitology* 91:289-296.
35. Monteón V.M., R. Furuzawa Carballada, A. Alejandro Aguilar, J. Aranda Frausto, J. Rosales Encina, P. Reyes. 1996. American tripanosomiasis: in situ and generalized features of parasitism and inflammation kinetics in murine model. *Experimental Parasitology* 83:267-274.
36. Nation J.L. 2008. *Insect Physiology and Biochemistry*. CRC Press. Florida, U.S.A
37. Noireau, F. Diosque, P. Jansen, A.M. 2009. *Trypanosoma cruzi*: adaptation to its vectors and its hosts. *Sciences* 40: 26
38. PAHO (Organización Panamericana de la Salud). 2006. Estimación cuantitativa de la enfermedad de Chagas en las Américas.
39. Paskewitz S.M., B.M. Christensen. 1996. Immune responses of vectors. En Beaty B.

and W.C. Marquat (Ed.) The Biology of Disease Vectors.

40. Rassi Jr, A., Rassi, A., J.A. Marin-Neto. 2010. Chagas disease. Lancet. 375: 1388-1402.
41. Ratcliffe, N.A., Y. Nigam, C.B. Mello, E.S. Garcia, P. Azambuja. 1996. *Trypanosoma cruzi* and erythrocyte agglutinins: a comparative study of occurrence and properties in the gut and hemolymph of *Rhodnius prolixus*. Experimental parasitology 83: 83-93.
42. Rockstein, M. Ed. 1973. The physiology of insecta. Vol. V. 2a ed. Nueva York.
43. Sambrook J., E.F. Fritsch, T. Maniatis. 1989. Molecular cloning, a laboratory manual. Cold spring Harbor Laboratory Press. U.S.A.
44. Santos-Bush CA. 1979. American tripanosomiasis: Chagas' disease. International Review Experimental Parasitology 19: 63-100.
45. Schägger H. 2006. Tricine-SDS-PAGE. Nature Protocols 1: 16-22.
46. Schägger H., G. Von Jagow. 1987. Tricine-Dodecyl Sulfate-Polyacrilamide gel electrophoresis for separation of proteins in the range from 1 to 100kDa. Analytical Biochemistry 166: 368-379.
47. Schaub G.A. 1989. Does *Trypanosoma cruzi* stress its vectors?. Parasitology Today 5:185-188.
48. Schmunis, G.A., Z.E. Yadon. 2010. Chagas disease: A Latin American health problem becoming a world health problem. Acta Tropica 115: 14-21.
49. Service M. W. 1980. A Guide to Medical Entomology (Macmillan tropical and sub-tropical medical texts). Macmillan International College Editions. Hong kong.
50. Tay Zavala J., J.T. Sánchez Vega, L. Calderón Romero, R. Romero Cabello, D. Ruíz Sánchez. 2008. Estudios del ciclo biológico de *Triatoma pallidipennis* (Stat 1872) y otros aspectos de su biología. Revista de la Facultad de Medicina, UNAM 51:56-59.
51. Vidal-Acosta V., S. Ibañez-Bernal, C. Martínez-Campos. 2000. Infección natural de chinches *Triatominae* con *Trypanosoma cruzi* asociadas a la vivienda humana en México. Salud Pública de México 42: 496-503.
52. World Health Organization (WHO). 2002. Control of Chagas Disease. WHO Technical Report series 905.
53. Yassine H., M.A. Osta. 2010. *Anopheles gambiae* innate immunity. Cellular Microbiology 12: 1-9.
54. Zárate L. G., R.J. Zárate. 1985. A checklist of the *Triatominae* (Hemiptera: Reduviidae) of Mexico. International Journal of Entomology 27: 102-127.

