



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO

UNAM
POSGRADO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS
Instituto de Investigaciones Biomédicas

Estudio de moléculas del sistema inmune de
Triatoma pallidipennis infectado con
Trypanosoma cruzi

T E S I S

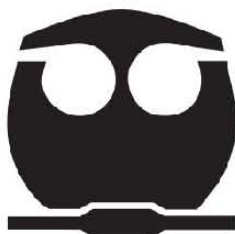
QUE PARA OPTAR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

P R E S E N T A:

**WENDY BEATRIZ ESPINOSA DE
AQUINO**

Tutor: Dra. BERTHA ESPINOZA GUTIÉRREZ
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM



MÉXICO, D. F.

Noviembre 2012



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

Of. No. PMDCB/628/2012

BIÓL. WENDY BEATRIZ ESPINOSA DE AQUINO
Alumno (a) de la Maestría en Ciencias Bioquímicas
P r e s e n t e

Los miembros del Subcomité Académico, en reunión ordinaria del día 30 de Julio del presente año, conocieron su solicitud de ASIGNACIÓN de JURADO DE EXAMEN para optar por el grado de **MAESTRA EN CIENCIAS (BIOQUIMICA)**, con la tesis titulada "**Estudio de moléculas del sistema inmune de *Triatoma pallidipennis* infectado con *Trypanosoma cruzi***", dirigida por la Dra. Bertha Espinoza Gutiérrez.

De su análisis se acordó ratificar al jurado asignado:

PRESIDENTE	Dr. Ruy Pérez Montfort
VOCAL	Dr. Humberto Lanz Mendoza
VOCAL	Dr. Julio César Carrero Sánchez
VOCAL	Dr. Ricardo Alejandro Aguilar
SECRETARIO	Dra. Clara Inés Espitia Pinzón

Sin otro particular por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 7 de Agosto de 2012.
EL COORDINADOR DE ENTIDAD


DR. ROGELIO RODRÍGUEZ SOTRES

C.c.p. Archivo


RRS[†]/gg

A LOS MIEMBROS DE
JURADO DE EXAMEN

Por medio del presente manifiesto que he revisado el texto que será sometido a su consideración del(a) alumno (a) de Maestría en Ciencias Bioquímicas **BIÓL. WENDY BEATRIZ ESPINOSA DE AQUINO** titulado:

"Estudio de moléculas del sistema inmune de *Triatoma pallidipennis* infectado con *Trypanosoma cruzi*"

ATENTAMENTE


DRA. BÉRTHA ESPINOZA GUTIÉRREZ
Tutor Académico

AGRADECIMIENTOS

La presente tesis de maestría fue dirigida por la Dra. Bertha Espinoza Gutiérrez en el laboratorio de Tripanosomiasis Americana en el Departamento de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El trabajo fue realizado con insectos proporcionados por el Dr. Ricardo Alejandro Aguilar de la colonia del laboratorio de Entomología del Departamento de Parasitología la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, del Instituto Politécnico Nacional

Agradezco la colaboración del M. en C. Ignacio Martínez por su apoyo técnico en la infección de ratones con *Trypanosoma cruzi*, los cuales fueron empleados en este trabajo.

Se reconoce la colaboración del Dr. Alejandro Córdoba Aguilar y el M. en C. Jesús Guillermo Jiménez Cortés del Laboratorio de Ecología de la Conducta de Artrópodos del Instituto de Ecología, UNAM, en la estandarización de las condiciones de medición de PO y NO en la hemolinfa de los insectos.

Se agradece la asesoría técnica del Dr. Hugo Aguilar, la Dra. María Meneses y la Candidata a Dr. Deyanira Pérez Morales en los aspectos de biología molecular.

Durante los estudios de Maestría goce de una beca de CONACyT para la realización del presente trabajo.

Índice

ABREVIATURAS

RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN.....	2
1.1. <i>Trypanosoma cruzi</i>	3
1.1.1. Ciclo de vida.....	4
1.2. Insectos.....	5
1.2.1. Distribución.....	6
1.2.2. Ciclo de vida.....	8
1.2.3. Fisiología.....	9
1.2.3.1. Alimentación, digestión, nutrición y excreción.....	9
1.2.3.2. Sistema circulatorio.....	12
1.2.3.3. Cuerpo graso.....	13
1.2.3.4. Sistema inmune.....	14
2. ANTECEDENTES.....	18
3. JUSTIFICACIÓN.....	21
4. HIPÓTESIS.....	21
5. OBJETIVOS.....	22
6. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	23
7. MATERIAL Y MÉTODOS.....	24
7.1. Insectos.....	24
7.2. Ratones e infección.....	24
7.3. Hemolinfa.....	25
7.3.1 Extracción.....	25
7.3.2. Medición de NO.....	26
7.3.3. Producción de melanina.....	26
7.4. Expresión de AMPs.....	27
7.4.1. Extracción de órganos.....	27

7.4.2. Extracción de RNA.....	27
7.4.3. Producción de cDNA.....	28
7.4.4. Diseño de iniciadores.....	29
7.4.5. Reacción de PCR.....	30
7.5. Análisis Estadísticos.....	31
8. RESULTADOS.....	32
8.1. Infección de insectos con <i>T. cruzi</i>	32
8.2. Análisis de la hemolinfa.....	35
8.2.1. Medición del sistema de melanización.....	35
8.2.2. Concentración de NO en la hemolinfa.....	42
8.3. Expresión de AMPs.....	44
9. DISCUSIÓN.....	55
9.1. Melanización.....	56
9.2. Concentración de NO.....	59
9.3. Expresión de AMPs.....	60
10. CONCLUSIONES.....	66
11. PERSPECTIVAS.....	67
12. REFERENCIAS.....	68

ABREVIATURAS

AMPs	Péptidos Antimicrobianos
BLAST	Herramienta Básica de Búsquedas de Alineamientos Locales
BSA	Albúmina sérica bovina
cDNA	Ácido Desoxirribonucleico complementario
d.p.a.	Días post alimentación
DEPC	Dietilpirocarbonato
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxiribonucleotido trifosfato
EDTA	Ácido Etilendiamino Tetraacético
h.p.a.	Horas post alimentación
mRNA	Ácido Ribonucleico mensajero
NO	Óxido Nítrico
pb	Pares de bases
PBS	Amortiguador de Fosfato de Sodio
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PO	Enzima Fenoloxidasa
RNA	Ácido Ribonucleico
RT	Reversotranscripción
RT-PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa acoplada a Transcriptasa Reversa
SD	Desviación Estándar
TAE	Tris-acetato
TBE	Tris-borato

*”El tiempo es el mejor autor,
siempre encuentra el final perfecto”*

Charles Chaplin

RESUMEN

Triatoma pallidipennis es un vector de importancia médica debido a que es uno de los principales vectores transmisores del protozoo flagelado *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico de la Enfermedad de Chagas. En las enfermedades transmitidas por vectores, los parásitos tienen un sitio específico de desarrollo dentro de los insectos. Este fenómeno ha motivado el estudio de la fisiología y el desarrollo del parásito, además de las interacciones biológicas, bioquímicas y ecológicas entre los insectos y parásitos.

El presente trabajo se enfocó en el estudio de algunas moléculas del sistema inmune, tales como los péptidos antimicrobianos como indicadores locales y la actividad del sistema de melanización y la concentración de óxido nítrico como componentes sistémicos de respuesta inmunológica contra *T. cruzi* en *T. pallidipennis*. Se observó un aumento en la melanización de la hemolinfa causada por la presencia del parásito 24 horas y 6 días después de la infección, en contraste con los insectos no infectados ($p > 0,05$), este aumento fue producido principalmente por la enzima fenoloxidasa. Por otra parte, en la hemolinfa no se encontraron diferencias en la concentración de óxido nítrico entre los insectos sin infectar e infectados a diferentes días post alimentación. En cuanto a la expresión de péptidos antimicrobianos en los tejidos como el intestino medio y el cuerpo graso no observamos diferencias en la expresión de genes tales como *defensina 1* y *4* en los insectos infectados. También la expresión de *defensina 3* en el cuerpo graso e el intestino medio posterior fue el mismo entre los insectos no infectados e infectados, en cambio en el estómago o intestino medio anterior de vectores infectados se observó un aumento en su expresión a los 10 días post infección, la cual desapareció 5 días después. Otro péptido antimicrobiano estudiado fue la *lisozima 1*, que se ha asociado a la respuesta inmune contra bacterias. Este péptido no mostró diferencias en su expresión en el intestino de los insectos infectados y no infectados. Sin embargo en el cuerpo graso, este gen únicamente se expresó en los insectos infectados a los 10 y 15 días post infección. En conclusión en el presente estudio se observó que el patrón de expresión de las moléculas analizadas del sistema inmune indica que se genera una respuesta inmune específica a *T. cruzi* en el vector *T. pallidipennis* diferenciada por órganos.

1. INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas, también conocida como Tripanosomiasis Americana, es una zoonosis endémica de América Latina y se considera 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 las fronteras del continente y se pueden encontrar casos en lugares tan alejados como Australia o Japón (Buscaglia y Di Noria, 2003; Gascon *et al.*, 2010).

De acuerdo con 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% 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 41,200 eran 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).

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 y Di Noria 2003, Noireau *et al.*, 2009).

1.1. *Trypanosoma cruzi*

T. cruzi pertenece al *phylum* Sarcomastigophora, *subphylum* Mastigophora, 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* 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. Este parásito se encuentra dentro del subgénero *Schizotrypanum* el cual incluye a los tripanosomas que se multiplican en los vertebrados de manera intracelular (WHO, 2002). 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).

Este parásito puede ser transmitido a los humanos por diferentes vías, principalmente por los insectos hematófagos reduviideos de la subfamilia Triatominae. También existe la transmisión por vía oral, la cual contempla a los insectos vectores de forma indirecta y consiste en ingerir alimentos contaminados por heces o insectos completos (Carcavallo *et al.*, 1985). Por otra parte, las vías de infección no entomológicas pueden presentarse en áreas de mejor calidad de vida o regiones no endémicas, 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).

1.1.1. Ciclo de vida

T. cruzi presenta diferentes estadios de desarrollo en insectos y mamíferos (Figura 1.1): tripomastigote metacíclico, tripomastigotes sanguíneos, amastigote y epimastigote, que se identifican por la posición del cinetoplasto con respecto al núcleo (Santos-Bush 1979; Garcia *et al.*, 2007). El ciclo comienza cuando el insecto vector se alimenta de sangre contaminada con tripomastigotes sanguíneos, los cuales pasan al intestino y se transforman a epimastigotes que se adhieren a la membrana perimicrovellosa del intestino medio y posterior y comienzan a multiplicarse por fisión binaria. Cuando aumenta la población algunos pasan al recto, que es la parte terminal del intestino, en donde se anclan y sufren una transformación a tripomastigotes metacíclicos, durante un proceso denominado metaciclogénesis; éstos salen en heces y orina e infectan a los huéspedes vertebrados (Buscaglia y 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 mamífero el parásito puede invadir cualquier tipo de célula nucleada, con preferencia por células cardiacas, macrófagos, neuronas y células gliales (González-Cappa and Durante de Isola, 1994). Dentro de las células se transforma 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 pasar al torrente sanguíneo, donde podrán ser tomados nuevamente por los vectores.

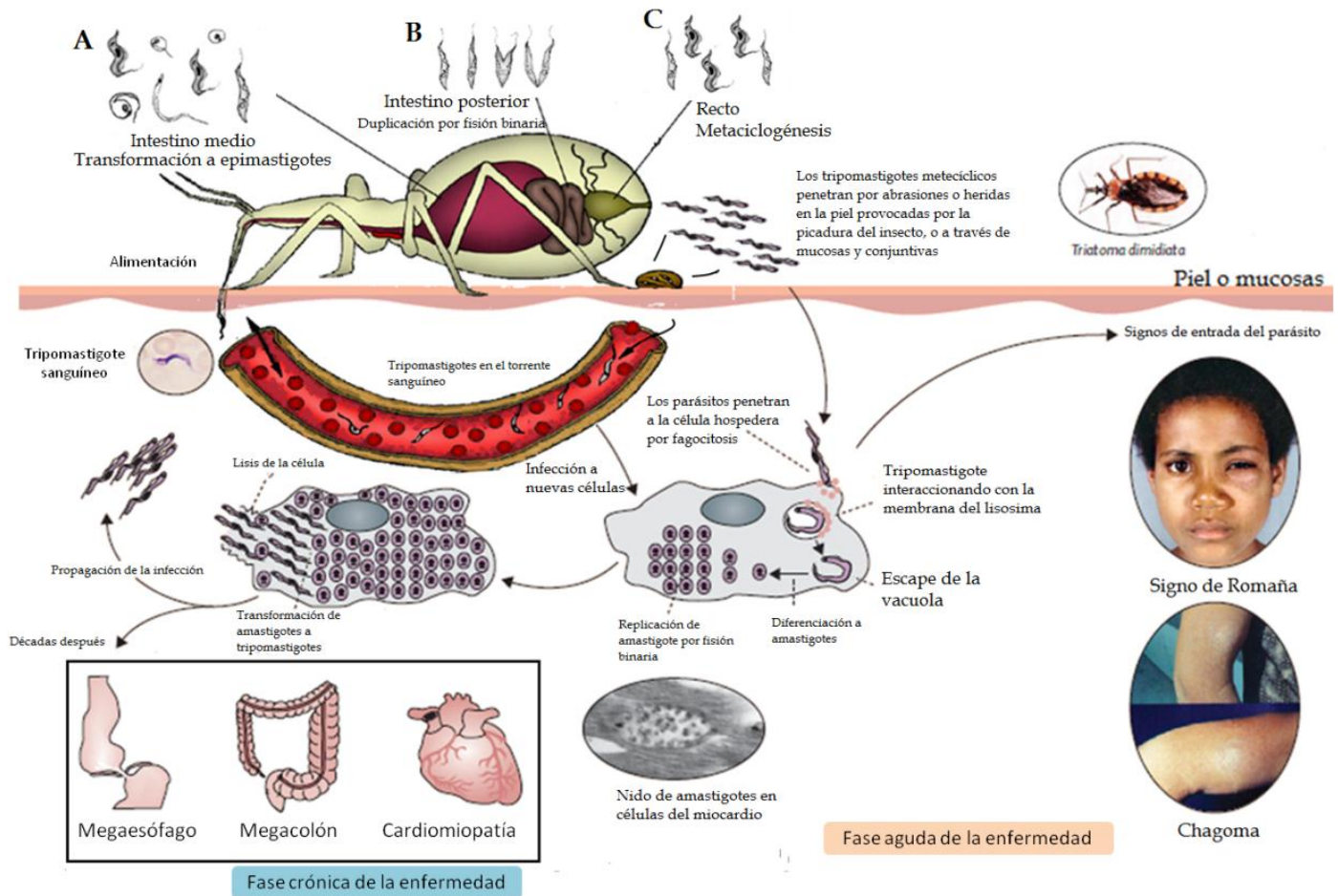


Figura 1.1. El ciclo de vida del parásito requiere de un huésped vertebrado y un insecto vector. Comienza cuando un insecto no infectado se alimenta de un mamífero parasitado con *T. cruzi*, ingiere los tripomastigotes de la sangre que pasarán a su estómago (A) y se transformarán a epimastigotes (B) donde comenzarán a multiplicarse. Finalmente llegarán al recto del insecto, donde ocurrirá la metacicloogénesis (C) que transformará a los epimastigotes en tripomastigotes metacíclicos que son la fase infectiva para los mamíferos. Dentro de éstos últimos, 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. Insectos

Los insectos del 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*, agente causal de la enfermedad (WHO, 2002; Dujardin *et al.*, 2002; García *et al.*, 2007). Aunque se han infectado experimentalmente una variedad de artrópodos con *T. cruzi*, sólo los triatominos son epidemiológicamente importantes para la transmisión de la enfermedad (Lent and Wygodzinsky, 1979).

1.2.1. Distribución

El área de distribución de los triatominos está entre los paralelos 45°S y 40°N. 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 especie 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 1.2). Por su parte, en México se conocen más de 32 especies de vectores distribuidas en siete géneros (*Dipetalogaster*, *Eratyrus*, *Paratriatoma*, *Pastrongylus*, *Belminus*, *Triatoma* y *Rhodnius*). El 67% de éstas se han encontrado infectadas con *T. cruzi* (Vidal-Acosta, 2000; Martínez *et al.*, 2006; Rassi Jr. *et al.*, 2010).

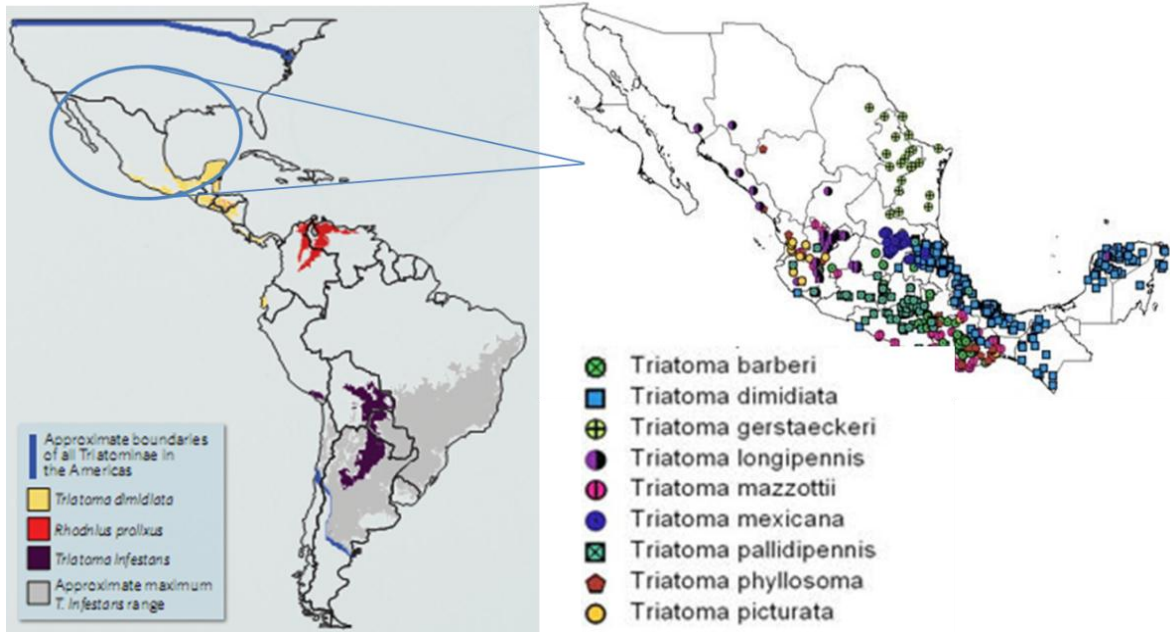


Figura 1.2. Distribución de los principales vectores de *T. cruzi* en el continente. En el mapa se ejemplifica que en México existen 9 especies de importancia médica, mientras que en el resto de Latinoamérica hay únicamente 3 especies de importancia médica. Modificado de Chagnon y Grayson 2010.

Entre las especies endémicas reportadas en México se encuentran: *T. phyllosoma*, *T. picturata*, *T. pallidipennis* (Figura 1.3.), *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 que llegan a alcanzar tasas de infección de hasta 50-60% en estados como Jalisco y Nayarit (Vidal-Acosta, 2000; Martínez-Ibarra *et al.*, 2001; Guzmán-Bracho, 2001; Dujardin *et al.*, 2002; Martínez *et al.*, 2006). En el sur del país *T. dimidiata* es el vector más importante de la enfermedad debido a su gran predominancia y distribución dentro de la región y altos indicadores entomológicos (Dumontiel *et al.*, 2002). *D. máxima* es el vector de mayor tamaño encontrado dentro del territorio nacional, se distribuye en Baja California Sur donde se han reportado tasas de infección con *T. cruzi* de 7% (Jiménez *et al.*, 2003).



Figura 1.3. Ejemplar adulto de *T. pallidipennis*, uno de los principales vectores de la región centro y oeste del país. Tomado de la Colección Nacional de insectos, Instituto de Biología, UNAM.

1.2.2. Ciclo de vida

Los triatominos presentan un desarrollo hemimetábolo, no sufre una metamorfosis completa al pasar al estadio adulto. Su ciclo de vida comprende el huevo, cinco estadios larvarios (conocidos como ninfas) y el imago. El desarrollo 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 coprofagia alimentándose de las heces de otros, con lo que podrían adquirir *T. cruzi* sin necesidad de alimentarse de un mamífero. La adaptación a la

hematofagia es la principal característica biológica de estos insectos, 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)

1.2.3. Fisiología

1.2.3.1. Alimentación, Digestión, Nutrición y Excreción

Los triatomíneos 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 liberan factores anticoagulantes en la saliva que le 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 triatomíneos 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 metacicloogénesis de *T. cruzi*, se reabsorben materiales necesarios y se acidifica el contenido con precipitados de ácido úrico y otros aniones orgánicos (Carcavallo *et al.*, 1985; Nation, 2008). Si los insectos no obtienen una comida abundante, serán necesarias varias comidas más para obtener los niveles necesarios de nutrientes y los

elementos de reserva para la formación de la nueva cutícula (Schaub, 2009). Algunas veces los parásitos flagelados pueden retrasar el proceso de muda aún después de una comida abundante (Schaub, 1989). Por lo tanto la duración de los diferentes estadios está determinada por el acceso al alimento, los parásitos que tenga el insecto, la especie y por la temperatura y la humedad relativa del ambiente (Schaub, 2009).

En los insectos hematófagos la sangre se almacena 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 se digiere por vez y las enzimas nunca se mezclan en su totalidad con el alimento ingerido, por lo que los triatominos pueden sobrevivir largos periodos en inanición (Rockstein, 1973; Carcavallo *et al.*, 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 se deben 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 (Figura 1.4). 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 *et al.*, 1985).

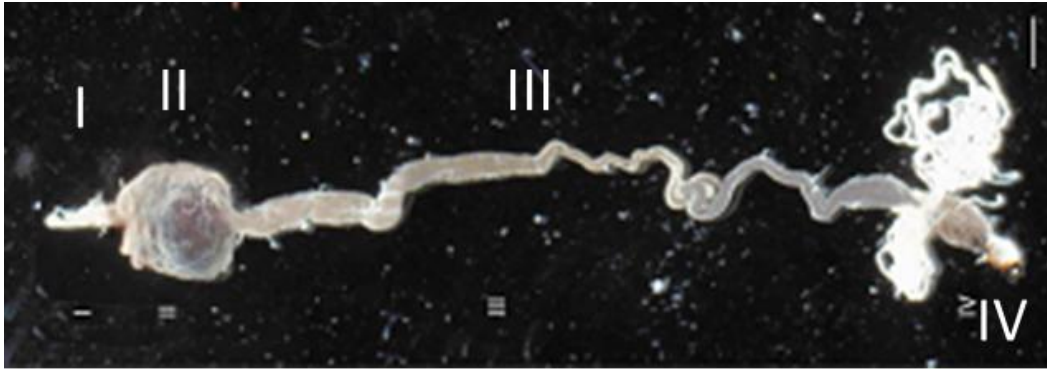


Figura 1.4. Regiones y funciones del tracto digestivo de Triatominos. I. Esófago. II. Estómago o intestino anterior: almacenamiento de la sangre, lisis de eritrocitos, remoción de agua, almacén de lípidos y desecho de iones. III. Intestino pequeño o intestino posterior: digestión. IV. Recto: absorción de nutrientes. Tomado de Kollien and Schaub 2000.

La alimentación con 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. Sin embargo, 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 (Nation, 2008). 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 *et al.*, 1985; Nation, 2008).

1.2.3.2. Sistema circulatorio

El fluido circulatorio de los insectos se llama 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. 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 que 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 trealosa, el azúcar más utilizado en los insectos para producir energía (Rockstein, 1973; Gullan, 2005; 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 están presentes en la hemolinfa son enzimas y proteínas con acción antibacterial, como las

lisozimas y defensinas que actúan como agentes protectores que modifican 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).

La hemolinfa también contiene células llamadas hemocitos 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

Estos componentes celulares de la hemolinfa están implicados en muchos de los procesos del sistema inmune (Gullan, 2005).

1.2.3.3. Cuerpo graso

El cuerpo graso es el principal órgano implicado en el metabolismo intermediario de los insectos. Es partícipe en múltiples funciones de biosíntesis y almacenaje de nutrientes. En este órgano se producen la mayoría de los metabolitos de la hemolinfa, lo que hace que esté interconectado con el resto de los órganos y se vea afectado por la fisiología del

insecto. Debido a esto puede considerarse como el análogo al hígado y el tejido adiposo en mamíferos (Van-Heusden, 1996).

Este tejido está localizado principalmente en el abdomen y usualmente está dividido en dos partes: la parte visceral, que rodea el intestino y la grasa periférica que se encuentra adyacente a los integumentos, en donde se almacenan lípidos y glucógeno. La estructura amorfa del cuerpo graso le permite adaptarse al sistema circulatorio abierto en donde ocurre la difusión y el transporte de los metabolitos (Van-Heusden, 1996; Nation, 2008).

Las células principales del cuerpo graso son los trofozoitos, usualmente llamados adipocitos, aunque pueden encontrarse otro tipo de células dependiendo del grupo de insectos. La ultraestructura del cuerpo graso varía de acuerdo al estadio, principalmente en insecto con metamorfosis completa (holometábolos), al igual que la concentración de DNA, debido a la poliploidia y politenia que en ocasiones presentan los insectos (Van-Heusden, 1996; Gullan, 2005).

1.2.3.4. Sistema inmune

La primera defensa de los insectos contra microorganismos es a través de la cutícula esclerotizada que recubre el cuerpo y una cutícula delgada más flexible que recubre las traqueas, parte del tracto reproductivo interno y el sistema digestivo (Nation, 2008). Cuando los microorganismos logran traspasar estas barreras los insectos montan rápidamente una respuesta inmune innata, la cual incluye mecanismos como:

- Fagocitosis de pequeños objetos y la encapsulación con capas de hemocitos para objetos grandes.

- Coagulación localizada de la hemolinfa en los sitios de entrada.
- Reacciones de melanización en la herida y alrededor de los objetos encapsulados.
- Síntesis de péptidos antimicrobianos.

La respuesta inmune innata de los insectos incluye tanto defensa celular como humoral. Los eventos celulares inician con el encuentro de las células con los organismos invasores, normalmente las células epiteliales adyacentes a la cutícula, los hemocitos en la hemolinfa, células del cuerpo graso y células epiteliales del intestino. Éstas responden rápidamente a la invasión secretando proteínas con patrones de reconocimiento que tienen una gran variedad de funciones, entre ellas promover la producción de péptidos antimicrobianos. Los hemocitos liberan agentes de coagulación en los sitios de la herida en la hemolinfa y profenoloxidasas. Este último es un precursor enzimático en la hemolinfa, que se activa y transforma a fenoloxidasa (PO), enzima que forma parte de un sistema que inicia la melanización y encapsulación de los objetos en la herida. La acción de este sistema sobre los compuestos fenólicos produce quinonas y compuestos reactivos de oxígeno y nitrógeno que son tóxicos para los microorganismos y para las células propias (Christensen *et al.*, 2005; Nation, 2008; Kanost and Gorman, 2008). Esta melanina encapsula a los parásitos, lo que implica la adhesión de hemocitos o proteínas, las cuales bloquearán la absorción de nutrientes provocando la muerte del parásito (Chen and Chen, 1995).

La respuesta humoral se considera como una elaboración de agentes de respuesta que se encuentran en la hemolinfa y que implica factores de reconocimiento molecular de patógenos (Nation, 2008). La mayoría de estas moléculas que forman parte de la respuesta

humoral son péptidos antimicrobianos (AMPs), los cuales se han nombrado de acuerdo al organismo o grupo en el que se encontraron.

Las dipterocinas es una súperfamilia que incluye attacinas, sarcotoxinas, apidaecinas e hymenoptaecinas. Este grupo puede tener pesos moleculares que van desde 4 kDa hasta 20 kDa. Otra gran familia de AMPs son las cecropinas, la cual incluye bactericinas, sarcotoxina I y ceratotoxina; sus pesos moleculares son más homogéneos (~4 kDa) y sus secuencias están muy conservadas entre diferentes grupos de insectos. Su modo de acción es formar poros en la membrana interna de la bacteria, ocasionando la lisis de ésta. Las defensinas son un grupo de péptidos que se había asociado a las que se encuentran en mamíferos, sin embargo se ha observado que difieren considerablemente en su estructura. Este grupo tiene pesos moleculares bajos, de 4 kDa y se ha encontrado en una amplia variedad de insectos, dípteros, coleópteros, himenópteros y odonatos. Finalmente, uno de los grupos que más se han estudiado son las lisozimas, moléculas de 14-17 kDa, las cuales se encuentran distribuidas ampliamente en la escala filogenética y se han clasificado en diversos grupos dependiendo del organismo en el que se encontraron, mamíferos (G), pollos (C) e invertebrados (I). Las lisozimas encontradas en insectos pertenecen al grupo de lisozimas C. Estas moléculas están asociadas a la infección con bacterias gram-positivas y se han encontrado expresadas diferencialmente en diferentes tejidos de los insectos (Paskewitz and Christensen, 1996).

Los AMPs tienen baja especificidad y actúan contra una gran cantidad de microorganismos. Éstos 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 and Christensen, 1996; López *et al.*, 2003).

Las células del cuerpo graso son la principal fuente de AMPs, sin embargo también participan hemocitos, células epiteliales del intestino y epidérmicas. En los insectos holometábolos (aquellos que sufren una metamorfosis completa para llegar al estadio adulto) los AMPs son producidos por el cuerpo graso y posteriormente liberados a la hemolinfa, en donde pueden difundir al resto de los órganos del insecto rápidamente; muchos de éstos son producidos constante y masivamente. En contraste, los insectos hemimetábolos (insectos cuyas fases larvarias y adultas se parecen entre sí y no sufren una transformación completa para completar su ciclo de vida) producen los AMPs en los hemocitos, principalmente (Bulet and Stöcklin, 2005).

Otro componente importante asociado a la respuesta inmune, entre otras funciones, es el óxido nítrico (NO), el cual puede funcionar como una molécula efectora o señal mensajera (Whitten *et al.*, 2007). El NO como señal activadora se ha asociado a respuestas antimicrobianas, antivirales y antiparasitarias en moluscos e insectos, actuando como una molécula citotóxica. La enzima óxido nítrico sintasa (NOS) se activa por las infecciones parasitarias en vectores invertebrados, como los mosquitos y caracoles y se ha asociado en el control de los parásitos y la capacidad vectorial (Luckhart *et al.*, 1998; Dimopoulos *et al.*, 1998). El NO también juega un papel importante en las vías de señalización del sistema inmune, en donde actúa como un activador de la producción de AMPs (Herrera-Ortíz *et al.*, 2011).

2. ANTECEDENTES

Los parásitos tienen sitios específicos para su desarrollo dentro de los vectores. 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, los parásitos sufren grandes cambios morfológicos y proteicos que sirven para interactuar con tejidos específicos esenciales para su sobrevivencia, desarrollo e infectividad en sus hospederos (Boulanger *et al.*, 2006, Busvine, 1975).

Se han realizado estudios sobre la fisiología, desarrollo e interacciones ecológicas entre los insectos y los parásitos que transmiten (Changyun and Aksoy, 2006, Yassine and Osta, 2010). Ésto se debe a la duda que existe si los parásitos producen alteraciones en sus vectores, qué tanto les pueden afectar, o 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*-Triatominae 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, sin embargo, existen un par de reportes que utilizan la hemolinfa para comparar las alteraciones que pudieran sufrir los insectos en presencia del parásito. Schaub (1989) mide la concentración de aminoácidos libres y observa cambios a los ocho días post-infección. Por su parte, en la tesis de licenciatura de Espinosa-De Aquino (2010) se describe el cambio en el perfil proteico de la hemolinfa de *T. pallidipennis* durante una cinética de infección con *T. cruzi*, y se observa la presencia de proteínas de bajo peso molecular únicamente en los insectos infectados a partir del día 3 post infección.

Un componente importante en la respuesta del sistema inmune a los parásitos son los AMPs. En el caso de este grupo de parásitos y la relación con sus vectores se han identificado defensinas, cecropinas, attacinas y díptericinas, que se inducen una semana después de la entrada de *T. brucei* en moscas del género *Glossina* (Boulanger *et al.*, 2006). Dentro de estos estudios se ha reportado que la cinética en los patrones de inducción de los AMP, seguida a la ingestión de los cinetoplástidos, 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).

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).

La expresión de lisozimas y defensinas en triatominos se ha encontrado en intestino y cuerpo graso, tanto en condiciones basales como en insectos retados con bacterias (Kollien *et al.*, 2003; Araújo *et al.*, 2006). Sin embargo, la respuesta a nivel de moléculas del sistema inmune cuando los triatominos se encuentran infectados con *T. cruzi* no se ha estudiado hasta el momento.

3. JUSTIFICACIÓN

En insectos, incluidos los transmisores de enfermedades, los AMPs, el NO y el sistema de melanización son componentes importantes de la respuesta inmune; éstos pueden ser inducidos por infecciones parasitarias y participar en la regulación del desarrollo del parásito en el insecto. Debido a que el éxito de las interacciones vector-parásito depende en parte de la respuesta inmune del vector, el estudio de estas moléculas proveerá de información básica sobre las interacciones que existen para lograr un equilibrio entre los insectos y los parásitos que transmiten, sin que éstos se vuelvan patógenos para el insecto.

4. HIPÓTESIS

Durante el establecimiento de *T. cruzi* en su vector se observará una expresión local y sistémica de moléculas del sistema inmune del insecto.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo General

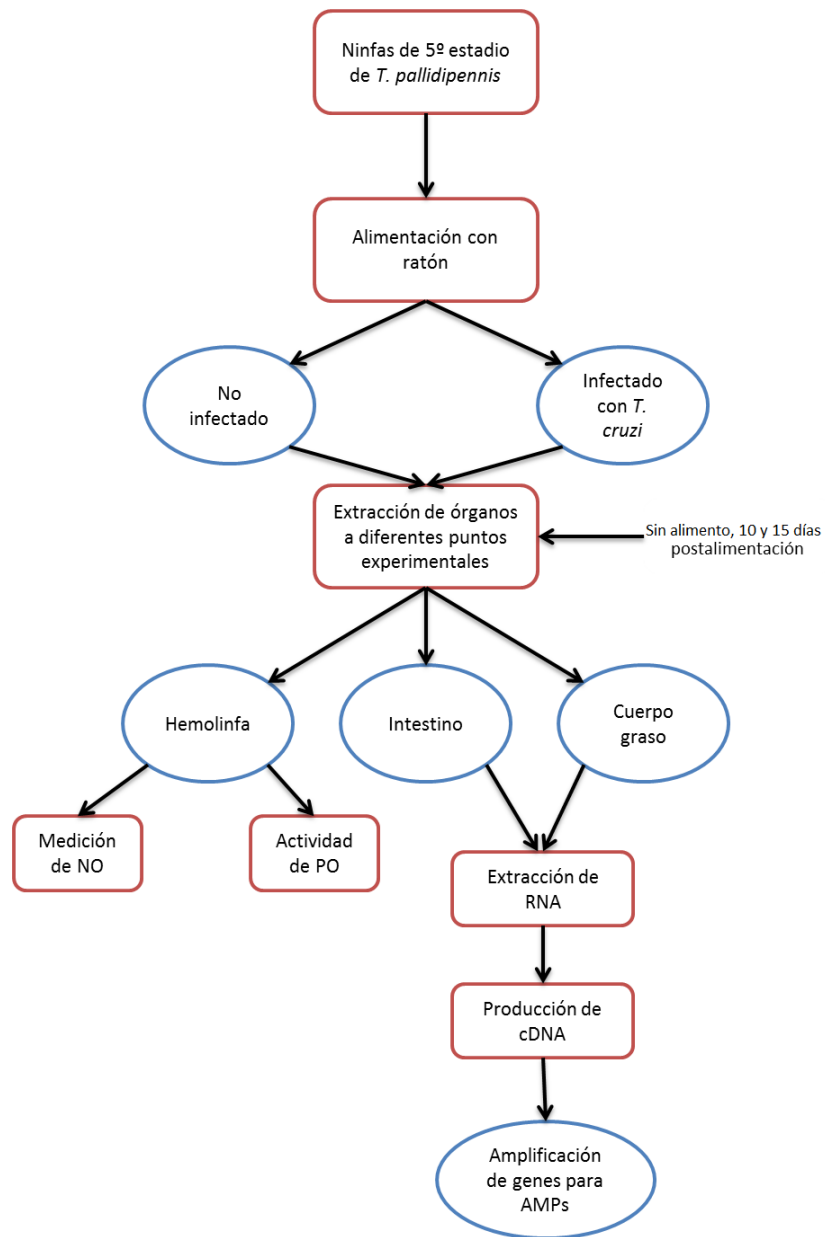
Analizar la expresión de mRNA de AMPs en intestino y cuerpo graso, así como la presencia de moléculas del sistema inmune sistémico en hemolinfa (sistema de melanización y NO) en insectos infectados con *T. cruzi*.

5.2. Objetivos particulares

- Analizar la expresión en insectos mexicanos infectados con *T. cruzi* de 3 defensinas y 2 lisozimas reportadas en triatomíneos sudamericanos.
- Analizar la producción de NO en la hemolinfa de los insectos infectados y no infectados.
- Analizar la actividad del sistema de melanización (enzima PO) en insectos infectados y comparar con los insectos control.

6. DISEÑO EXPERIMENTAL

Para abordar los objetivos del presente trabajo se diseñaron una serie de estrategias experimentales, que consideraban diferentes órganos del insecto, los días analizados y las evaluaciones realizadas para cada grupo de experimentos. El diseño experimental propuesto se resume a continuación:



7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1. Insectos

Los triatomíneos utilizados para este estudio fueron proporcionados 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 y una humedad relativa de 60% y se alimentaron cada 15 días con sangre de conejo.

7.2. Ratones e Infección

Se utilizaron ratones hembra de la cepa BALB/c de 8 a 11 semanas, proporcionados por el bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas. Los ratones se inocularon intraperitonealmente con 300,000 tripomastigotes sanguíneos de la cepa Ninoa (Monteón *et al.*, 1996; Espinoza *et al.*, 2010). Para cada experimento se infectaron de 4 a 6 ratones, dependiendo del número de insectos a utilizar. Los ratones utilizados como control se inocularon con PBS.

Previo a la alimentación los insectos se pesaron y se dividieron en dos grupos. Los ratones se pusieron en contacto con los insectos de 3 a 5 horas. Una vez concluido este tiempo los insectos se pesaron nuevamente para obtener el valor de peso ganado después de la alimentación como una medida indicadora de la misma.

7.3. Hemolinfa

7.3.1. Extracción

La extracción de la hemolinfa se realizó a través 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, en los siguientes tiempos: 1, 12, 24 y 36 horas post alimentación (h.p.a.) y 2, 6 y 10 días post alimentación (d.p.a.). La hemolinfa se colectó con una micropipeta y se mezcló con amortiguador de fosfatos 0.5 M (Herrera-Ortíz *et al.*, 2011). Para la cuantificación de proteínas se utilizó una modificación del método de Lowry, con el kit DC Protein Assay (BioRad) utilizando BSA para la determinación de la curva estándar.

7.3.2. Medición de NO

La producción de NO fue medida indirectamente por la cuantificación de nitritos y nitratos ($\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$) usando la reacción de Griess (Vespa *et al.*, 1994). Se utilizaron 50 μg de proteína, los cuales se llevaron a un volumen final de 50 μl con amortiguador de fosfatos 0.5 M, y se mezclaron con 50 μl de sulfanilamida (Sigma) al 1.0 % y 50 μl de naftiletilenediamina (Sigma) al 0.1 %, ambas en H_3PO_4 2.5 %. La reacción se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente, dando una señal colorida que fue leída a una longitud de onda de 570 nm (Herrera-Ortiz *et al.*, 2011). La concentración de nitritos orgánicos se obtuvo interpolando los valores de la muestra en una curva estándar que relaciona la absorbancia con concentraciones conocidas de NaNO_2 .

7.3.3. Producción de melanina

La actividad del sistema de melanización fue determinada espectrofotométricamente midiendo la producción de dopacrom a partir de L-dihidroxifenilalanina (L-DOPA, Sigma) (Gomes *et al.*, 2003; Jiménez-Cortés, 2008). Se utilizaron 60 µg de proteína de hemolinfa en un volumen final de 50 µl con amortiguador de fosfatos 0.5 M. La hemolinfa se mezcló con 100 µl de L-DOPA (4 mg/ml) (Nakamura *et al.*, 2007; Jiménez-Cortés 2008). Como blanco se utilizó 50 µl de amortiguador de fosfatos con 100 µl de L-DOPA y como control de melanización espontánea se utilizaron 60 µg de proteínas de hemolinfa en un volumen final de 50 µl con 100 µl de amortiguador de fosfatos. En el caso de los análisis por individuo se utilizaron 30 µg de proteína debido a la limitante de la hemolinfa obtenida por cada insecto. La reacción se midió cada 15 minutos por 2 horas manteniendo la placa a 37°C (Genta *et al.*, 2010). Para obtener la cantidad de producto producido y así conocer la actividad de la enzima principal de este sistema (PO) se utilizó el siguiente coeficiente de extinción molar: 3715 mM/cm (Daquinag *et al.*, 1995; Nakamura *et al.*, 2007). Conociendo la cantidad de producto se graficó contra el tiempo para obtener la velocidad inicial de la reacción (la pendiente de la parte lineal de la curva resultante). Este dato es la cantidad de producto obtenido en determinado tiempo y está dado en mM/cm. La actividad enzimática fue la cantidad de enzima que catalizó 1 µmol de sustrato por minuto por lo que nuestro dato se dividió entre el volumen en el que se llevó a cabo la reacción expresado en litros para obtener la actividad enzimática. El dato que obtuvimos estuvo dado en mol/min, por lo que lo convertimos a µmoles multiplicándolo por 1×10^6 . Para calcular la actividad específica se dividió entre la cantidad de enzima o proteína utilizada, expresado en mg. Los

datos obtenidos representan la actividad enzimática específica expresada en UI/mg de proteína.

7.4. Expresión de AMPs

7.4.1. Extracción de órganos

Se utilizaron de 4 a 8 insectos por experimento para cada grupo. Se realizó la extracción de los órganos a los 10 y 15 d.p.a. Los materiales para la disección se esterilizaron en autoclave y se sumergieron en agua DEPC 0.1 % antes de su uso. Los insectos se inmovilizaron a -20°C durante 5-10 minutos, una vez inmovilizados se realizó la extracción de todo el contenido abdominal, el cual se pasó a una caja de Petri con PBS/DEPC 0.1 % para la separación de los órganos con ayuda de un microscopio estereoscópico. Primero se separó el cuerpo graso del intestino y éste se dividió en anterior (Figura 1.4 I y II) y posterior (Figura 1.4 III y IV). Los órganos se limpiaron y se eliminaron aquellos que no fueron requeridos para el trabajo como los túbulos de Malpighi y la vena dorsal. Una vez limpios se pasaron a un tubo con 1ml de TRIZOL™ (Invitrogen) y se mantuvieron a 4°C toda la noche, posteriormente se pasaron a -70°C hasta la extracción de RNA. Para los insectos infectados se realizó el conteo de parásitos en el contenido intestinal en una cámara de Neubauer utilizando una dilución 1:50.

7.4.2. Extracción de RNA

La extracción de RNA se realizó por la técnica de TRIZOL™ (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante, con algunas modificaciones en los periodos de incubación para estandarizar las condiciones más adecuadas para la obtención de material íntegro. Los

órganos se maceraron con un homogenizador PRO 200 utilizando un rotor de 7 mm, se dejaron incubar 10 minutos en hielo. Se adicionaron 200 µl de cloroformo y se mezcló por inversión, se incubó por 5 a 10 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 12,000 g por 15 min a 4°C. Se recuperó la fase acuosa y se agregaron 500 µl de alcohol isopropílico (volumen similar obtenido de la fase acuosa), se mezcló por inversión y se dejó 45 min a -20°C. Las muestras se centrifugaron a 12,000 g por 15 min a 4°C. Se decantó el sobrenadante y se lavó el pellet con etanol al 75 % en agua DEPC y se centrifugó a 7,500 g por 5 min, el lavado se realizó por triplicado. Se retiró el sobrenadante y se dejó secar el pellet de 5-10 min, finalmente se resuspendió en 100-200 µl de agua DEPC 0.1%, dependiendo del tamaño del pellet (Oaxaca-Hernández, 2005, Vizcaino-Castillo, 2007).

La cuantificación se realizó en el Nanodrop (ND 1000) con 2 µl de muestra. El aparato proporcionó la cantidad de ácidos nucleicos en ng/µl y los valores de 260/280 y 260/230 automáticamente, los cuales fueron indicadores de pureza del RNA (2.0 y 1.8 respectivamente).

Una vez cuantificadas las muestras, para verificar la integridad del material, se corrieron 500 ng de RNA en geles de agarosa al 1 % en presencia de amortiguador TAE, a 100 V. El gel se tiñó con bromuro de etidio y se fotografió en el equipo Gel Logic 200 Imaging System (Kodak).

7.4.3. Producción de cDNA

Previó a la reacción de reversotranscripción (RT), 1 µg de RNA fue tratado con Desoxyribonuclease I Amplification Grade (DNasa I, Invitrogen) para eliminar residuos de DNA. Por cada µg de RNA se adicionó 1 µl de DNasa I (1 U/µl), 1 µl de amortiguador

DNasa 10 X y agua DEPC 0.1 % para completar un volumen final de 10 µl. La mezcla se dejó incubando por 15 min a temperatura ambiente. Para inactivar la DNasa I se añadió 1 µl de EDTA 0.25 mM y se incubó a 65°C durante 10 minutos.

Las condiciones para la mezcla de reacción de la RT se tomaron del artículo de Kollien y cols. (2004). La síntesis de cDNA se realizó en 30 µl de reacción que consistieron en 1 µg de RNA, 1.25 mM de cada dNTP (Invitrogen), 4.25 µM de oligo dT(23) (Invitrogen), 40 unidades de inhibidor de ribonucleasas (Invitrogen) y 50 unidades de transcriptasa reversa del virus Moloney de la leucemia murina (Invitrogen). Se utilizó el programa REVERSE del termociclador PTC-100® Programmable Thermal Controller (MJ research Inc.), el cual consistió en un ciclo de 10 minutos a 25°C, 30 minutos a 42°C y 72° por 10 minutos para inactivar la transcriptasa. El cDNA se mantuvo a -20°C hasta su uso.

7.4.4. Diseño de iniciadores

Para la amplificación de los mensajeros para péptidos antimicrobianos se diseñaron una serie de iniciadores a partir de secuencias de mRNA reportadas para el género *Triatoma*, las cuales se obtuvieron de la base de datos de PubMed. Se han identificado cinco secuencias de defensinas y tres de lisozimas en dos especies, por lo que se realizó un BLAST para ver qué tan diferentes eran entre sí. Basados en ese análisis se diseñaron iniciadores para 3 secuencias de defensinas y dos para lisozimas (Cuadro 2) con el programa FastPCR (<http://primerdigital.com/fastpcr.html>). Como gen control se utilizó la β-actina reportada para *T. brasiliensis* (Waniek *et al.*, 2009).

7.4.5. Reacción de PCR

Las condiciones utilizadas para la mezcla de reacción fueron modificadas de las reportadas previamente por Kollien y cols. (2004). La mezcla consistió en lo siguiente: 2.5 mM MgCl₂ (Invitrogen), 0.2 mM de cada dNTP (Invitrogen), 1.25 U Taq polimerasa (Invitrogen), amortiguador Taq 1 X y 1 μM de cada iniciador. La reacción se llevó a un volumen final de 30 μl. Los parámetros para los ciclos de amplificación fueron los siguientes: 1 ciclo de 95°C por 2 min, seguido de 30 ciclos de 94°C por 1min, 57°C por 1.3min (temperatura de alineamiento variable para cada juego de iniciadores), 72°C por 1min, y una extensión final a 72°C por 10 min. El PCR se realizó en el termociclador PTC-100® Programmable Thermal Controller (MJ research Inc.). Para todos los juegos de iniciadores se corrió un control negativo (sin DNA) en paralelo. Las condiciones se estandarizaron con DNA genómico de *T. pallidipennis*, en donde se utilizaron 200 ng de templado. Una vez estandarizada la reacción se utilizó el cDNA obtenido de los diferentes órganos de los insectos, como templado.

Los productos de PCR se analizaron en geles de agarosa al 1 % en presencia de amortiguador TBE y se corrieron a 100 V por 30 minutos. Los geles se tiñeron con bromuro de etidio y se documentaron en el equipo Gel Logic 200 Imaging System (Kodak).

Se realizaron análisis densitométricos de las bandas obtenidas utilizando el programa Image J.

7.5. Análisis estadísticos

Los datos de la actividad de PO, concentración de NO y los análisis densitométricos de las reacciones de RT-PCR se analizaron en el programa estadístico GraphPad Prisma. Se realizaron pruebas no paramétricas a fin de comprobar que la distribución de los datos fuera normal para llevar a cabo pruebas paramétricas de comparación de medias (prueba de t), para evaluar las diferencias entre el grupo control e infectado. En caso de que los datos no tuvieran una distribución normal se realizaron pruebas de comparación de medias no paramétricas (Man-Whitney).

Se utilizaron pruebas de ANOVA de una vía con una prueba de comparación múltiple de medias de Tukey, para evaluar las diferencias entre los días y horas post alimentación del grupo control e infectado, por separado.

Se realizaron análisis de correlación de Pearson entre los datos de ingesta de alimento y actividad de melanización en insectos control e infectados. En el caso de los insectos infectados se realizó una correlación entre el porcentaje de infección y el porcentaje de ingesta de alimento de cada experimento.

8. RESULTADOS

8.1. Infección de insectos con *T. cruzi*

Se realizaron un total de ocho ensayos de infección de insectos con *T. cruzi* cepa Ninoa. Para corroborar que los parásitos se hubieran establecido en el tracto digestivo se revisó el contenido intestinal de los insectos y para el análisis de AMPs se tomaron únicamente los órganos de aquellas ninfas en las que se encontraron parásitos. Con el fin de asegurarnos que los insectos control no tuvieran parásitos, también se revisó el contenido intestinal de éstos.

En el cuadro 1 se resumen los ensayos de infección que se realizaron para la obtención de órganos y los análisis de la hemolinfa. Como se observa, se realizaron tres experimentos independientes para la extracción de órganos a 10 y 15 d.p.a, para el posterior análisis de la expresión de AMPs. Adicionalmente a estos experimentos, se obtuvieron órganos de insectos sin alimentar para determinar el nivel basal de los AMPs en este modelo.

Cuadro 1. Resumen de ensayos de infección de ninfas de 5° estadio de *T. pallidipennis* con *T. cruzi*.

Ensayo	Modelo de infección de ratón	Parasitemia en sangre ^a	n	Ensayo de NO	Melanización	Extracción de RNA para experimentos de expresión de AMPs	Insectos infectados (%) ^b
1	Tripomastigotes sanguíneos	1.5-2	5	En grupo por días	En grupo por días	---	60
2	Tripomastigotes metacíclicos	5-8	6	En grupo por días	En grupo por días	10d.p.a	100
3	Tripomastigotes sanguíneos	1.5-2	5	En grupo por días	En grupo por días	10d.p.a	50
4	Tripomastigotes sanguíneos	1.5-2	5	---	Individual por días	10d.p.a	100
5	Tripomastigotes sanguíneos	1.5-2	6	---	Individual por días	---	100
6	Tripomastigotes sanguíneos	1.5-2	6	---	Individual por días	15d.p.a.	100
7	Tripomastigotes sanguíneos	1.5-2	8	---	Individual por horas	15d.p.a.	75
8	Tripomastigotes sanguíneos	1.5-2	17	En grupo por horas	Individual por horas	15d.p.a.	65

^a La parasitemia en sangre está dada en millones de parásitos por ml de sangre

^b Porcentaje de infección en basa a la presencia o ausencia del parásito en contenido intestinal.

Para un mejor análisis de la concentración de NO y la actividad de melanización se consideró el peso ganado por los insectos después de alimentarse. Se realizaron gráficas de ingesta de alimento por cada grupo de experimentos realizados (Figura 8.1) que se correlacionaron con los datos de porcentaje de infección (Figura 8.2). En la figura 8.1 se observa una gran variabilidad en la cantidad de alimento ingerido por parte de los insectos, a pesar de que el tiempo de exposición del alimento fue el mismo para los dos grupos, control e infectado.

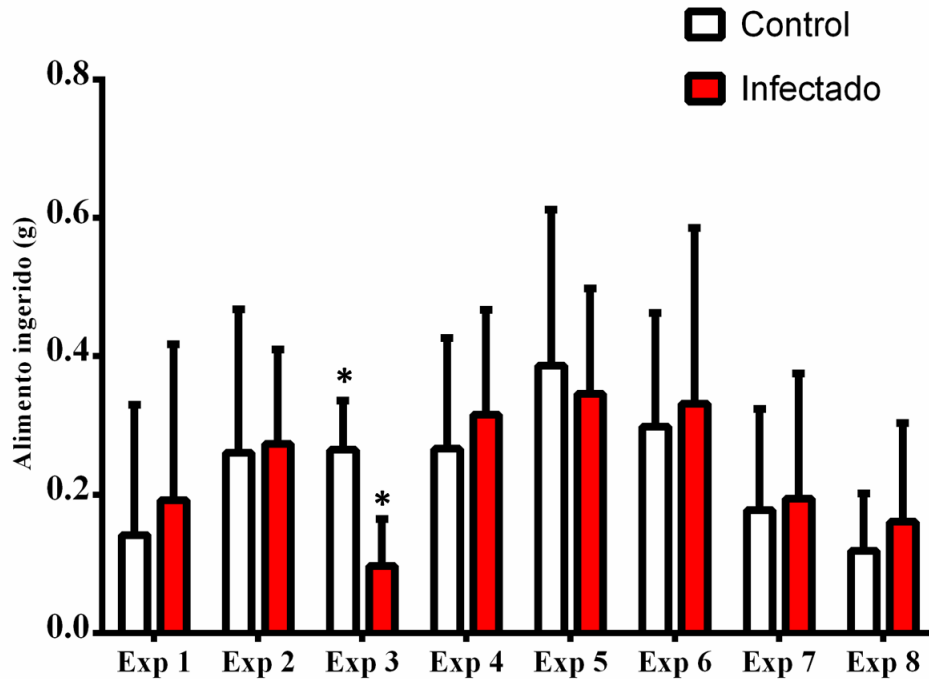


Figura 8.1. Ingesta de alimento de insectos en los diferentes ensayos de infección. Los insectos de los experimentos 1, 2 y 3 fueron utilizados para concentración de NO y actividad de melanización por grupo por días post alimentación. De los experimentos 4, 5 y 6 se realizaron análisis de actividad de melanización por individuo por días post alimentación. Los experimentos 7 y 8 fueron utilizados para obtener la concentración de NO por grupo por horas y melanización por individuo por horas. Promedio de ingesta \pm SD. * Prueba de t $p = 0.005$.

El porcentaje de insectos infectados estuvo en relación a la cantidad de sangre que ingerieron (Figura 8.2). En el análisis de correlación obtuvimos una $r = 0.95$ y una significancia de $p = 0.0003$, lo que indica que los grupos en donde se observa un mayor aumento de peso fueron aquellos que presentaron mayores porcentajes de infección. En el experimento 3 observamos que sólo el 50 % de los insectos se infectaron y fue éste en el que se registró una menor ingesta de alimento en el grupo infectado, esta diferencia fue estadísticamente significativa (Figura 8.1). Este experimento se utilizó para realizar mediciones de la actividad de melanización por grupo, los cuales no mostraron diferencia

(Figura 8.3), además de la extracción de los órganos, en donde se tomaron únicamente de los insectos que sí se infectaron.

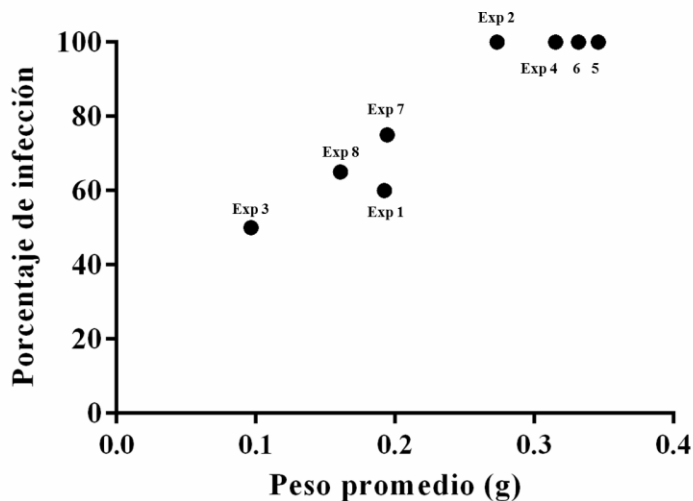


Figura 8.2. Correlación entre los porcentajes de infección y la cantidad de alimento ingerido en los ocho experimentos de infección. Índice de correlación de Pearson $r = 0.95$, $r^2 = 0.90$, $p = 0.003$.

En el resto de los experimentos la ingesta de alimento entre los grupos fue homogénea. Se observó que en los experimentos 4 al 6 se registraron los mayores promedios de ingesta, en ambos grupos y fue en éstos donde se obtuvo un 100 % de infección.

8.2. Análisis de la hemolinfa

8.2.1. Medición del sistema de melanización

Se realizaron tres experimentos independientes para evaluar la actividad del sistema de melanización, utilizando la actividad de la enzima PO como indicador a diferentes d.p.a. En la figura 8.3 se resume la actividad de la enzima en hemolinfa evaluada a 2, 6 y 10 d.p.a. en un grupo de 5-6 insectos por experimento. Se realizó una prueba de normalidad para

asegurarnos que la distribución de nuestros datos fuera normal y poder aplicar una prueba paramétrica para la comparación de medias.

Al utilizar datos de los 3 experimentos, se realizaron pruebas no paramétricas de comparación de medias (Mann Whitney) y no se observaron diferencias significativas entre los grupos a los diferentes días. Por otra parte se realizó un ANOVA, con el fin de comparar la actividad de la enzima entre los grupos y los días y el resultado no fue significativo para ningún caso ($p > 0.1$). También observamos desviaciones muy grandes en los datos, lo que nos indicó que al utilizar la hemolinfa de varios insectos podríamos estar enmascarando las diferencias individuales que pueden existir en nuestra población debido a la cantidad de alimento que ingirieron, sobre el cual no se puede tener un control (Figura 8.1). Por lo que a partir de los siguientes experimentos se realizó el análisis de la actividad de PO por individuo.

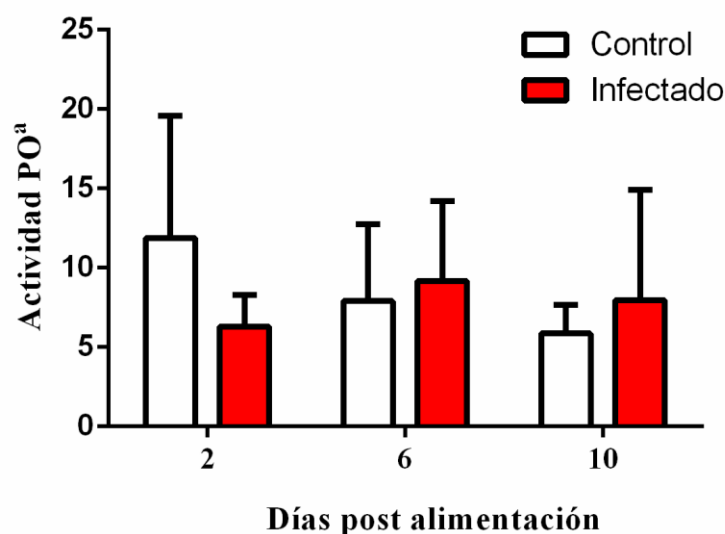


Figura 8.3. Análisis de la actividad de la enzima PO a diferentes días post alimentación utilizando el conjunto de hemolinfa de 5-6 insectos (60 μ g de proteína por reacción). Datos de tres experimentos independientes \pm SD. ^aLa actividad de la PO se midió en UI/mg de proteína.

En los siguientes ensayos la actividad de la enzima se midió por individuo a diferentes d.p.a., para lo cual los insectos se marcaron con colores que permitió seguirlos a lo largo del tiempo. La extracción de hemolinfa se realizó los días ya mencionados. Se calculó la actividad de la enzima como se describe en material y métodos por cada grupo, concentrando los datos de los tres experimentos (Figura 8.4). Los resultados se analizaron en el programa Graphpad Prism realizando una comparación de medias y varianzas entre grupos y días (prueba de t y ANOVA); además, se realizó una correlación entre la actividad de la enzima a los diferentes días y la cantidad de alimento ingerido por los insectos (Figura 8.5).

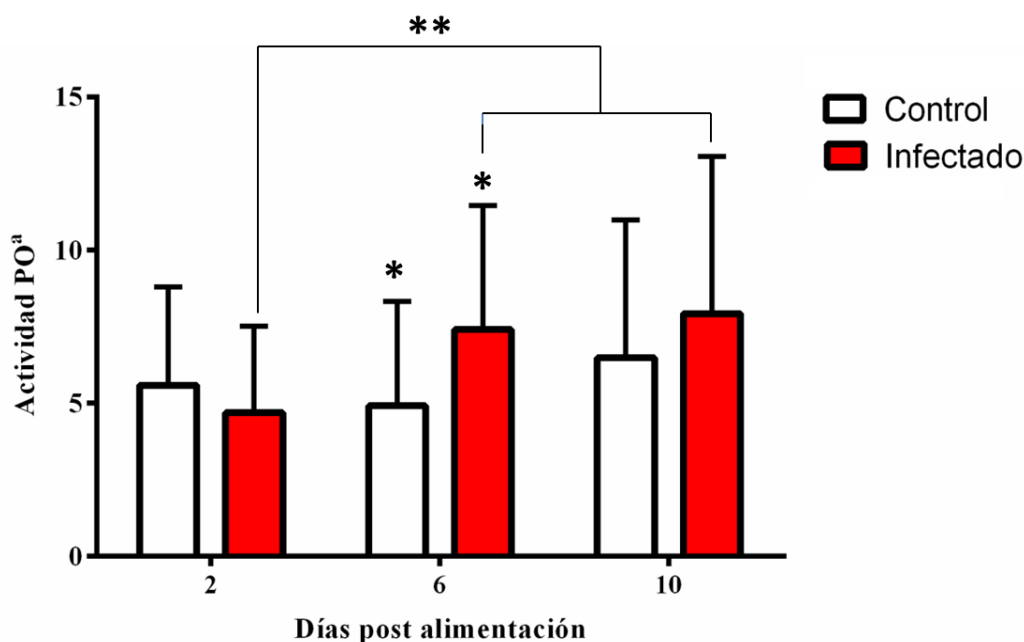


Figura 8.4. Actividad de la enzima PO a diferentes d.p.a. en insectos sin infectar e infectados con *T. cruzi* (30 μ g de proteína por reacción). Datos de tres experimentos independientes (n=16) \pm SD. * Prueba de t p=0.04, ** ANOVA p=0.02. ^aLa actividad de la PO se midió en UI/mg de proteína.

En la figura 8.4 se observa que la actividad de la enzima no presenta diferencias significativas cuando los insectos se encuentran infectados con el parásito con respecto a

los controles al día 2. A los 6 d.p.a. hay un aumento en la actividad de la enzima en los insectos infectados (* Figura 8.4), esta actividad se mantiene al día 10 y en los controles aumenta, por lo que a este día ya no se observan diferencias. También se presenta una tendencia de aumento a lo largo del tiempo, principalmente en los insectos infectados, es así que la actividad de la enzima al día 2 es diferente ($p=0.02$) de la que se observó al día 6 y 10 (** Figura 8.4), lo que no sucedió cuando los insectos no estaban infectados.

Una vez que se obtuvo la actividad de melanización se correlacionó con el aumento de peso del insecto con el fin de analizar si la cantidad de alimento ingerida modifica este sistema de respuesta inmune (Figura 8.5). Los índices de correlación no resultaron estadísticamente significativos ($p>0.1$) en ninguno de los dos grupos en cualquiera de los días analizados. Se observa una mayor dispersión de datos en la gráfica de los insectos infectados, la cual está dada por la variación de ingesta de alimentos que se presentó en este grupo más que en el control.

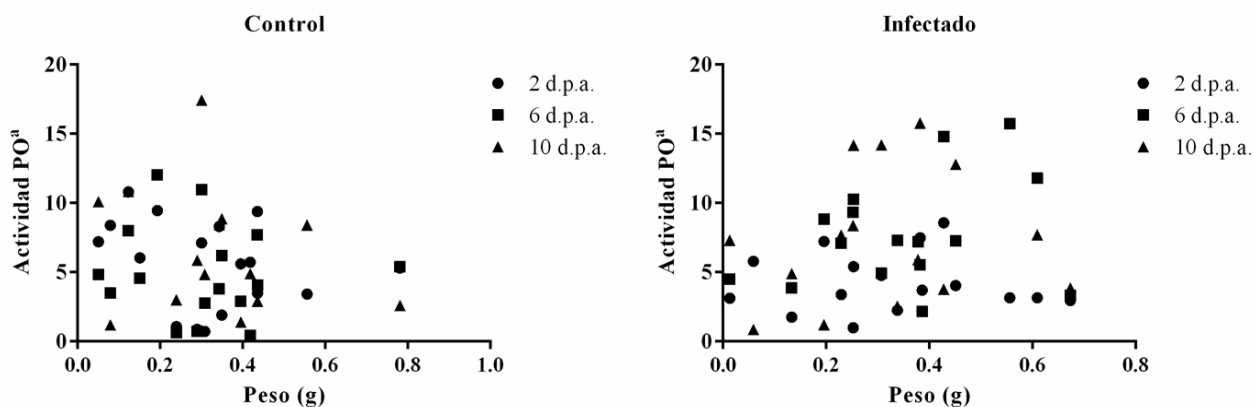


Figura 8.5. Correlación de la actividad de la PO de insectos infectados y control a diferentes d.p.a. con respecto a la cantidad de alimento ingerida por cada grupo (n=16). Significancia en correlación de Pearson $p > 0.1$. ^aLa actividad de la PO se midió en UI/mg de proteína.

Debido a que se encontraron diferencias significativas en este sistema de melanización a diferentes d.p.a. se propuso revisar la actividad durante las primeras horas posteriores a la alimentación (Figura 8.6), partiendo del supuesto de que al momento de que el parásito entra en el insecto éste puede ser reconocido por este mecanismo de respuesta inmune sistémico.

Para el estudio de la actividad de la PO por horas se utilizó insectos de dos experimentos independientes. Los ensayos de actividad se realizaron y analizaron de la misma forma que los experimentos previos.

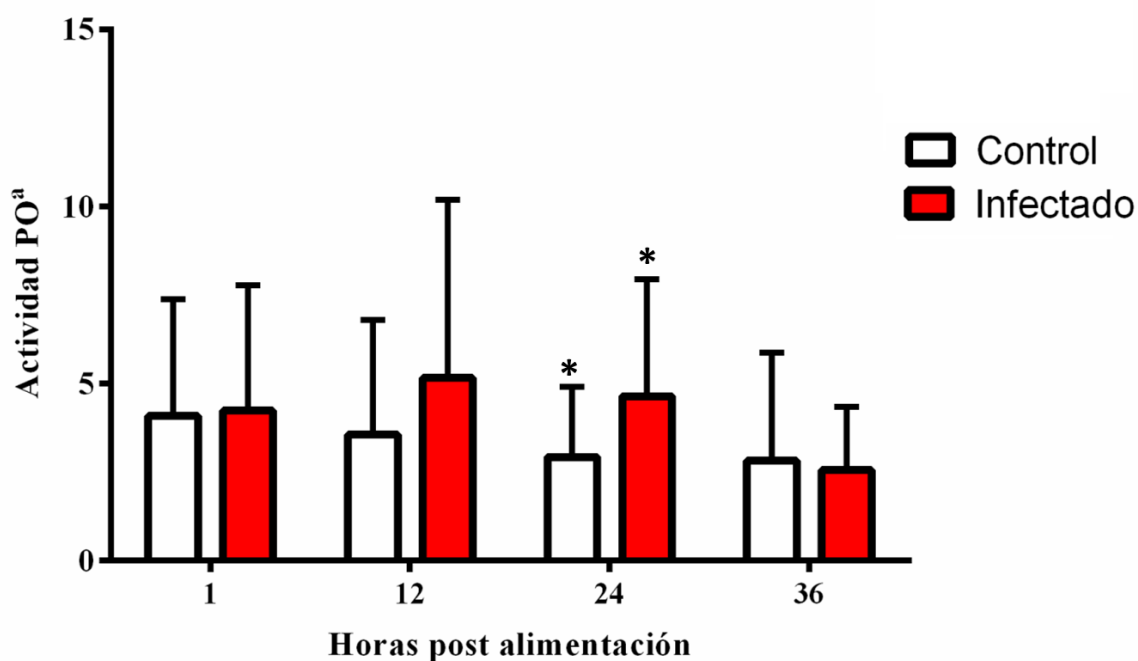


Figura 8.6. Actividad de la enzima PO en hemolinfa de insectos infectados con *T. cruzi* y sin infectar a diferentes horas p.a, datos por individuo (30 μ g de proteína por reacción). Datos de dos experimentos independientes (n=24) \pm SD. * prueba de t p=0.03. ^aLa actividad de la PO se midió en UI/mg de proteína.

En la gráfica se observa que la actividad inmediata a la alimentación fue igual en ambos grupos (Figura 8.6). A las 12 hubo un aumento en la actividad de los insectos

infectados, aunque no es estadísticamente significativa ($p=0.19$). Sin embargo a las 24 h.p.a. la actividad enzimática del grupo infectado aumentó significativamente con respecto al grupo control ($p=0.03$). Finalmente, a las 36 h.p.a. se observó una disminución en la actividad de la enzima de los insectos infectados, mientras que la del grupo control se mantuvo con respecto a las 12 horas previas.

La correlación entre la actividad de la PO y el aumento de peso en los insectos también se llevó a cabo en estos experimentos, con el fin de identificar si la cantidad de alimento influyó en la actividad de la enzima (Figura 8.7).

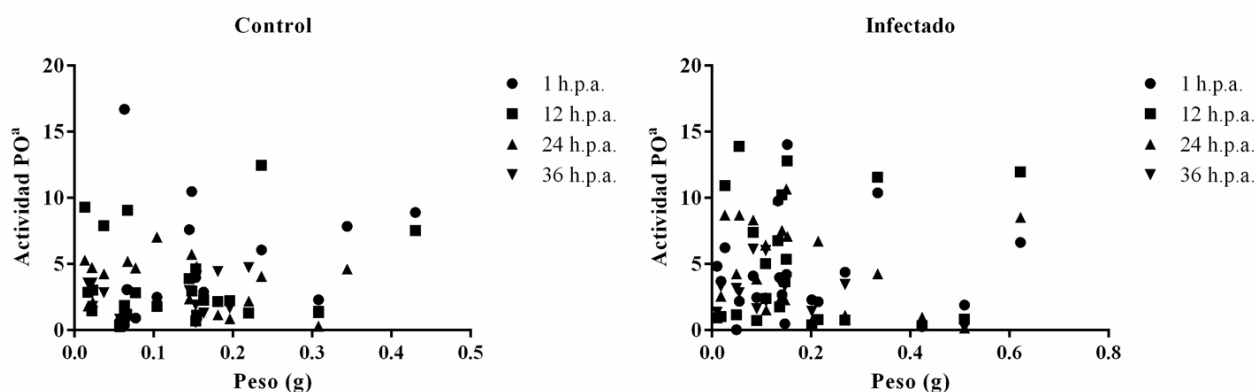


Figura 8.7. Correlación entre la cantidad de alimento ingerido (g) y la actividad de la enzima PO en las primeras horas posteriores a la alimentación. Índice de correlación de Pearson $p > 0.1$. ^aLa actividad de la PO se midió en UI/mg de proteína.

En este grupo de datos observamos que el grueso de la población se encontró en el rango de peso de 0.01 a 0.2 g tanto en insectos control como infectados, lo que se debe a que fueron estos experimentos en los que los insectos ingirieron menos sangre. Sin embargo, ésto no pareció afectar la actividad enzimática observada, ya que no existe una correlación entre la cantidad de alimento que toman los insectos y el sistema de la PO. Esto se corroboró al unir las actividades obtenidas en las primeras horas p.a. y los días subsecuentes (Figura 8.8).

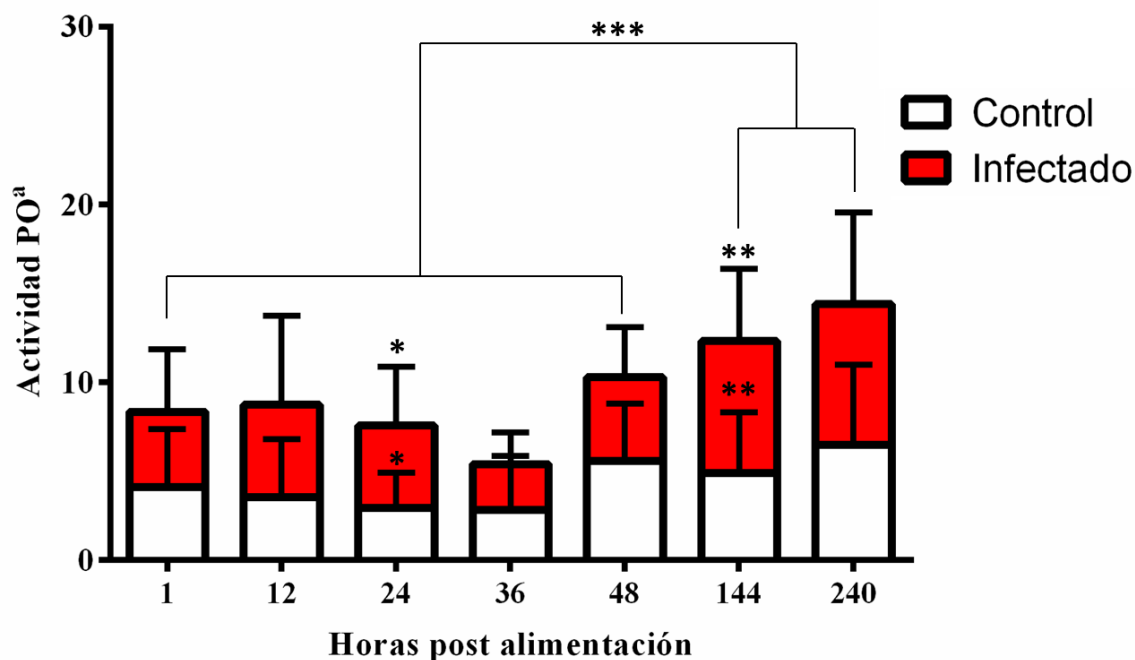


Figura 8.8. Actividad de la enzima PO a diferentes h.p.a. en hemolinfa de ninfas de 5° estadio de *T. pallidipennis* infectado con *T. cruzi* y sin infectar. Datos de tres experimentos independientes (n = 16-24) \pm SD. * Prueba de t p=0.03, ** p=0.04. ***ANOVA p< 0.05 en insectos infectados. ^aLa actividad de la PO se midió en UI/mg de proteína.

Como se observa en la figura 8.8 la actividad enzimática de la PO sufrió modificaciones a lo largo del tiempo posterior a la ingesta de alimento. En las primeras horas presentó una disminución, hasta las 36hrs, en donde llegó al punto mínimo de actividad. Posteriormente la actividad aumentó, alcanzando el pico a los 10 d.p.a. (240 h.p.a.). Este patrón de comportamiento en la actividad de melanización fue más acentuado en el grupo de insectos infectados. El análisis ANOVA mostró diferencias estadísticamente significativas entre los valores de la actividad de la enzima entre las primeras horas, 1, 12, 24, 36 y 48 y las últimas, 144 y 240 h.p.a., en el grupo de insectos infectados, lo que no se observa en el grupo control.

Así mismo, la actividad en los insectos infectados fue mayor en casi todos los puntos analizados y las diferencias significativas en la actividad entre insectos infectados y control se registraron en dos puntos, a las 24 h.p.a y a los 6 d.p.a. (144 h.p.a.).

8.2.2. Concentración de NO en la hemolinfa

La evaluación del NO se realizó con las mismas muestras que se utilizaron para la actividad de PO en grupo por días. Se evaluó la concentración de nitritos inorgánicos mediante la reacción de Griess. Se utilizaron 50 µg de proteína de hemolinfa por cada punto experimental y los resultados se analizaron con pruebas estadísticas no paramétricas (Figura 8.9).

De acuerdo a los análisis de comparación de medias no hubo diferencias significativas en la concentración de NO entre insectos infectados y control a los diferentes d.p.a.. Tampoco se encontraron diferencias dentro de cada grupo en los días analizados. En la gráfica observamos una gran variación en la concentración de nitritos dentro de cada grupo, lo que sucedió con la actividad de la enzima PO cuando se calculó con una mezcla de hemolinfa de diferentes individuos, lo que indicó la presencia de una variación intrapoblacional de estos componentes de la hemolinfa.

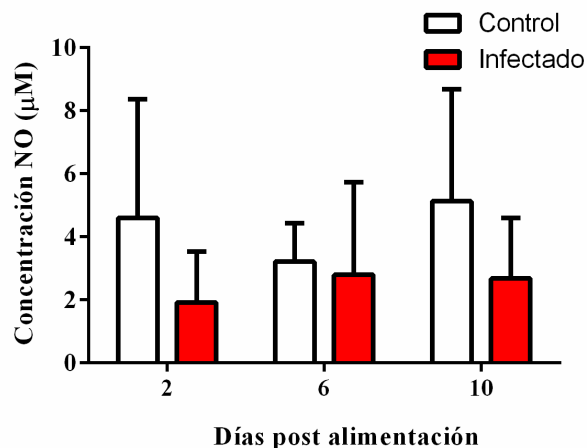


Figura 8.9. Concentración de nitritos inorgánicos en 50 µg de proteína de hemolinfa de insectos infectados y no infectados a diferentes días post alimentación. Resultado de tres experimentos independientes del conjunto de hemolinfa de 5-6 insectos. Media de tres experimentos independientes \pm SD.

Se realizó un experimento para calcular la concentración de NO en las primeras horas post alimentación, utilizando la hemolinfa de 17 individuos en conjunto. Para la cuantificación de los nitritos no se pudo realizar la determinación por individuo debido a la restricción de material que se tuvo. Los resultados de este experimento indicaron que no existe una diferencia entre los insectos infectados con *T. cruzi* y control con respecto a la concentración de NO presente en la hemolinfa (Figura 8.10).

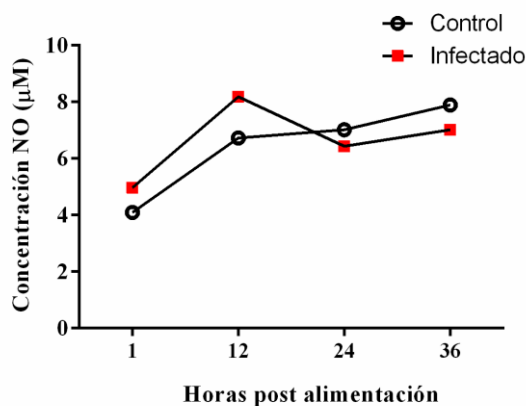


Figura 8.10. Concentración de NO en hemolinfa de ninfas de 5º estadio infectadas con *T. cruzi* y no infectadas en las primeras horas p.a. Resultados de un experimento; cada grupo representa el conjunto de hemolinfa de 17 insectos.

8.3. Expresión de AMPs

Para analizar la expresión de diferentes AMPs en el insecto, se buscaron secuencias codificantes para estas moléculas que estuvieran reportadas en el género *Triatoma*. Se encontraron en la literatura datos de dos especies, *T. brasiliensis* y *T. infestans* para lisozimas y defensinas. Realizamos un análisis tipo BLAST para determinar si existían diferencias en estos péptidos entre las dos especies. Una vez concluido el análisis se determinó que de los AMPs reportados se tenían secuencias para tres defensinas y dos lisozimas diferentes.

A partir de las secuencias de mRNA de la base de datos del GenBank (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para *defensina 1* de *T. brasiliensis* (AY641574.1, Araujo *et al.*, 2006), *defensina 3* (EU694177.1, Araujo *et al.*, 2006) y *defensina 4* (EU694178.1, Araujo *et al.*, 2006 y Waniek *et al.*, 2009) se diseñaron tres juegos de iniciadores. Para las lisozimas se tomaron los reportes de *T. brasiliensis* (AY692463.1, Araujo *et al.*, 2006) y *T. infestans* (DQ888712.1, Balczun *et al.*, 2008) para generar dos juegos de iniciadores (Cuadro 2). Como gen control de expresión basal se utilizó la secuencia de mRNA de β -actina reportada por Waniek y cols. en 2009 (EF589784.1).

El diseño de iniciadores se realizó en el programa FastPCR, el cual provee de herramientas para realizar PCR *in silico*, con las que determinamos si los iniciadores elegidos funcionarían adecuadamente en condiciones preestablecidas y el tamaño esperado del amplificado.

Cuadro 2. Secuencias de iniciadores para péptidos antimicrobianos

Gen	Nombre del primer	Secuencia (5'-3')	Tamaño esperado del amplificado (pb)	Temperatura de alineamiento (°C)
<i>lisozima 1</i>	<i>lis 1</i>	F-ACTATGCCTTGTTGCCCTGC R-TTTGTTCTGCCAACCGTACC	361	58.4 55.9
<i>lisozima 2</i>	<i>lis 2</i>	F-TTGCCTTGCTGGGCGTTTCAG R-TGCATTGGTTCCGCCAAAGG	354	61.2 59.2
<i>defensina 1</i>	<i>def 1</i>	F-TCGAACATCCCTTCTACACAGC R-CACTTCCTGCAATGGCAGAC	344	56.3 57.1
<i>defensina 3</i>	<i>def 3</i>	F-TATTCTTGGTGGCCGCCCTG R-CACTTCCTGCAGTGACAGAT	253	60.1 54.8
<i>defensina 4</i>	<i>def 4</i>	F-ACACAGTTGAACTTGCTCCA R-CACTTCCTGCAGTGACAGAT	334	54.6 54.8
<i>β-actina</i>	<i>act</i>	F-CTGACCGAGGCCCCACTCAA R-GGAACAAGGCTTCTGGGCAG	475	61.57 59.2

F- Secuencia Forward

R- Secuencia Reverse

A partir de los datos generados por el programa se realizó la estandarización de las condiciones del PCR, utilizando los valores para la mezcla de reacción reportadas en Kollien y cols. (2004). La temperatura de alineamiento para cada juego de iniciadores se calculó partiendo del promedio de las dos temperaturas proporcionadas por el programa y a partir de ella se realizaron las modificaciones pertinentes para la amplificación exitosa de estas moléculas. Se probaron diferentes temperaturas sin modificar las condiciones de la mezcla de reacción. Esta estandarización se llevó a cabo teniendo como templado DNA genómico del insecto, primero para asegurarnos que *T. pallidipennis* tuviera en su genoma estas secuencias y también para no utilizar material escaso (cDNA) en estos procesos de ensayo y error.

Al finalizar la estandarización se obtuvieron cuatro diferentes temperaturas en las que se agrupaban los seis juegos de iniciadores: 60°C para β -actina (*act*) y defensina 3 (*def 3*), 57°C para lisozima 1 (*lis 1*) y defensina 4 (*def 4*), 56°C para lisozima 2 (*lis 2*) y 55°C para defensina 1 (*def 1*). Con las condiciones establecidas, utilizando DNA genómico como templado, obtuvimos productos de mayor peso al esperado (Cuadro 3) y en algunos casos más de un amplificado (Figura 8.11).

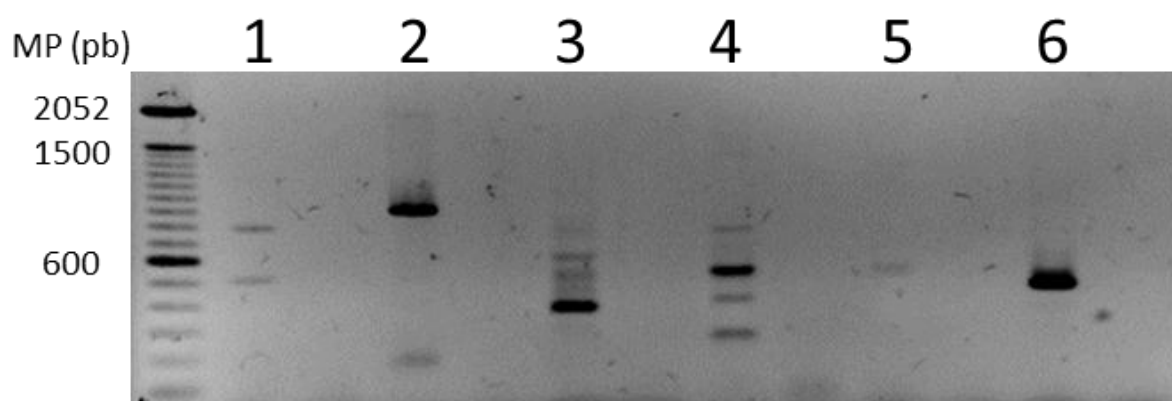


Figura 8.11. Amplificados de genes de AMPs y β -actina a partir de DNA genómico. Los carriles sin número corresponden a los controles negativos (sin DNA). 1. *lis 1*, 2. *act*, 3. *def 3*, 4. *lis 2*, 5. *def 1*, 6 *def 4*. Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio.

Como se observa en el gel (Figura 8.11) con la mayoría de los iniciadores hubo un amplificado que es más abundante que los demás. Una vez determinadas las condiciones y verificado que el genoma de *T. pallidipennis* tuviera estas secuencias, se realizó la reacción de PCR tomando cDNA como templado, producto de la RT de RNA obtenido de diferentes órganos a diferentes d.p.a. y de insectos sin alimento. Con esto, evaluamos la expresión de los AMPs cuando el insecto se encontraba infectado o no con el parásito.

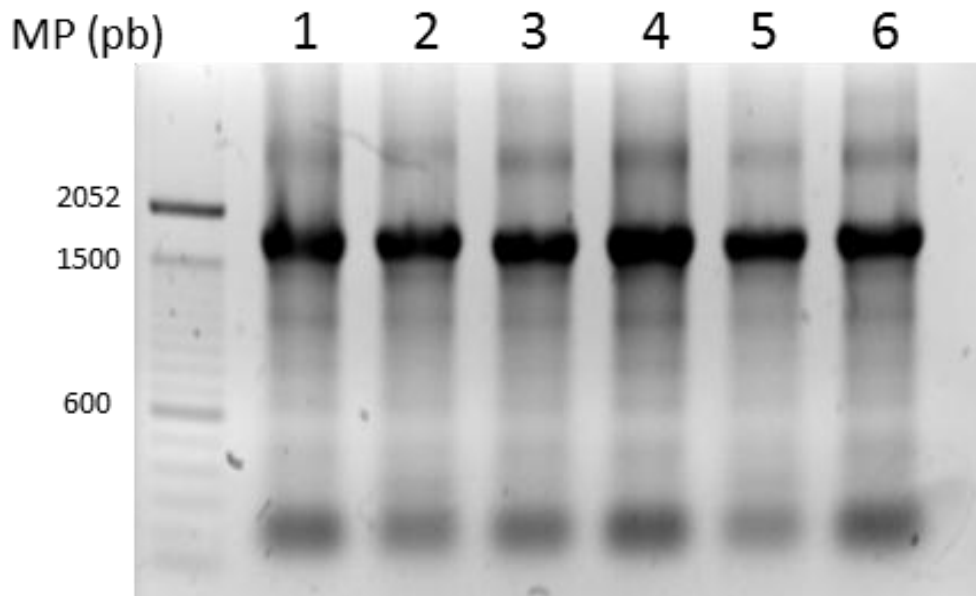


Figura 8.12. Integridad del RNA extraído de diferentes órganos de insectos control (1, 3 y 5) e infectados (2, 4 y 6). 1 y 4 Intestino Anterior, 2 y 5 Cuerpo graso, 3 y 6 Intestino posterior. 500 ng de RNA por carril. Gel Agarosa 1 % en TAE teñido con bromuro de etidio. Gel representativo de 9 experimentos independientes.

Se realizó la extracción de RNA de intestino anterior (Int. Ant), posterior (Post) y cuerpo graso (CG) de tres experimentos independientes de insectos sin alimentar y a los 10 y 15 d.p.a. La integridad del material se verificó en un gel no desnaturizante de RNA (Agarosa 1% TAE) para utilizarlo en la producción de cDNA (Figura 8.12).

Una vez obtenido el cDNA se utilizó como templado para las reacciones de PCR. Los productos se resolvieron en geles de agarosa al 1% en presencia de amortiguador TBE, se tiñeron con bromuro de etidio y se documentaron para su análisis (Figura 8.13). Para obtener el peso molecular de los amplificados se utilizó el programa Kodak Image y para evaluar la densitometría de las bandas y establecer la tasa de cambio de los genes de interés con respecto al gen control se empleó el programa ImageJ. Las gráficas y análisis se efectuaron en el programa bioestadístico Graphpad Prism.

Cuadro 3. Temperaturas de alineamiento y peso de los amplificadores de los primers de AMP y el gen control en DNA genómico y CDNA

Iniciadores	Temperatura de alineamiento °C	Peso hipotético (pb)	Peso del producto en DNA	Peso del producto en cDNA	Órgano en donde se expresa
<i>act</i>	60	475	880	500	Int Ant, Post y CG
<i>lis 1</i>	57	361	800 500	370	Int Ant , Post y CG
<i>lis 2</i>	56	354	590	---	---
<i>def 1</i>	55	344	570	280	Int Ant
<i>def 3</i>	60	253	400	260	Int Ant , Post y CG
<i>def 4</i>	57	334	500	330	Int Ant , Post y CG

Se obtuvo una sola banda de amplificadores para la mayoría de los genes de interés que coincidieron con el peso calculado con el programa FastPCR, tomando como base secuencias de mRNA. Sin embargo, no se obtuvo amplificado de *lis 2* a partir de cDNA en ningún órgano, incluso se probaron más temperaturas de alineamiento pero el resultado continuó siendo negativo.

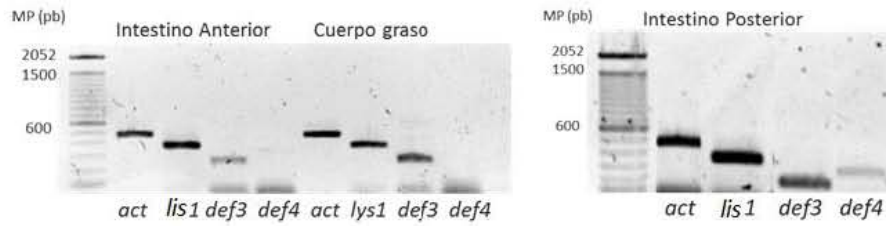
Para evaluar la transcripción de AMPs en órganos de insectos sin alimentar, éstos se mantuvieron con más de 30 días de ayuno. En la figura 8.13A se observan los amplificadores de los genes *act*, *lis 1*, *def 3* y *def 4*, en los tres órganos analizados. Los niveles de expresión de *lis 1* y *def 3* fueron constantes en los tres órganos, mientras que, *def 4* tuvo una baja tasa de transcripción en todos los órganos cuando el insecto se encontraba sin alimento.

En la figura 8.13B se presentan los amplificadores de genes *act*, *lis 1*, *def 3* y *def 4* a los 10 y 15d.p.a. Se observa que en el intestino anterior se expresaron dos genes, *lis 1* y *def 4*, en igual proporción en insectos infectados y control en los dos días de análisis. Mientras que el gen *def 3* presentó un aumento en la transcripción en los insectos infectados 10 d.p.a., lo cual ya no se observó a los 15 d.p.a.

En el intestino posterior a los 10 y 15 d.p.a. la transcripción de *lis 1* y *def 3* estuvo en igual proporción en ambos grupos. En el caso de la *def 4* se observó un amplificador sólo en insectos control 15 d.p.a.

Por su parte, los insectos infectados fueron los únicos en los que se observó la transcripción de *lis 1* en cuerpo graso 10 y 15d.p.a. La expresión de los genes para *def 3* y *def 4* se mantuvo constante en las dos condiciones.

A. Órganos de insectos sin alimentar



B. Órganos de insectos alimentados a diferentes días

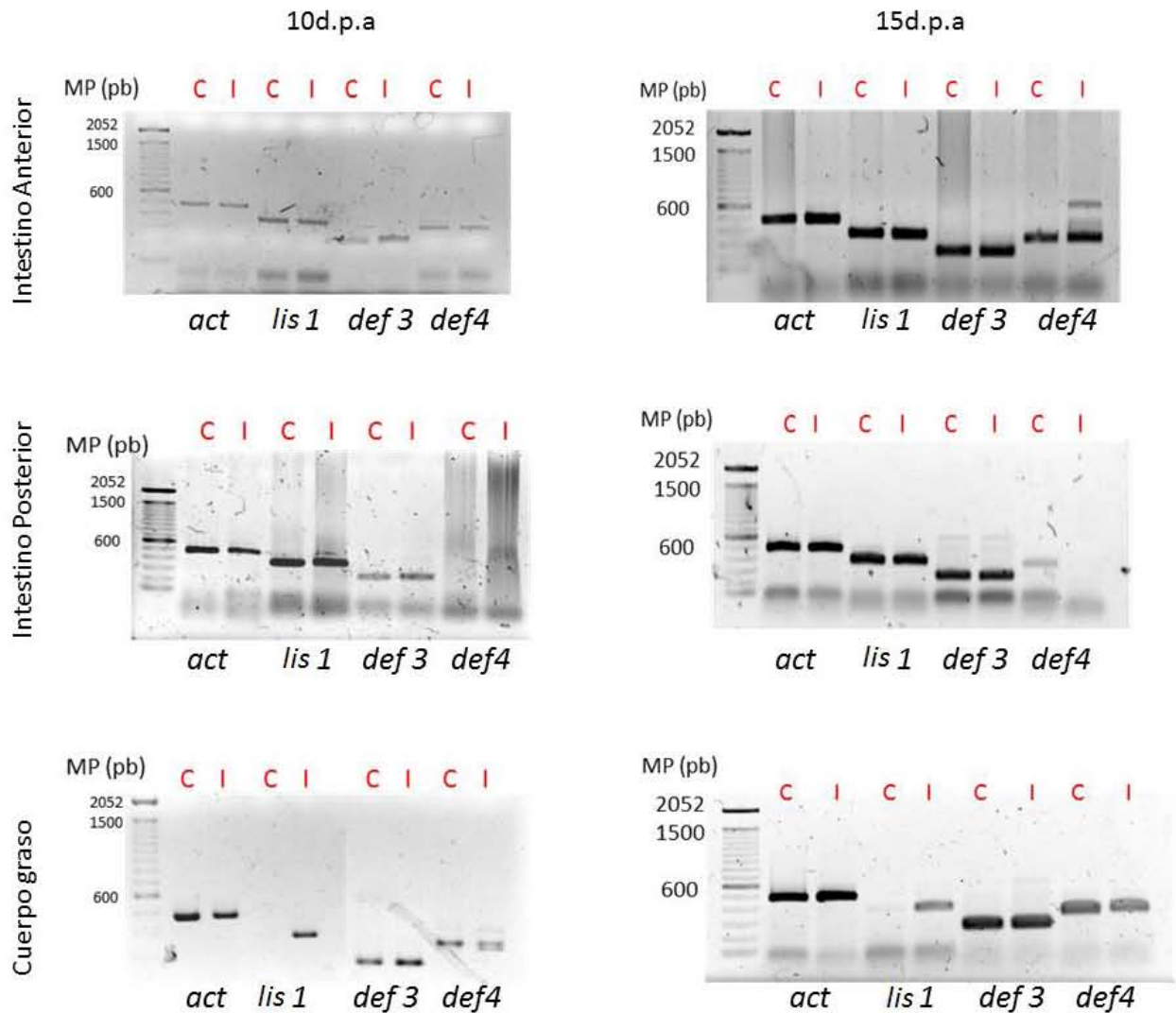


Figura 8.13. RT-PCR de AMPs en diferentes órganos de insectos sin alimento (A) y en diferentes días post alimentación (B). Geles representativos de tres experimentos independientes. Agarosa 1 % en TBE.

Se realizó el análisis estadístico de las densitometrías de los amplificadores obtenidos con el programa ImageJ. Se reporta la tasa de cambio de los genes de AMPs con respecto al gen control (*act*). Los resultados se graficaron (Figura 8.14) por órgano y gen de interés de los insectos infectados en los tres puntos experimentales de tres experimentos independientes.

Como se observa en las gráficas hubo una transcripción diferencial de AMPs entre los tres órganos del insecto analizados. *Lis 1* presentó un aumento en la tasa de transcripción posterior a la alimentación de los insectos en el intestino anterior, sin embargo, no presentó cambios significativos entre los insectos infectados y controles en ninguno de los dos días analizados. En el intestino posterior no se observó este aumento entre los insectos alimentados y sin alimento, y la tasa de transcripción del gen fue similar en las condiciones de control e infección. En ambas porciones del intestino observamos una mayor transcripción del gen al día 10 que al 15, siendo más evidente esta disminución en el intestino posterior. En el cuerpo graso, el mensajero de este péptido estuvo presente cuando el insecto no estaba alimentado y posteriormente sólo en los insectos infectados en los dos días analizados, aunque en una tasa menor que en el intestino.

El gen *def 3* presentó una tendencia de aumento en la transcripción en insectos infectados 10 d.p.a. en el intestino anterior y posterior, no obstante esta diferencia no fue estadísticamente significativa. En las gráficas se observa que la transcripción de este péptido fue mayor en el intestino anterior con respecto a los otros órganos a los 10 d.p.a. principalmente en los insectos infectados y disminuyó a los 15 d.p.a. En el intestino posterior observamos un efecto contrario en los insectos control, en donde la transcripción

de este gen aumentó del día 10 al 15. En cuerpo graso no se observa ninguna diferencia en la expresión del gen entre los grupos de insectos ni entre los días.

La transcripción de *def 4* aumentó en intestino anterior y cuerpo graso cuando los insectos fueron alimentados. En ninguno de estos dos órganos se observaron diferencias entre la condición de infectado y control. En el intestino posterior observamos una baja tasa de transcripción de este gen cuando los insectos no estaban alimentados, la cual ya no estuvo presente 10 d.p.a. y se volvió a observar 15 días posteriores a la ingesta de alimento sólo en los insectos control.

En la figura 8.15 se muestran los amplificadores de *def 1*, que presentó transcripción únicamente en el intestino anterior. De acuerdo con la imagen la presencia del parásito en el intestino no afectó la transcripción de este gen a los 10 y 15 d.p.a. En la gráfica se observa un aumento en la transcripción en los insectos infectados al día 10p.a., sin embargo no es estadísticamente significativo ($p > 0.1$).

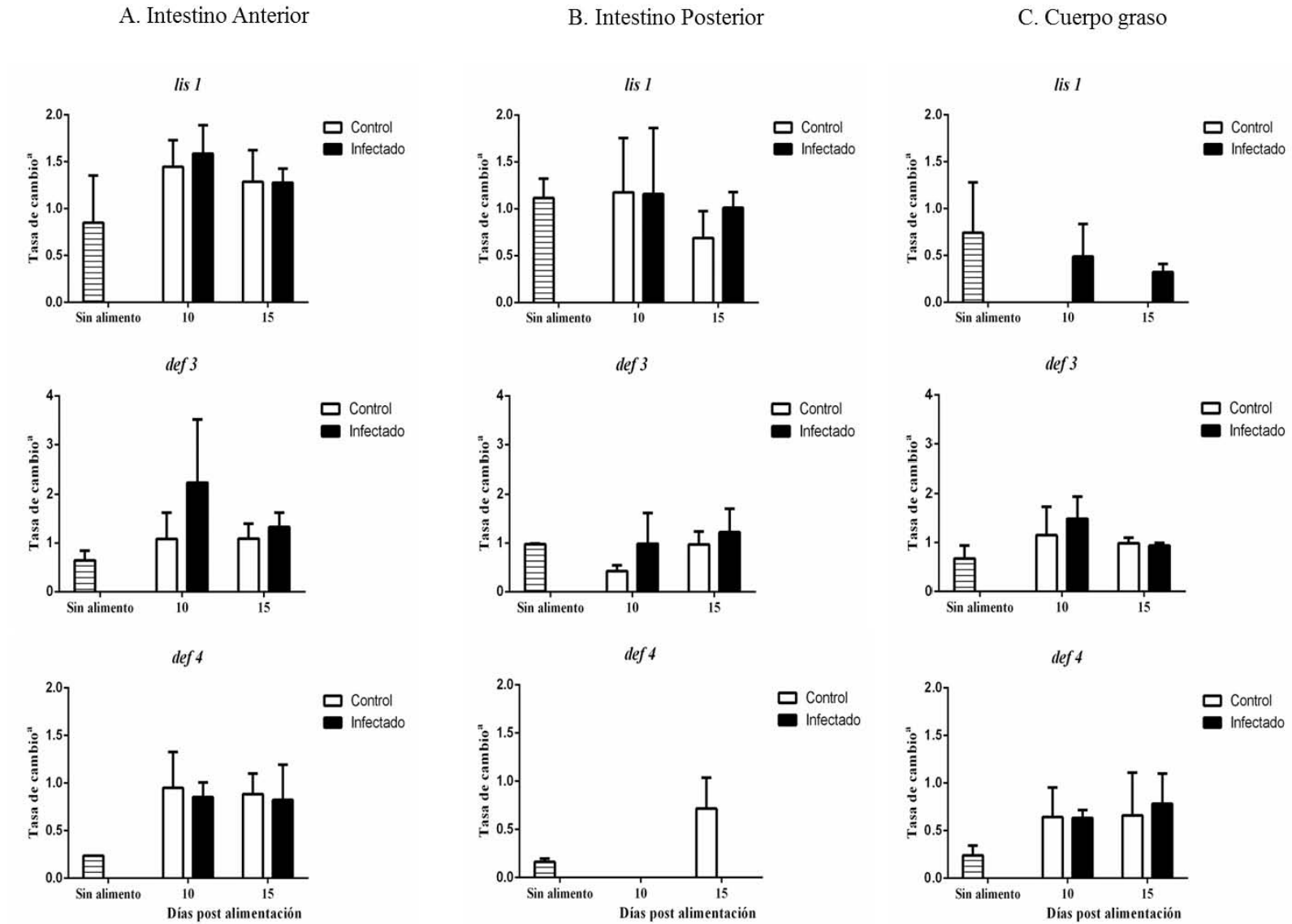


Figura 8.14. Transcripción de genes de AMPs en diferentes órganos de insectos sin alimento y alimentados a 10 y 15 días. ^aTasa de cambio con respecto al gen control. Datos de tres experimentos independientes \pm SD. Prueba de t y ANOVA $p > 0.05$.

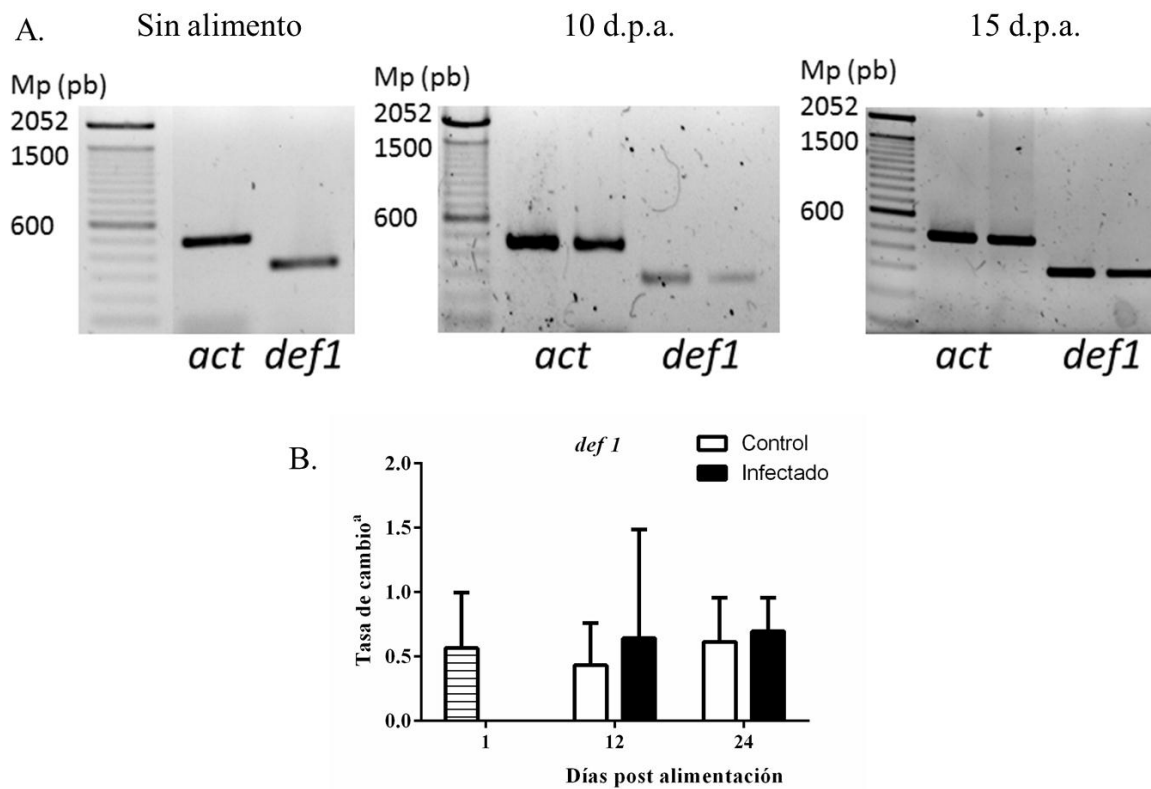


Figura 8.15. Amplificados de *def1* en intestino anterior. A. Geles representativos de tres experimentos independientes de los productos de RT-PCR de órganos de insectos sin alimento y alimentados a los 10 y 15 días. Agarosa 1% en TBE. B. ^aTasa de cambio con respecto al gen control. Datos de tres experimentos independientes \pm SD. Prueba de t y ANOVA $p > 0.05$.

9. DISCUSIÓN

Las enfermedades transmitidas por vectores se encuentran entre las que más afectan a la población humana y su manejo se ha centrado en controlar las poblaciones de insectos transmisores (Elliot et al., 2003). Sin embargo, no todas pueden ser controladas de esta forma, debido a que existen muchos factores dentro del ciclo de transmisión que lo dificultan, como son: la abundancia de mamíferos silvestres que funcionan como reservorios del parásito, la gran cantidad de especies de vectores que pueden transmitir al parásito y la diversidad genética de las cepas de *T. cruzi* (Carcavallo et al., 1985; Grayson, 2010). En el caso particular de México, se encuentran más de 30 especies de triatominos (Hemiptera: Reduviidae: Triatiminae) de las cuales todas son potenciales vectores de la enfermedad y algunas son de importancia epidemiológica debido a la cercanía con las viviendas humanas y los altos índices de infección (Martínez-Ibarra, 2001; Martínez et al., 2006). Dentro de estas especies se encuentra *T. pallidipennis*, la cual se distribuye en el centro y oeste del país y se ha encontrado con índices de infección de hasta 98% en estados como Morelos y 55% en Jalisco (Zárate and Zárate, 1985; Vidal-Acosta, 2000; Martínez-Ibarra et al., 2001).

Debido a este complejo sistema de transmisión de la enfermedad, las interacciones de los vectores con los parásitos que transmiten son de gran importancia, ya que de éstas depende el desarrollo del parásito y el éxito de su transmisión a un hospedero vertebrado. Estas interacciones pueden darse a diferentes niveles, sin embargo, el sistema inmune juega un papel crucial en ellas, ya que es el encargado de mantener la homeostasis del sistema en

cuanto a la cantidad de microorganismos que pueden coexistir en el insecto sin comprometer la viabilidad del mismo.

En este estudio se analizaron dos tipos de respuesta del sistema inmune, local y sistémico, del insecto con respecto a la infección por *T. cruzi*. La presencia de ambas indicaría que aun con todo el tiempo de coevolución que han mantenido tripanosomas y triatomíneos los parásitos continúan siendo agentes extraños dentro del insecto y por lo tanto se montarán respuestas, que si bien no lo eliminan, contribuyen a contener la población de parásitos que el insecto pueda mantener sin ver comprometida su eficacia biológica (Moya and Latorre, 2004).

9.1. Melanización

Se ha reportado que el sistema de melanización es un indicador de la inmunocompetencia del insecto (Adamo 2004) debido a que está asociado a los procesos de encapsulación de patógenos en la hemolinfa y otros mecanismos humorales de la respuesta inmune de invertebrados (Chen and Chen, 1995; Nation, 2008; Kanost and Gorman, 2008). También se ha asociado a la reparación de tejidos y como sistema de defensa contra bacterias, hongos, protozoarios, helmintos y parasitoides presentes en la hemolinfa (Christensen *et al.*, 2005; González-Santoyo and Córdoba-Aguilar, 2011). Sin embargo, en diversos estudios de inmunoecología se ha observado que la actividad de este sistema no siempre se relaciona con el patógeno con el que se reta a los insectos en condiciones naturales (González-Santoyo and Córdoba-Aguilar, 2011). Esto se debe a que los insectos en su hábitat natural se encuentran sometidos a diferentes tipos de estrés y de microorganismos que pueden ser patógenos. En nuestro modelo de estudio controlamos

algunas de estas variables, al mantener la colonia de insectos libre de exopatógenos, como ácaros y proveyendo a los triatomíneos de alimento cada 15 días. Es por esto que la medición de la actividad de la enzima principal del sistema de melanización (PO) podría ser un indicador de la respuesta inmune que el vector puede montar contra el parásito *T. cruzi*.

En otros modelos de vector-parásito se ha visto que el sistema de la enzima PO juega un papel crucial para inhibir el desarrollo del protozoario, como es el caso de *Plasmodium* en los mosquitos, debido a que parte del ciclo de vida del parásito se desarrolla en la hemolinfa (Christensen *et al.*, 2005). En un modelo más cercano al nuestro, se ha reportado que el protozoario *T. rangeli* inhibe la cascada de melanización de la hemolinfa (Gomes *et al.*, 2003) y en la mosca tse-tse, transmisora de *T. brucei*, este sistema se correlaciona con la resistencia a los parásitos entre diferentes especies (Nigam *et al.*, 1997; Adamo 2004). En el caso particular de los insectos que nos interesan, existen reportes de la actividad de esta enzima en ninfas de 5° estadio de *Rhodnius prolixus*, vector de importancia médica, durante todo este estadio de desarrollo (Genta *et al.*, 2010). Se reporta que la actividad de la enzima en la hemolinfa, cuando el insecto se acaba de alimentar y en los días subsiguientes, oscila a lo largo del tiempo. En nuestro experimento observamos variaciones en la actividad conforme pasa el tiempo después de que los insectos se alimentaron, tanto insectos control como en insectos infectados, presentando una mayor actividad estos últimos específicamente a las 24 h.p.a y 6 d.p.a (Figura 8.8). La sobreactivación del sistema de melanización se puede asociar a la presencia del parásito, ya que se realizaron pruebas de correlación (Figura 8.5 y 8.7), en las que se observa que este sistema es independiente de la cantidad de alimento que ingirieron los insectos (Coeficiente de correlación de Pearson $p > 0.1$). Esto puede indicar que este sistema está sobreactivado por la presencia del parásito, lo

que puede deberse a que hay un aumento en la carga de microorganismos ingeridos en la sangre y sólo en algunos puntos aumenta drásticamente. Las diferencias observadas en estos dos puntos experimentales pueden deberse a modificaciones en las proteínas de superficie que el parásito presenta para evadir la respuesta del sistema inmune del insecto o como parte de sus transformaciones durante el ciclo de vida. Esto podría significar que el parásito ha establecido una relación con el insecto a lo largo del tiempo para que, aun cuando pueda activar los sistemas de defensa del organismo, no se vea afectada la viabilidad y sobrevivencia del parásito. Una vez que la sobreactivación ha pasado, la actividad continúa sin diferencias. Sin embargo podría evaluarse a días posteriores que incluirían una transformación más del parásito dentro del insecto, en donde se esperaría que el sistema se sobreactivará nuevamente, debido a la expresión de diferentes proteínas de superficie que presentarían los parásitos (Kollien and Schaub, 2000).

Schaub en 1994, sugiere que este parásito es un subpátogeno del insecto, lo que quiere decir que cuando el triatomino se encuentra en condiciones óptimas el sistema inmune no se ve comprometido, sin embargo, si el insecto es sometido a algún tipo de estrés, nutricional o por otros microorganismos, los que se encuentren infectados con el tripanosoma serán los más afectados. A su vez, se sabe que el gasto energético que requiere la activación de la PO es considerable (González-Santoyo and Córdoba-Aguilar, 2011) por lo que los artrópodos no pueden activarlo constitutivamente. Es por esto que si los insectos infectados presentan un aumento en la actividad de la enzima PO, gastarán a larga mayores recursos que los no infectados, lo que podría comprometer su sobrevivencia a largo plazo o frente a condiciones adversas. Debido a esto, el parásito podría activar este mecanismo sólo en ciertos momentos, que coinciden con los cambios de estadio y eventualmente pasan a no

ser detectados por el sistema. Lo anterior debido a las relaciones simbióticas que se han establecido a lo largo del tiempo en el que los triatominos han sido vectores de *T. cruzi*.

9.2. Concentración de NO

El NO en insectos se necesita para llevar a cabo muchas de las funciones del organismo, como molécula de señalización, en el sistema nervioso, incluso como vasodilatador en la saliva de hematófagos (Müller, 1997; Davies, 2000). También se encuentra íntimamente relacionado con el sistema inmune en respuesta a infecciones virales, bacterianas y de protozoarios, como cinetopláستidos y *Plasmodium* (Herrera-Ortíz *et al.*, 2004; Whitten *et al.*, 2007; Herrera-Ortíz *et al.*, 2011). En estudios previos se ha reportado un aumento en la concentración de nitritos inorgánicos en la hemolinfa cuando los insectos se encuentran infectados con *Plasmodium*, *T. rangeli* y *T. cruzi* (Whitten *et al.*, 2007, Herrera-Ortíz *et al.*, 2011).

En un estudio de medición de NO en *R. prolixus* (Whitten *et al.*, 2007), se midió la concentración de esta molécula cuando los insectos se encontraban infectados con *T. cruzi* en los primeros días y dos semanas posteriores a la infección. Reportan que los picos de NO durante la infección se presentan en el intestino anterior durante la infección temprana, en el intestino posterior en ambos puntos analizados y en el recto dos semanas post infección; en la hemolinfa no se reportan diferencias dos semanas posteriores a la infección. En este trabajo se analizó la concentración de nitritos inorgánicos dentro de los primeros 10 d.p.a., antes de que el parásito concluya su ciclo de vida dentro del insecto (Figura 8.9). No se observan diferencias significativas entre los insectos infectados y no infectados con *T. cruzi*, aunque en general observamos una mayor concentración en los controles,

principalmente al día 2 y 10p.a. (Figura 8.8). Esta ausencia de diferencias puede deberse a que el NO se esté liberando en otros órganos como respuesta a la infección, lo que sucede en el modelo sudamericano en intestino, cuerpo graso y glándulas salivales, además de hemolinfa en fases tardías de la infección (Whitten *et al.*, 2007). En el modelo del presente estudio la hemolinfa parece no estar participando en este mecanismo de respuesta inmune, lo que puede deberse a la cepa de *T. cruzi* utilizada, la biología del vector o las interacciones de ambos.

En el caso del NO en las primeras h.p.a. se observa una tendencia de aumento en los insectos control, mientras que en los infectados sucede lo contrario, sin embargo, estas diferencias no son significativas. Con esto podemos concluir que el NO en hemolinfa no presenta cambios debidos a la presencia del parásito en el insecto, sin embargo, no se puede descartar que sea inducido en otros órganos.

9.3. Expresión de AMPs

Los AMPs se han asociado a la respuesta inmune contra bacterias y hongos principalmente (Bulet *et al.*, 1999), aunque también se han asociados a las infecciones de parásitos en insectos (Boulanger *et al.*, 2002; Herrera-Ortíz *et al.*, 2011) en donde se propone que éstos modifican su expresión de acuerdo al paso del protozoario en el sistema del insecto (Boulanger *et al.*, 2006). En el presente trabajo se estudió la expresión de cinco péptidos antimicrobianos en diferentes órganos de insectos triatominos cuando se encontraban infectados con *T. cruzi*.

Reportes previos para los péptidos analizados en este estudio describen su secuencia y la expresión a diferentes d.p.a. en intestinos, cuerpo graso y glándulas salivales (Araújo *et al.*, 2006; Waniek *et al.*, 2009). Este es el primer reporte en el que se evalúa la presencia de estas secuencias en el genoma de insectos mexicanos y su expresión en relación a la infección por *T. cruzi*.

Los iniciadores diseñados en este trabajo se tomaron a partir de secuencias de mRNA, por lo que al probarlos con templado de DNA genómico observamos un aumento en el peso esperado del amplificado (Cuadro 3), lo que indica que estos genes tienen desde 120 hasta 300 pb que no se transcriben dentro de su secuencia. En el caso de los reportes para *def 3* y *def 4* se añadió la secuencia genómica (Waniek *et al.*, 2009), en donde se indica la ubicación de los intrones y exones de estos genes. La diferencia en pares de bases que reportan entre la secuencia genómica y el mRNA es consistente con las diferencias que nosotros observamos en el peso del amplificado de estos genes entre el DNA genómico y el mRNA.

Araújo y cols. en 2006 reportaron una lisozima de *T. brasiliensis* que denominaron *lys 1*, la cual es muy similar en secuencia a otro péptido caracterizado en *T. infestans* (Balczun *et al.*, 2008). Este AMP se encontró expresado en el cardias y el estómago a diferentes d.p.a. En nuestro estudio, localizamos su expresión en intestino anterior o estómago, intestino posterior y cuerpo graso, en insectos sin alimentar y alimentados a 10 y 15 d.p.a. (Figura 8.13 y 8.14). Esta molécula la encontramos en el cuerpo graso de los insectos infectados únicamente, lo que indica que la presencia del parásito está induciendo la transcripción de este péptido. La lisozima puede funcionar en la digestión de los insectos

o como microbicida. Puede ser que la inducción de esta molécula sirva para controlar la población de parásitos en el intestino y que no crezca de tal manera que pueda afectar al insecto; si se hubiera registrado un aumento en la transcripción en el intestino podría esperarse que sea requerida para la digestión, debido a la competencia de nutrientes con el parásito. Sin embargo, desconocemos la ubicación final de la molécula, ya que el cuerpo graso es un productor de AMPs que puede exportar a otros órganos del insecto (Arrese and Soulages, 2010). Por lo que los AMPs producidos en este órgano podrían ser transportados para cubrir requerimientos de otros. Esto indica que la lisozozima puede estar siendo utilizada como mecanismo de defensa contra *T. cruzi*.

Los genes para *def 3* y *4* fueron reportados en los siguientes órganos: intestino anterior, posterior y cuerpo graso (Waniek *et al.*, 2009). *Def 3* se encontró en ninfas de 5° estadio de *T. brasiliensis* en intestino posterior y cuerpo graso a los 3 y 5 d.p.a. sin embargo, a los 10 y 15 d.p.a. se encontró expresada únicamente en cuerpo graso. En este trabajo se encontró este péptido en insectos sin alimentar y alimentados a los días 10 y 15 en intestino anterior, posterior y cuerpo graso. Esta molécula presentó un aumento en la expresión del mensajero cuando los insectos estaban infectados en el intestino anterior y posterior a los 10 d.p.a., misma que disminuyó al día 15 en intestino anterior y se mantuvo en intestino posterior; sin embargo, esta expresión diferencial del péptido no fue estadísticamente significativa con respecto al grupo control, por lo que no se puede concluir si es inducida por la presencia del parásito en el tracto digestivo del insecto como un mecanismo de defensa. En el cuerpo graso no se observó una diferencia en la expresión del mensajero para este AMP. Sin embargo, las diferencias que observamos entre la especie mexicana y sudamericana indica que ambos vectores se encuentran sometidos a diferentes presiones

ambientales que pueden ocasionar esta expresión diferencial de componentes del sistema inmune, y por lo tanto, la respuesta hacia microorganismos tales como *T. cruzi*.

El mensajero para *def 4* se expresa en los órganos ya mencionados a 5 d.p.a. en *T. brasiliensis*, disminuye en el estómago al día 10 y aumenta al día 15 (Waniek *et al.*, 2009), mientras que en *T. pallidipennis* la expresión permanece constante en estos días, sin importar la infección por el parásito. En cuerpo graso se observó que la expresión de este gen es igual en ambos grupos en los dos días analizados. Esto indica que la transcripción de este gen en particular no se altera por la presencia del parásito en estómago y cuerpo graso. El patrón de expresión del mensajero de este gen es similar en nuestro modelo y lo reportado para insectos sudamericanos (Waniek *et al.*, 2009).

El comportamiento en la expresión de *def 4* en el intestino posterior difiere del que se ha reportado (Waniek *et al.* 2009), ya que se encontró el mRNA de esta molécula en insectos sin alimentar y al día 15 únicamente en insectos sin infectar, mientras que el reporte de *T. brasiliensis* muestra una expresión a 5 y 10 d.p.a. La expresión de este AMP fue de interés debido a que se expresa únicamente en los insectos control cuando el contenido intestinal comienza a llegar al recto, lo que podría indicar que si hay algún microorganismo que sea el que induce la expresión de este gen es muy probable que el parásito lo haya eliminado o que por algún mecanismo el parásito inhiba la expresión de este gen como ha sido sugerido para *R. prolixus* recientemente (Castro *et al.*, 2012).

Waniek y cols. en 2011 realizaron el primer trabajo en donde correlacionan la tasa de transcripción del gen para *def 1* con la infección de *T. cruzi* en insectos sudamericanos. En el presente trabajo evaluamos la transcripción en insectos sin alimento e infectados y sin

infectar a 10 y 15 d.p.a. (Figura 8.15). Una diferencia con el grupo sudamericano, es que el mRNA para *def 1* se expresa únicamente en el intestino anterior de insectos sin alimento y 10 y 15 d.p.a en insectos control e infectados. Por otro lado, en ninguno de estos días se observan diferencias entre insectos infectados y no infectados con *T. cruzi* y la tasa de transcripción permanece constante en todos los puntos analizados. En los insectos sudamericanos se reporta la expresión del mensajero del gen en el intestino posterior y se observan diferencias significativas entre la condición no infectado e infectado con *T. cruzi* (Waniek *et al.*, 2011), lo que indica que la expresión de estas moléculas del sistema inmune está variando entre especies de vectores y que a su vez puede ser inducida o no por diferentes cepas del parásito.

El gen para *lis 2* se reportó como una lisozima inusual en el tracto digestivo de *T. infestans* (Balczun *et al.*, 2008). En el presente trabajo se diseñaron iniciadores a partir de la secuencia de mRNA reportada para la especie sudamericana y se probaron en DNA genómico, en donde se obtuvo un amplificado mayor al de peso esperado, que puede indicar la presencia de intrones dentro de la secuencia del gen. Sin embargo, cuando se probaron utilizando como templado cDNA no se obtuvo ningún amplificado. Lo indica que esta lisozima no se está transcribiendo en ninguno de los órganos analizados, o que los iniciadores diseñados comprenden alguna región del gen que no se transcribe y es por eso que no podemos amplificar el mRNA. Con las otras moléculas de AMPs analizadas, existen diferencias muy marcadas en la expresión de estos péptidos entre los insectos sudamericanos y la especie mexicana utilizada en este trabajo. Por lo que se debe trabajar más con esta molécula en particular para obtener la secuencia genómica y posteriormente evaluar su expresión en diferentes órganos del insecto.

En el caso de los genes que modifican su expresión cuando el insecto está infectado con *T. cruzi*, como son *def 4* y *lis 1*, en el futuro se debería dar seguimiento a la ubicación final del péptido y analizar si tienen actividad tripanocida o estarían actuando como mensajeros para la expresión de otras moléculas con este efecto. También se podría esperar que los AMPs no tengan acción tripanocida pero jueguen un papel en algunas interacciones del parásito con el vector y la microbiota del intestino.

En otros modelos de tripanosomas y sus vectores se ha encontrado que los parásitos inducen la transcripción y producción de AMPs tanto a nivel sistémico (Boulanger *et al.*, 2002) como local (McGwire and Kullkarni 2010), lo que indica que las diferencias que encontramos en este trabajo, entre los insectos infectados con *T. cruzi* y los insectos control, en la transcripción de lisozimas y defensinas responden a un comportamiento compartido entre los diferentes modelos de vector-parásito, siendo este el primer reporte en vectores no dípteros.

10. CONCLUSIONES

❖ Se observó un aumento en la actividad del sistema de melanización de los insectos infectados en comparación con los no infectados a las 24 h.p.a y a los 6 d.p.a.

❖ La concentración de NO en hemolinfa no presenta diferencias significativas entre los insectos infectados y no infectados a diferentes d.p.a. lo que puede indicar que este protozooario no activa mecanismos del sistema inmune que utilicen NO o que esta molécula esté actuando como mensajero en otros tejidos del insecto diferentes a la hemolinfa.

❖ Se reportó la presencia de genes para dos lisozimas y tres defensinas en el genoma de *T. pallidipennis*.

❖ Se analizó la expresión del mensajero de una lisozima y tres defensinas en diferentes órganos de insectos sin infectar e infectados con *T. cruzi* a 10 y 15 d.p.a. Se encontró que el gen *lis 1* se transcribe sólo en el cuerpo graso de los insectos infectados. La expresión de *def 4* se observa sólo en vectores sin infectar al día 15p.a. En el resto de los órganos no se observan diferencias entre las condiciones analizadas en este trabajo.

❖ Este es el primer reporte de expresión de AMPs en el vector mexicano *T. pallidipennis* y se observó que ésta difiere de la que se ha reportado para insectos sudamericanos, tanto en los niveles de transcripción como en los órganos en los que se presenta dicha expresión.

❖ Este trabajo indica que el vector mexicano *T. pallidipennis* expresa moléculas del sistema inmune en respuesta a la infección, y que éstas difieren entre los órganos y los días analizados.

11. PERSPECTIVAS

- Analizar la actividad del sistema de melanización de insectos infectados con *T. cruzi* en coinfección con bacterias o algún otro microorganismo patógeno.
- Evaluar la concentración de NO en diferentes tejidos en varios puntos experimentales.
- Analizar la expresión de la enzima óxido nítrico sintasa en vectores infectados y no infectados.
- Clonar las secuencias para *lis 1*, *def 1*, *def 3* y *def 4* para obtener los péptidos purificados y evaluar la ubicación del producto final en el insecto.

12. REFERENCIAS

- Adamo, S. A. 2004. Estimating disease resistance in insects: phenoloxidase and lysozyme-like activity and disease resistance in the cricket *Gryllus texensis*. *Journal of Insect Physiology* 50: 209-216.
- Araújo, C.A.C., P. J. Waniek, P. Stock, C. Mayer, A. M. Jensen, G. A. Schaub. 2006. Sequence characterization and expression patterns of defensin and lysozyme encoding genes from the gut of the reduviid bug *Triatoma brasiliensis*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 36: 547-560.
- Arrese, E. L. and J.L. Soulages. 2009. Insect Fat Body: Energy, Metabolism, and Regulation. *Annual Review of Entomology* 55: 207-225.
- 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 (Suppl. I): 219-222.
- Azambuja, P., E. S. Garcia, N. A. Ratcliffe. 2005. Gut microbiota and parasite transmission by insect vectors. *Trends in Parasitology* 21:568-572.
- Balczun, C., E. Knorr, H. Topal, C. K. Meiser, A. H. Kollien, G. A. Schaub. 2008. Sequence characterization of an unusual lysozyme gene expressed in the intestinal tract of the reduviid bug *Triatoma infestans* (Insecta). *Parasitology Research* 102: 229-232.
- Beard, C. B., E. M. Dotson, P. M. Pennington, S. Eichler, C. Cordon-Rosales, R. V. Durvasula. 2001. Bacterial symbiosis and paratransgenic control of vector-borne Chagas disease. *International Journal of Parasitology* 31:621-627.
- Botto-Mahan, C., G. Ossa, R. Medel. 2008. Direct and indirect pathways of fitness-impact in a protozoan-infected kissing bug. *Physiological Entomology* 33:25-30.

- Botto-Mahan, C., P. E. Cattan, R. Medel. 2006 Chagas disease parasite induces behavioral changes in the kissing bug *Mepraia spinolai*. *Acta Tropica* 98: 219-223.
- Boulanger, N., P. Bulet, C. Lowenberger. 2006. Antimicrobial peptides in the interactions between insects and flagellate parasites. *Trends in Parasitology* 22:262-268.
- Boulanger, N., R. Brun., L. Ehret-Sabatier, C. Kunz, P. Bulet. 2002. Immunopeptides in the defense reactions of *Glossina morsitans* to bacterial and *Trypanosoma brucei brucei* infections. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 32: 369-375.
- Bulet, P., C. Hetru, J.L. Dimarcq, D. Hoffman. 1999. Antimicrobial peptides in insects; structure and function. *Developmental and Comparative Immunology* 23: 329-344.
- Bulet, P., R. Stöcklin. 2005. Insect Antimicrobial Peptides: structure, properties and gene regulation. *Protein and Peptide Letters* 12:3-11.
- Buscaglia, C. A. and J. M. Di Noia, 2003. *Trypanosoma cruzi* clonal diversity and the epidemiology of Chagas' disease. *Microbes and Infections* 5: 419-427.
- Busvine, J. R. (Ed.). 1975. Arthropod vectors of disease. The Camelot Press Ltd, Southampton. U.K.
- Camgyun, H., S. Aksoy. 2006. Innate immune response regulate trypanosome parasite infection of tse-tse fly *Glossina morsitans morsitans*. *Molecular Microbiology* 60: 1194-1204
- Carcavallo R. U., J. E. Rabinovich, 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.
- Castro, D. P, C. S. Morales, M. S. Gonzalez, N. A. Ratcliffe, P. Azambuja, E. S. Garcia. 2012. *Trypanosoma cruzi* immune response modulation decreases microbiota in *Rhodnius prolixus* gut and is crucial for parasite survival and development. *PLoS ONE* 7: e36591. doi:10.1371/journal.pone.0036591.

- Chen, C. C. and C. S. Chen. 1995. *Brugia pahangi*: Effects of melanization on the uptake of nutrients by microfilariae *in vitro*. *Experimental Parasitology* 81: 72-78.
- Christensen, B. M., J. Li, C. C. Chen, A. J. Nappi. 2005. Melanization immune response in mosquito vector. *Trends in Parasitology* 21: 192-199.
- Daquinag, A. C., S. Nakamura, T. Takao, Y. Shimonishi, T. Tsukamoto. 1995. Primary structure of a potent endogenous Dopa-containing inhibitor of phenol oxidase from *Musca domestica*. *Proceeding of the National Academy of Sciences of USA* 92: 2964-2968.
- Davies, S. A. 2000. Nitric oxide signalling in insects. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 30: 1123-1138.
- Dimopoulos, G., D. Seeley, A. Wolf, F. C. Kafatos. 1998. Malaria infection of the mosquito *Anopheles gambiae* activates immune-responsive genes during critical transmission stages of the parasite life cycle. *EMBO Journal* 17: 6115-6123.
- Dujardin, J. P., J. Schofield, F. Panzera. 2002. Los vectores de la Enfermedad de Chagas. Academie Royale des Sciences d'Outre-Mer. Bélgica.
- Dumontiel, E., S. Gourbière, M. Barrera-Pérez, E. Rodríguez-Félix, H. Ruiz-Peña, O. Baños-López, J. Ramírez-Sierra, F. Menu, J. E. Rabinovich. 2002. Geographic distribution of *Triatoma dimidiata* and transmission dynamics of *Trypanosoma cruzi* in the Yucatan peninsula of Mexico. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 67: 176-183.
- Elliot, S. L., F. R. Adler, M. W. Sabelis. 2003. How virulent should a parasite be to its vector. *Ecology* 84: 2564-2574.
- Espinosa-De Aquino, W. 2010. Perfil proteico de la hemolinfa de *Triatoma pallidipennis* infectado con *Trypanosoma cruzi*. Tesis de licenciatura (Biología). Facultad de Ciencias, UNAM.

- Espinoza, B., T. Rico, S. Sosa, E. Oaxaca, A. Vizcaino-Castillo, I. Martínez. 2010. Mexican *Trypanosoma cruzi* *T. cruzi* I strains with different degrees of virulence induce diverse humoral and celular immune response in a murine experimental infection model. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2010: 890672.
- 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.
- Garver, L. S., L. Baton, G. Dimopoulos. 2008. Mosquito Immunity to the Malaria Parasite. En: *Insect Immunology*. Beckage N.E. (Ed). Academic Press.
- 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.
- Genta, F. A., R. S. Souza, E. S. Garcia, P. Azambuja. 2010. Phenol oxidase from *Rhodnius prolixus*: Temporal and tissue expression patter and regulation by ecdysone. *Journal of Insect Physiology* 56: 1253-1259.
- Gomes, S. A. O., D. Feder, E. S. Garcia, P. Azambuja. 2003. Supression of the prophenoloxidase system in *Rhodnius prolixus* orally infected with *Trypanosoma rangeli*. *Journal of Insect Physiology* 44:553-560.
- González-Cappa, S. and E. Durante de Isola. 1994. Vectores transmisores triatominos, “vinchucas”, En.). *Enfermedad de Chagas*. Storino R. y J. Milei (Ed). Morsby Doyma. Argentina, Buenos Aires.
- González-Santoyo, I. and A. Córdoba-Aguilar. 2011. Phenoloxidase: a key component of the insect immune system. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 142:1-16
- Grayson, M. (Ed). 2010. Chagas Disease. *Nature* 465. Suppl. S3-S22.
- Gullan, P. J. (Ed.). 2005. *The insects: an outline of entomology*. Blackwell. E.U.A.

- Guzmán-Bracho, C. 2001. Epidemiology of Chagas disease in Mexico: an update. *Trends in Parasitology* 17: 372-376.
- Herrera-Ortíz A., J. Martínez-Barnette, N. Smit, M. H. Rodríguez, H. Lanz-Mendoza. 2011. The effect of nitric oxide and hydrogen peroxide in the activation of the systemic immune response of *Anopheles albimanus* infected with *Plasmodium berghei*. *Developmental and Comparative Immunology* 35:44-50.
- Herrera-Ortíz, A., H. Lanz-Mendoza, J. Martínez-Barnette, S. Hernández-Martínez, C. Villareal-Treviño, L. Aguilar-Marcelino, M. H. Rodríguez. 2004. *Plasmodium berghei* ookinetes induce nitric oxide production in *Anopheles pseudopunctipennis* midguts cultured in vitro. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 34:893-301.
- Hu, Y. and S. Aksoy. 2005. An antimicrobial peptide with trypanocidal activity characterized from *Glossina morsitans morsitans*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 35:105-115.
- Jiménez, M. L., J. Linas, C. Palacios. 2003. Infection rates in *Dipetalogaster maximus* (Reduviidae: Triatominae) by *Trypanosoma cruzi* in the Cape region, Baja California Sur, Mexico. *Journal of Medical Entomology* 40:18-21.
- Jiménez-Cortéz, J. G. 2008. Variación temporal en expresión de un ornamento, tamaño corporal, reservas energéticas respuesta inmune y supervivencia en machos de una libélula territorial. Tesis de Maestría (Maestría en Ciencias Biológicas). Facultad de Ciencias, UNAM.
- Kanost, M. R. and M. J. Gorman. 2008. Phenoloxidasas in insect immunity. En: *Insect Immunology*. Beckage N.E. (Ed). Academic Press.
- 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.

- Kollien, A. H. and G. A. Schaub. 2000. The Development of *Trypanosoma cruzi* in Triatominae. *Parasitology Today* 16:381-387.
- Kollien, A. H., P. J. Waniek, A. J. Nisbet, P. F. Billingsley, G. A. Schaub. 2004. Activity and sequence characterization of two cysteine proteases in the digestive tract of the reduviid bug *Triatoma infestans*. *Insect Molecular Biology* 13: 569-579.
- Kollien, A. H., S. Fechner, P. J. Waniek, G. A. Schaub. 2003. Isolation and characterization of a cDNA encoding for a Lysozyme from the gut of the Reduviid bug *Triatoma infestans*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 53: 134-145.
- Lent, H. and 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.
- 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.
- Luckhart, S. Y. Vodovotz, L. W. Cui, R. Rosenberg. 1998. The mosquito *Anopheles stephensi* limits malaria parasite development with inducible synthesis of nitric oxide. *Proceeding of the National Academy of Sciences of USA* 95: 5700-5705.
- Martínez, F. H., G. C. Villalobos, A. M. Cevallos, P. D. I. Torre, J. P. Laclette, R. Alejandre-Aguilar, B. Espinoza. 2006. Taxonomic study of the *Phyllosoma* complex and other *Triatominae* (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.
- Martínez-Ibarra, J. A., N. M. Bárcenas-Ortega, B. Noguera-Torres, R. Alejandre-Aguilar, M. Lino-Rodríguez, E. Magallón-Gastélum, V. López-Martínez, J. Romero-Nápoles. 2001. Role of two *Triatoma* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) species in the

transmission of *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) to man in the west coast of Mexico. *Memories Institute Oswaldo Cruz* 96:14-144.

- McGwire, B. and M.M. Kullkarni. 2010. Interactions of antimicrobial peptides with *Leishmania* and trypanosomes and their functional role in host parasitism. *Experimental Parasitology* 126: 397-405
- 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.
- Monteón, V. M., R. Furuzawa-Carballeda, A. Alexandre-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.
- Moya, A. and A. Latorre. 2004. Las concepciones internalista y externalista de la evolución biológica. *Ludus Vitalis* 21: 179-196.
- Müller, U. 1997. The nitric oxide system in insects. *Progress in Neurobiology* 51:363-381.
- Nakamura, A., R. Stiebles, M. R. Fantappiè, E. Fialho, H. Massuda, M. F. Oliveira. 2007. Effects of retinoids and juvenoids on moult and phenoloxidase activity in the blood-sucking insect *Rhodnius prolixus*. *Acta Tropica* 103: 222-230.
- Nation, J. L. (Ed). 2008. *Insect Physiology and Biochemistry*. CRC Press. Florida, U.S.A.
- Nigam, Y., I. Maudlin, S. Welburn, N. A. Ratcliffe, 1997. Detection of phenoloxidase activity in the hemolymph of tsetse flies, refractory and susceptible to infection with *Trypanosoma brucei rhodesiense*. *Journal of Invertebrate Pathology* 69:279–281.
- Noireau, F. P. Diosque. A. M. Jansen. 2009. *Trypanosoma cruzi*: adaptation to its vectors and ist hosts. *Sciences* 40: 26-35.

- Oaxaca-Hernández, E. 2005. Expresión de quimiocinas en modelo murino de infección con cepas de *Trypanosoma cruzi* que exhiben diferentes grados de virulencia. Tesis de licenciatura (Biología). Facultad de Estudios Profesionales Iztacala, UNAM.
- Organización Panamericana de la Salud (PAHO). 2006. Estimación cuantitativa de la Enfermedad de Chagas en las Américas.
- PAHO (Organización Panamericana de la Salud). 2006. Estimación cuantitativa de la Enfermedad de Chagas en las Américas.
- Paskewitz, S. M., B. M. Christensen. 1996. Immune responses of vectors. En: *The Biology of Disease Vectors*. Beaty B. and W.C. Marquat (Ed.). U.S.A
- Rassi Jr., A., A. Rassi, J. A. Marin-Neto. 2010. Chagas disease. *Lancet*. 375: 1388-1402.
- Rockstein, M. (Ed). 1973. *The physiology of insecta*. N.Y., U.S.A.
- Santos-Bush, C. A. 1979. American tripanosomiasis: Chagas' disease. *Experimental Parasitology* 19: 63-100.
- Schaub, G. A. 1989. Does *Trypanosoma cruzi* stress its vector. *Parasitology Today* 5: 185-188.
- Schaub, G. A. 1994. Pathogenicity of trypanosomatids on insects. *Parasitology Today* 10: 2463-468.
- Schaub, G. A. 2009. Interactions of trypanosomatids and triatomines. *Advances in Insect Physiology* 37: 177-242.
- Van-Heusden, M. C. 1996. Fat Body and Hemolymph. En: *The Biology of Disease Vectors* Beaty B. and W.C. Marquat (Ed.). U.S.A.
- Vespa, G. N., F. Cunha., J. S. Silva. 1994. Nitric oxide is involved in control of *Trypanosoma cruzi*-induced parasitemia and directly kills the parasite *in vitro*. *Infect Immunology* 62:5177-5182.

- 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.
- Vizcaino-Castillo, A. C. 2007. Respuesta inmune en órganos blanco infectados con cepas mexicanas de *Trypanosoma cruzi*. Tesis de Maestría (Maestría en Ciencias Bioquímicas). Facultad de Química, UNAM.
- Waniek, P. J., A. M. Jansen, C. A. C. Araújo. 2011. *Trypanosoma cruzi* infection modulates the expression of *Triatoma brasiliensis def 1* in the midgut. *Vector Borne and Zoonotic Diseases* 11: 845-847.
- Waniek, P. J., H. C. Castro, P. C. Sathler, L. Miceli, A. M. Jansen, C. A. C. Araújo. 2009. Two novel defensin-encoding genes of the Chagas disease vector *Triatoma brasiliensis* (Reduviidae, Triatominae): Gene expression and peptide-structure modeling. *Journal of Insect Physiology* 55:840-848.
- Whitten, M., F. Sun, I. Tew, G. Schaub, C. Soukou, A. Nappi, N. Ratcliffe. 2007. Differential modulation of *Rhodnius prolixus* nitric oxide activities following challenge with *Trypanosoma rangeli*, *T. cruzi* and bacterial cell wall components. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 37: 440-452.
- World Health Organization (WHO). 2002. Control of Chagas Disease. WHO Technical Report series 905.
- Yassine, H. and M. A. Osta. 2010. *Anopheles gambiae* innate immunity. *Cellular Microbiology* 12: 1-9
- Zárate, L.G. and R. J. Zárate. 1985. A checklist of the Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) of Mexico. *International Journal of Entomology* 27: 102-127.