



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Caracterización de los péptidos <20 kDa presentes en la
hemolinfa de *Triatoma pallidipennis*.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

EVA PAULINA DÍAZ GARRIDO



DIRECTOR DE TESIS:
Dra. BERTHA ESPINOZA GUTIÉRREZ
2013



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.

JURADO ASIGNADO

Presidente: Dr. José Hugo Aguilar Díaz

Vocal: Dra. María del Carmen Guzmán Cornejo

Secretario: Dra. Bertha Josefina Espinoza Gutiérrez

1er Suplete: Dra. Deyanira Pérez Morales

2º Suplente: M. en C. Daniel Matías González Tokman

AGRADECIMIENTOS

La presente tesis fue dirigida por la Dra. Bertha Espinoza en el laboratorio de Tripanosomiasis Americana, en el Departamento de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas.

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

Agradezco al M. en C. Ignacio Martínez por su apoyo técnico en la infección de ratones con *Trypanosoma cruzi* utilizados en este trabajo.

Se agradece a la M. en C. Wendy Espinoza de Aquino por su asesoría técnica.

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

DEDICATORIA

A mis papás.

A mis amigas de toda la carrera Yared, Carolina, Brenda, Fer y Andrea, siempre apoyándome, apapachándome y dándome ánimos en todo, las quiero infelizillas!

A Alejandro Argudin ¡¡Finalmente!! Gracias por todo, por tu amistad, dedicación, tiempo, asesorías y cuidados. Gracias por ser una hermosa persona y permitirme ser parte de tu vida.

A mis compañeros de laboratorio Ale, Ana, Mariana, Gen-gen, Karla, Esteban y Luis por todo el apoyo brindado. Particularmente a Nacho por todas sus críticas, comentarios y asesorías a lo largo de este trabajo.

INDICE

I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCIÓN	2
II.1. Enfermedades Transmitidas por Vectores	2
II.2. Agente causal de la enfermedad de Chagas: <i>Trypanosoma cruzi</i>	3
II.2.a. Ciclo de vida del parásito	4
II.3. Mecanismos de transmisión	6
II.4. Fases de la Enfermedad	7
II.5. Epidemiología	8
II.6. Vectores Triatominos	9
II.6.a. Taxonomía	9
II.6.b. Distribución geográfica	10
II.6.c. Ciclo de vida de los triatominos	11
II.6.d. Características morfológicas y fisiológicas	12
II.6.e. Sistema circulatorio	14
III. ANTECEDENTES	16
IV. JUSTIFICACIÓN	17
V. HIPÓTESIS	17
VI. OBJETIVOS	18
VII. MATERIALES Y MÉTODOS	19
VII.1. Insectos Triatominos utilizados	19
VII.2. Alimentación de los insectos	19
VII.3. Extracción de hemolinfa	20
VII.4. Cuantificación de proteínas	20
VII.5. Separación de proteínas por electroforesis	21
VII.6. Análisis con lectinas	21

VII.7. Determinación de la actividad proteolítica por el método de SDS/PAGE con gelatina como sustrato enzimático	22
VII.8. Determinación de la actividad de lisozimas en hemolinfa	23
VII.9. Detección de pesos moleculares, densitometría y pruebas estadísticas	24
VIII. RESULTADOS	25
VIII.1. Perfil peptídico de la hemolinfa de <i>T. pallidipennis</i> durante las cinéticas de infección	25
VIII.2. Detección de cambios en los péptidos a lo largo de una cinética de infección	27
VIII.3. Caracterización de glicopéptidos por medio de lectinas biotiniladas	30
VIII.4. Detección de actividad proteolítica en la hemolinfa	33
VIII.5. Detección de actividad de lisozimas tipo "c" en hemolinfa	34
IX. DISCUSIÓN	36
X. CONCLUSIÓN	41
XI. PERSPECTIVAS	41
XII. BIBLIOGRAFÍA	42
XIII. ANEXO	48

I. RESUMEN

Los insectos pertenecientes a la subfamilia *Triatominae* (Hemiptera: Reduviidae) son los vectores de *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), parásito flagelado agente causal de la Tripanosomiasis Americana, una de las principales enfermedades parasitarias en el continente Americano. Hoy en día las enfermedades transmitidas por vectores siguen siendo un problema de salud a nivel mundial, debido principalmente a que existen pocos estudios sobre la biología y fisiología de estos insectos y por lo tanto no se han desarrollado programas efectivos de control. Trabajos previos demostraron que la hemolinfa de *Triatoma pallidipennis* es muy rica en proteínas de altos pesos moleculares, sin embargo, la zona de péptidos menor a 20 kDa (<20 kDa) no había sido estudiada a detalle. Por lo que, en este trabajo se estudiaron los cambios que tiene el sistema circulatorio (hemolinfa) a nivel peptídico de *T. pallidipennis*, vector de importancia epidemiológica en México, provocados por la ingesta de sangre y por la presencia de *T. cruzi* en el tracto digestivo, así como la caracterización de dichos péptidos por medio de lectinas biotiniladas. En este trabajo se identificó la presencia de 11 péptidos menores a 20 kDa de 20, 18, 17, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9 y 2 kDa de los cuales sólo 3 tuvieron algún cambio en su presencia y/o abundancia a lo largo de los días en los que se analizó la hemolinfa: El de 10 kDa que se comenzó a observar en insectos no infectados al día 41 post alimentación y en insectos infectados un péptido de ese mismo peso molecular, al día 31 post infección. El péptido de 20 kDa aumentó la intensidad de su concentración en ambos grupos de insectos (infectados y no infectados) justo después de que fueron alimentados, sin embargo, ese aumento solo fue significativo al día 10 p.a. en ambos grupos de insectos. El péptido de 18 kDa tuvo una disminución significativa en su concentración en ambos grupos al día 1 post alimentación, tal disminución tiene una correlación entre la presencia del parásito y los días post alimentación. La caracterización de péptidos se realizó por medio de 5 lectinas biotiniladas, de las cuales todas reconocieron al menos un péptido glicosilado. De éstas, la lectina de *Artocarpus integrifolia* (que reconoce residuos de galactosa, galactosil y N-acetilgalactosamina) reconoció un total de 6 glicopéptidos de los pesos moleculares de 9, 10, 11, 14, 17 y 18 kDa; la lectina de *Psophocarpus tetragonolobus* (que reconoce N-acetil y D-galactosamina) reconoció 3 péptidos de 11, 17 y 18 kDa; la lectina de *Triticum vulgare* que reacciona con N-acetilglucosamina, reconoció 1 glicopéptido de 14 kDa; la lectina Concanavalina A (reconoce residuos de glucosa y manosa) reconoció 2 péptidos glicosilados de 20 y 18 kDa; y la lectina de *Arachis hypogaea*, que reacciona con residuos de N-acetilgalactosamina y galactosa sólo reconoció un péptido de 13 kDa. Finalmente, identificamos la presencia de una lisozima de tipo "c" en hemolinfa de insectos 15 días post alimentación con un peso molecular aproximado de 14 kDa por medio de ensayos de actividad de lisozimas. Este trabajo concluye que la alimentación es un factor que influye sobre la concentración de 2 péptidos (20 y 18 kDa) y que la presencia del parásito en el tracto digestivo de los insectos afecta la glicosilación de algunos péptidos.

II. INTRODUCCIÓN

II.1. ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR VECTORES

Las Enfermedades Transmitidas por Artrópodos (ETA's) han sido durante miles de años una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en los seres humanos. Los artrópodos son los principales vectores de algunas de las enfermedades infecciosas más devastadoras a nivel mundial (Tabla 1). Enfermedades tales como la malaria, que tiene como vector a insectos pertenecientes al género *Anopheles*; el dengue transmitido por mosquitos del género *Aedes*; la leishmaniasis transmitida por dípteros de la familia Psychodidae y *Phlebotomus* o la Tripanosomiasis Americana, que tiene como vectores a hemípteros pertenecientes a la subfamilia Triatominae. Hoy en día, todas ellas siguen siendo un problema de salud mundial (Colwell, *et al.*, 2011; Elston, *et al.*, 2004).

Tabla 1. Principales Enfermedades Transmitidas por Vectores (ETA's).

Enfermedad	Prevalencia	Cantidad de personas en riesgo	Distribución	Vectores
Malaria	273 millones	2100 millones	Trópicos y subtrópicos	Mosquitos del género <i>Anopheles</i>
Tripanosomiasis Africana	0.5 millones	50 millones	África	Moscas tse-tse
Tripanosomiasis Americana	16-18 millones	120 millones	América central y Latinoamérica	Insectos triatominos
Leishmaniasis	12 millones	350 millones	África, Asia y Latinoamérica	Moscas de la arena
Dengue	50 millones	300 millones	Asia, África y América	Diferentes mosquitos

Tomado de Lehane, 2005.

La Enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis Americana es una zoonosis (se transmite entre animales y humanos) parasitaria transmitida por vectores que tiene por agente causal al protozoario *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*). Esta enfermedad fue descrita por primera vez en 1909 por el brasileño Carlos Chagas (Rassi, *et al.*, 2010).

II.2. AGENTE CAUSAL DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS: *Trypanosoma cruzi*

Trypanosoma cruzi es un protozooario flagelado perteneciente al orden de los Kinetoplastidos, familia Trypanosomatidae. Una de las principales características del orden de los Kinetoplastidos es la presencia de DNA extranuclear localizado en una región conocida como kinetoplasto. *Trypanosoma cruzi* posee una mitocondria sola con un genoma condensado en una estructura semejante a una gran red formada topológicamente por minicírculos y maxicírculos, dando como resultado al DNA del kinetoplasto (kDNA) (Schamber- Reis, 2011).

La posición taxonómica de *T. cruzi* es la siguiente (Lavine, *et al.*, 1980):

Reino	Protista
Subreino	Protozoa
Phylum	Sarcomastigophora
Subphylum	Mastigophora
Clase	Zoomastigophorea
Orden	Kinetoplastida
Familia	Trypanosomatidae
Género	<i>Trypanosoma</i>
Especie	<i>Trypanosoma cruzi</i>

El parásito presenta diferentes morfologías durante su ciclo de vida, tanto en el insecto vector como en el hospedero mamífero, reconociéndose en total 4 formas: epimastigotes y tripomastigotes metacíclicos, tripomastigotes sanguíneos y amastigotes.

- Tripomastigote metacíclico: Tienen un tamaño aproximado de 20-25 μm y un diámetro de 2 μm , el kinetoplasto se localiza posterior al núcleo y es voluminoso (De Souza, 2002). Morfológicamente son muy semejantes a los tripomastigotes sanguíneos (Figura 1-a). Los tripomastigotes metacíclicos se diferencian a partir de epimastigotes por el proceso de metacicloogénesis.
- Tripomastigote sanguíneo: Ésta forma se localiza en tejidos y en torrente sanguíneo de los hospederos vertebrados infectados. Este estadio se desarrollan a partir de amastigotes intracelulares, cabe destacar que tienen capacidad infectiva (Figura 1-a).

- Epimastigote: Mide de 20-40 μm de longitud, el núcleo se encuentra en el centro de la célula y el kinetoplasto se localiza en la parte anterior al núcleo (Figura 1-b), de ahí se forma el flagelo, quedando una parte en la porción anterior dando inicio a la membrana ondulante. Este estadio tiene capacidad replicativa, pero no infectiva (Almeida-de-Faria, *et al.*, 1999; De Souza, 2002).
- Amastigote: También llamado esferomastigote o forma aflagelada, es la forma replicativa en el hospedero vertebrado, tiene un diámetro aproximado de 2-5 μm . El kinetoplasto se observa como un cuerpo oscuro muy cerca del núcleo, en la región media de la célula (Figura 1-c). Es la forma intracelular, prácticamente es inmóvil ya que carece de flagelo y membrana ondulante, tiene alta capacidad de replicación por división binaria dentro del citoplasma de células de diferentes tejidos como: corazón, músculo, hígado y bazo (Almeida-de-Faria, *et al.*, 1999; Carrada-Bravo, 2004).

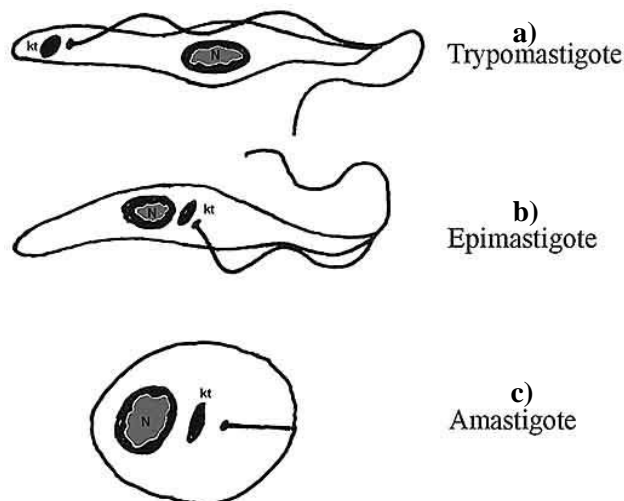


Figura 1. Formas morfológicas de *T. cruzi*, mostrando la posición del Kinetoplasto (kt) y núcleo (N) (Rossi, *et al.*, 2003).

II.2.a. CICLO DE VIDA DEL PARÁSITO

El ciclo de vida de *T. cruzi* consiste de 4 estadios de desarrollo (Figura 2). El parásito entra al hospedero mamífero cuando el insecto vector defeca en la cercanía de su picadura. Las heces contienen los estadios infectivos (tripomastigotes metacíclicos), los cuales son internalizados al rascarse o a través de las membranas mucosas, para luego infectar células cercanas. Una vez adentro de las células, el tripomastigote metacíclico se diferenciará a amastigote y se replicará en el citoplasma de las células. Después de varias rondas de replicación, se diferenciará en tripomastigotes sanguíneos, los cuales tendrán acceso al torrente sanguíneo y eventualmente infectarán nuevas células, para así perpetuar la infección (Álvarez, *et al.*, 2011).

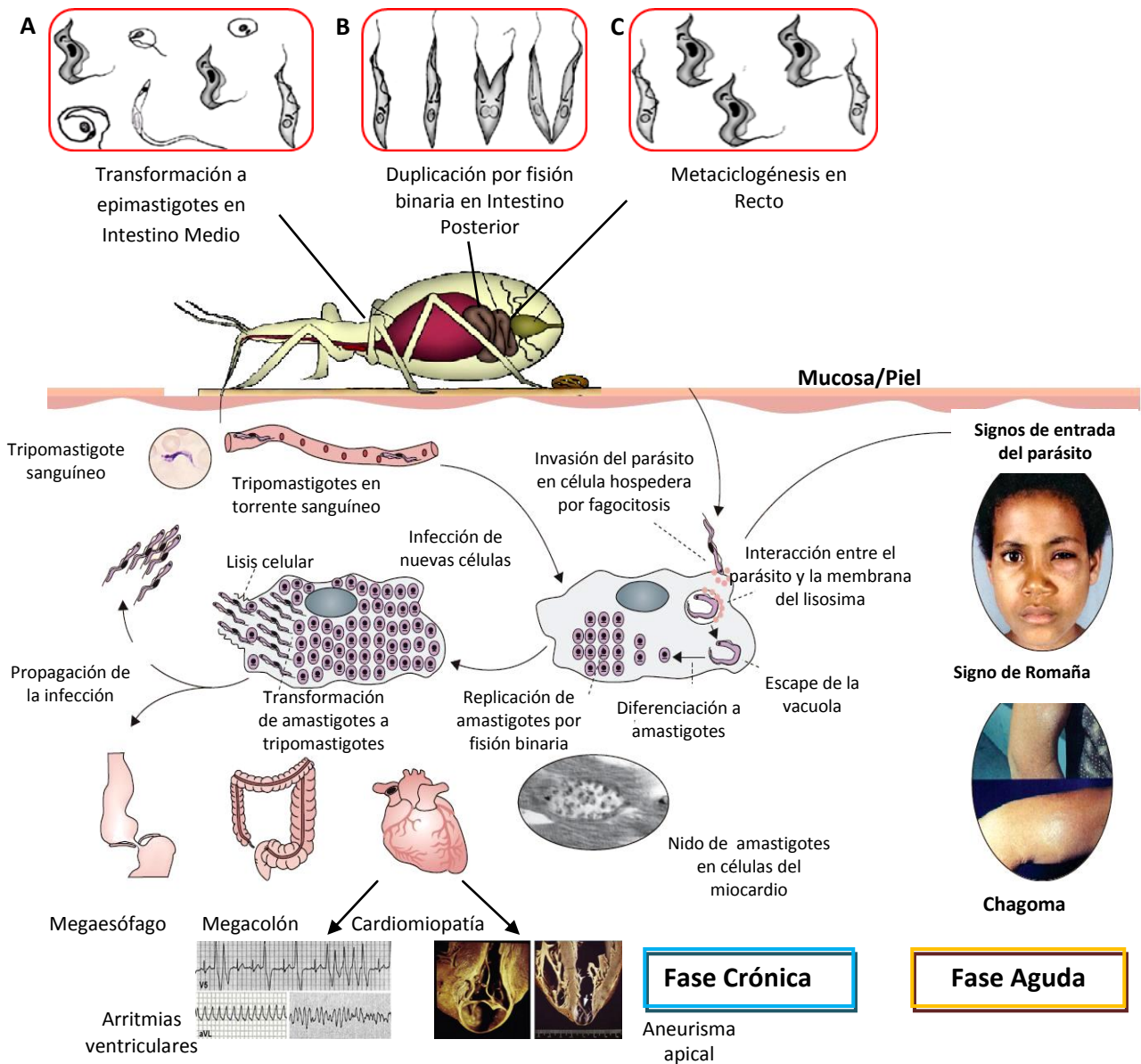


Figura 2. El ciclo de vida de *T. cruzi* se desarrolla en un hospedero vertebrado y un vector artrópodo. El ciclo comienza cuando el insecto triatomino no infectado se alimenta de un mamífero infectado con *T. cruzi*, ingiriendo tripomastigotes presentes en el torrente sanguíneo, éstos pasarán al trato digestivo del insecto (A) donde en el Intestino medio se transformarán a epimastigotes (B). Posteriormente, los epimastigotes comenzarán a duplicarse por fisión binaria en el intestino posterior y finalmente llegarán al recto, donde sufrirán metacicloogénesis y saldrán en las heces, siendo éste el estadio infeccioso de *T. cruzi* (C). Los tripomastigotes metacíclicos son el estadio que pueden infectar cualquier tipo de célula nucleada del vertebrado y convertirse en amastigotes, estadio replicativo que terminará por lisis la célula. Algunos amastigotes infectarán células contiguas y otros se transformarán a tripomastigotes sanguíneos. El principal órgano que se daña es el corazón, causando arritmias ventriculares, trombosis y/o aneurisma apical; aunque también se pueden dañar otros órganos como: tracto digestivo Megaesófago, megacolón y bazo. Modificado de García, *et al.*, 2007; Rassi, *et al.*, 2010 y Rassi, *et al.*, 2012.

Durante la alimentación de los insectos, los tripomastigotes sanguíneos encontrados en el mamífero infectado son ingeridos por el insecto. Después de algunos días en el estómago (parte anterior del intestino medio) de los insectos, la mayoría de los tripomastigotes sanguíneos se transformarán a epimastigotes (Figura 2-A). Principalmente en el intestino (parte posterior del intestino medio), los epimastigotes se dividirán rápidamente por división binaria (Figura 2-B) y se adherirán a la membrana perimicrovellosa, la cual es secretada por la células del epitelio intestinal de la región posterior (De Souza, *et al.*, 2010). Posteriormente, en el recto, una proporción de epimastigotes se unirán a la cutícula rectal y se transformarán en tripomastigotes metacíclicos (Figura 2-C), los cuales serán excretados con las heces y la orina, para posteriormente ser capaces de infectar hospederos mamíferos (Azambuja, *et al.*, 2005).

II.3. MECANISMOS DE TRANSMISIÓN

La infección por *T. cruzi* puede darse por diferentes vías. La transmisión hacia humanos y otras 150 especies de mamíferos ocurre principalmente y de forma natural por el insecto vector, coloquialmente conocido como chinche. Sin embargo, también se puede adquirir por otras vías no vectoriales, como la transfusión sanguínea o transplante de órganos de personas infectadas, así como por vía congénita, ingestión de sustancias contaminadas y más raramente, por la infección accidental en el laboratorio (Rassi, *et al.*, 2010).

La donación de órganos y sangre, así como la infección por vía congénita son los principales modos de transmisión en países no endémicos, sin embargo, debido a la migración de pobladores originarios de regiones donde reside el vector hoy en día se ha generado en un problema de salud a nivel mundial (Figura 3).

En muchos países, la transfusión sanguínea es reconocida como la segunda vía más importante, después de la vectorial; este tipo de transmisión es la vía más importante para países industrializados (Wendel, 2010). El riesgo de transmisión del parásito por una transfusión de una unidad de 500 ml de sangre total oscila entre 12 y 20% (WHO, 2002).

En el caso de la transmisión por vía congénita, en años pasados se limitaba a zonas rurales endémicas del vector, hoy en día se notifica en mayor medida en ciudades donde no hay transmisión vectorial y a donde han migrado desde zonas rurales, mujeres infectadas y en edad reproductiva (Ghul, 2009). Cabe destacar que el riesgo de transmisión varía según la cepa de *T. cruzi*, la parasitemia de la

madre, la existencia de lesiones en la placenta y la región geográfica. Este riesgo de transmisión se ha estimado en un promedio de 5% (WHO, 2002).

La transmisión por vía oral, involucra a los vectores de manera indirecta. Ocurre al consumir alimentos que contienen Triatominos o sus heces y también por consumir carne de hospederos mamíferos silvestres infectados. Esta vía de transmisión es responsable de la mayoría de los brotes reportados, principalmente en áreas donde residen los insectos vectores (Nóbrega, *et al.*, 2009; Rassi, *et al.*, 2010).

II.4. FASES DE LA ENFERMEDAD

La enfermedad se caracteriza por la presencia de 2 fases: aguda y crónica (Figura 2).

FASE AGUDA:

Esta fase dura aproximadamente 2 meses a partir de contraer la infección por el parásito y se define como la fase en donde el parásito puede encontrarse en la sangre. Durante esta fase una gran cantidad de parásitos circulan en la sangre. En la mayoría de los casos no hay síntomas o son muy leves; cuando se presentan pueden incluir fiebre, dolor de cabeza, hinchazón de las glándulas linfáticas, dolor muscular, dificultad al respirar, dolor abdominal o en pecho. Aproximadamente un 50% de las personas que han sido picadas por los insectos vectores, presentan lesiones cutáneas (Figura 2) como inflamación local, presente justo donde el insecto introdujo su probóscide (Chagoma) o hinchazón de los párpados de un ojo (signo de Romaña), cuando la inoculación del parásito se dio vía mucosa conjuntival (WHO, 2002).

FASE CRÓNICA:

Esta fase comienza de 2 a 3 meses después de haber iniciado la infección y se divide en: Fase crónica asintomática y crónica sintomática. La fase asintomática es el momento de la infección en donde los pacientes tienen serología positiva para Chagas, pero carecen de síntomas clínicos, ya que el número de parásitos en circulación es reducido y no se puede detectar con facilidad al parásito. La duración de esta fase aún no está determinada. Por otro lado, durante la fase crónica sintomática, el parásito permanece oculto principalmente en corazón y músculos del tracto digestivo. Se caracteriza por una disfunción de los tejidos de los órganos afectados, debido a una hipertrofia de las capas musculares, así como fibrosis, que trae como consecuencia un engrosamiento de la pared de los órganos (Rassi, *et al.*, 2010). Más de un 30% de los pacientes sufren desórdenes cardíacos y aproximadamente un 10% desórdenes digestivos (generalmente alargamiento del esófago o colón), neurológicos o una combinación de ambos. Años

después de la infección se puede conducir a una muerte repentina o a ataques al corazón debido a la destrucción progresiva del músculo cardiaco (WHO, 2002).

II.5. EPIDEMIOLOGÍA

La Tripanosomiasis Americana es endémica de 22 países del continente Americano. Según la Organización Panamericana de la Salud y la Organización Mundial de la Salud, se estima que de 7.7 a 10 millones de personas están crónicamente infectadas con *T. cruzi*, con un aproximado de 10 a 14 mil muertes al año (WHO, 2006 y OPS, 2006).



Figura 3. Principales rutas migratorias de Latinoamericanos, los números indican un estimado del total de personas infectadas en zonas no endémicas (Rodríguez Coura & Albajar Viñas, 2010).

Inicialmente se trataba de una enfermedad autóctona de zonas rurales y cálidas, donde habitaba el vector de forma natural y el cual se ocultaba en las grietas de las casas hechas de adobe y palma, picando a sus habitantes por las noches. Era una zoonosis que afectaba sólo a comunidades marginales de Latino-América. Actualmente, la epidemiología de la enfermedad ha cambiado, ya que la urbanización ha provocado que la enfermedad se volviera una infección en ciudades de Latinoamérica y la reciente migración ha llevado a personas infectadas con el parásito a países donde no existía (Figura 4) dando como resultado que la Enfermedad de Chagas se convirtiera en un problema de salud principalmente en

E.U.A., Canadá y otros países de Europa, donde un importante número de casos de personas infectadas se han identificado (Rassi, *et al.*, 2010).

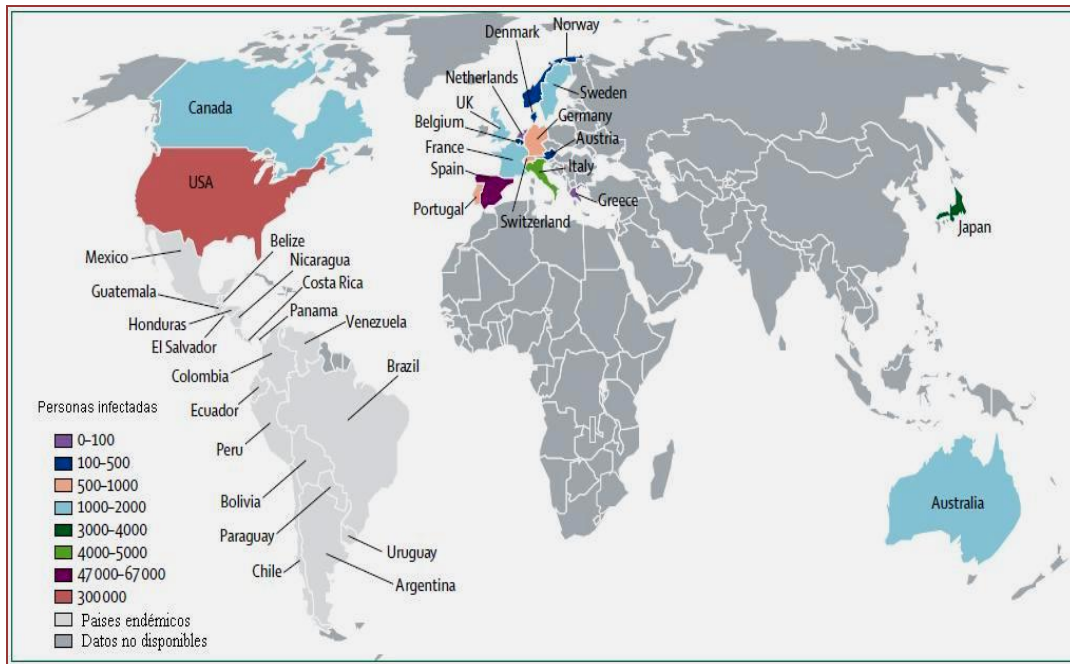


Figura 4. Distribución mundial de la Tripanosomiasis Americana, se presenta el número estimado de personas infectadas con *Trypanosoma cruzi* por país. Modificado de Rassi, *et al.*, 2010.

II.6. VECTORES TRIATOMINOS

Los vectores de *T. cruzi* son insectos que pertenecen al orden Hemiptera. Actualmente, a nivel mundial se conocen 137 especies de Triatominos (Martínez-Hernández, *et al.*, 2010). Cabe destacar que sólo algunas especies de 3 géneros (*Triatoma*, *Rhodnius* y *Panstrongylus*) fungen como vectores de *T. cruzi* entre humanos y animales domésticos en zonas endémicas, siendo también esos 3 géneros los que presentan una mayor riqueza en especies (Carcavallo, *et al.*, 2000; WHO, 2002).

II.6.a TAXONOMÍA

Los Triatominos pertenecen al orden Hemiptera, el cual se caracteriza por poseer un aparato bucal de tipo succionador. En el suborden Heteroptera se encuentra la familia Reduviidae y la subfamilia Triatominae (Hemiptera: Reduviidae), la única hematófaga en ese grupo (Dujardin, *et al.*, 2002). Esta subfamilia contiene 6 tribus con 18 géneros, siendo el género *Triatoma*, que pertenece a la tribu Triatomini, el más distribuido, con un aproximado de 70 especies (Panzera, 1997; Hypsa, *et al.*, 2002). La clasificación se muestra a continuación (citado en Carcavallo, *et al.* 2000).

Reino: Animalia

Phyllum: Artrópoda

Clase: Insecta

Subclase: Pterygota

Orden: Hemiptera

Suborden: Heteroptera

Familia: Reduviidae

Subfamilia: Triatominae

- Triatomini
- Linshcosteini
- Tribus - Rhodniini
- Cavernicolini
- Bolboderini
- Alberproseniini

La clasificación de los Triatominos está basada principalmente en sus características morfológicas. Las especies del género *Triatoma* se agrupan en 9 complejos, uno de ellos es el complejo *Phyllosoma* (Figura 5), el cual es el más distribuido en México (Martínez, *et al.*, 2006). El complejo *Phyllosoma* ha sido revalidado como género *Meccus*, ya que dentro de sus características externas poseen testículos muy diferentes tanto en tamaño como en forma a los de otros miembros de la subfamilia Triatominae (Carcavallo, *et al.*, 2000). Las especies pertenecientes a este complejo son: *Triatoma pallidipennis*, *Triatoma longipennis*, *Triatoma bassolsae*, *Triatoma phyllosoma*, *Triatoma mazzottii*, *Triatoma mexicana* y *Triatoma picturata* (Martínez, *et al.*, 2006).

II.6.b. DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA

La mayoría de las especies de estos insectos vectores se distribuyen entre los paralelos 45°S y 40°N y a una altitud mayor de 1500 metros sobre el nivel del mar. Estos insectos prevalecen en áreas localizadas entre los trópicos, sin embargo, algunas especies se localizan en zonas templadas con inviernos fríos (WHO, 2002).

En México se han reportado alrededor de 33 especies de esta subfamilia. Estas especies han sido distribuidas en 7 géneros: *Dipetalogaster*, *Eratyrus*, *Paratriatoma*, *Panstrongylus*, *Belminus*, *Triatoma* y *Rhodnius*. Es importante mencionar que 28 de estas especies son endémicas y 23 han sido reportadas por estar infectadas de manera natural con *T. cruzi* (Martínez, *et al.*, 2006). De las especies presentes en

México, la mayoría son genéticamente muy cercanas. Cabe destacar que todas las especies han sido detectadas entre las latitudes 32°43'5" y 14°32'45" (Guzmán-Bracho, 2001). Entre las especies endémicas del país, se encuentran las pertenecientes al complejo *Phyllosoma*, el cual está distribuido desde el centro hasta el sur del país. Debido al alto porcentaje de infección de éstas especies, este complejo es de gran importancia epidemiológica (Martínez-Hernández, *et.al.*, 2010).

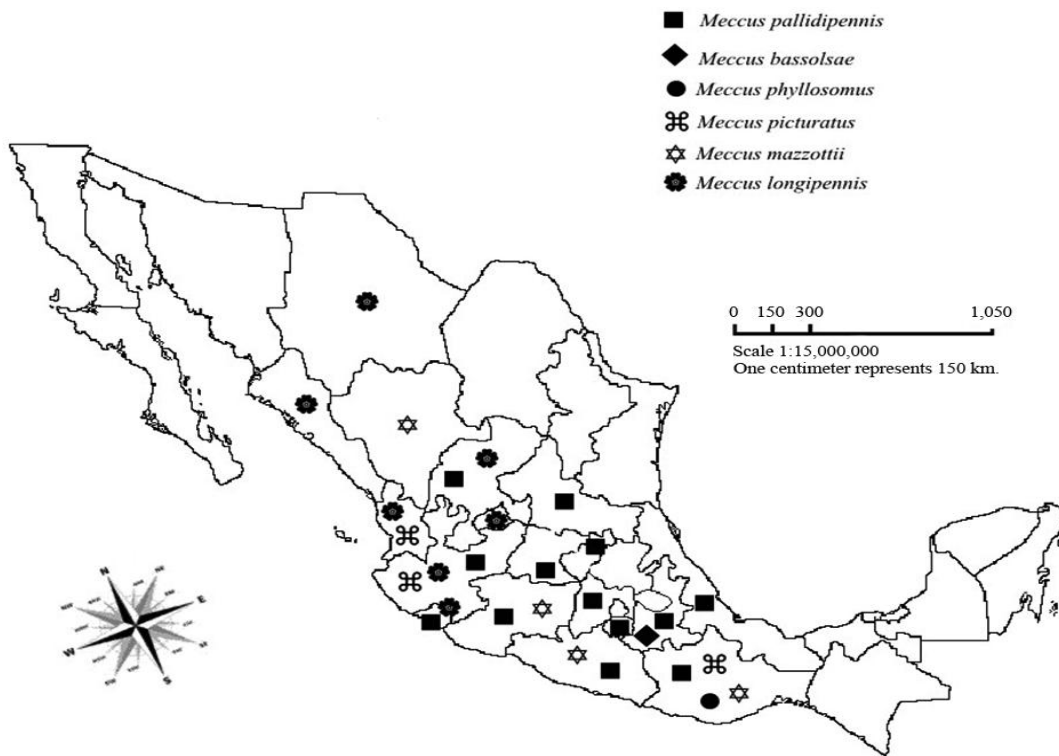


Figura 5. Mapa de México mostrando la distribución de las especies de Triatominos pertenecientes al complejo *Phyllosoma* (Martínez-Ibarra, *et.al.*, 2008).

II.6.c. CICLO DE VIDA DE LOS TRIATOMINOS

Los Triatominos presentan un desarrollo de tipo hemimetábolo (también conocido como metamorfosis incompleta o simple). En este tipo de desarrollo, los insectos después de la eclosión del huevo, pasan por 5 estadios ninfales antes de llegar al estado adulto o imago (Figura 6). Las ninfas difieren de los adultos por el tamaño y por poseer un desarrollo incompleto tanto de alas como de aparato reproductor. El desarrollo completo del insecto puede durar de 6 meses a un año, dependiendo de la especie, de los factores abióticos y del suministro de alimento que tengan. Las hembras pueden poner de 100 a 600 huevos en la mayoría de las especies y cabe mencionar que estos insectos son hematófagos en todos los estadios del ciclo de vida. En cada uno de los estadios, estos insectos

requieren una ingestión de alimento de alrededor de 6-12 veces su propio peso corporal (aunque en ocasiones es menor), tal ingestión activa receptores de hormonas (ecdisona) que llevan al desarrollo de una nueva cutícula (ecdisis) y con ello el origen de la muda del siguiente estadio ninfal o adulto (Noireau, *et al.*, 2009; Schaub, 2009).

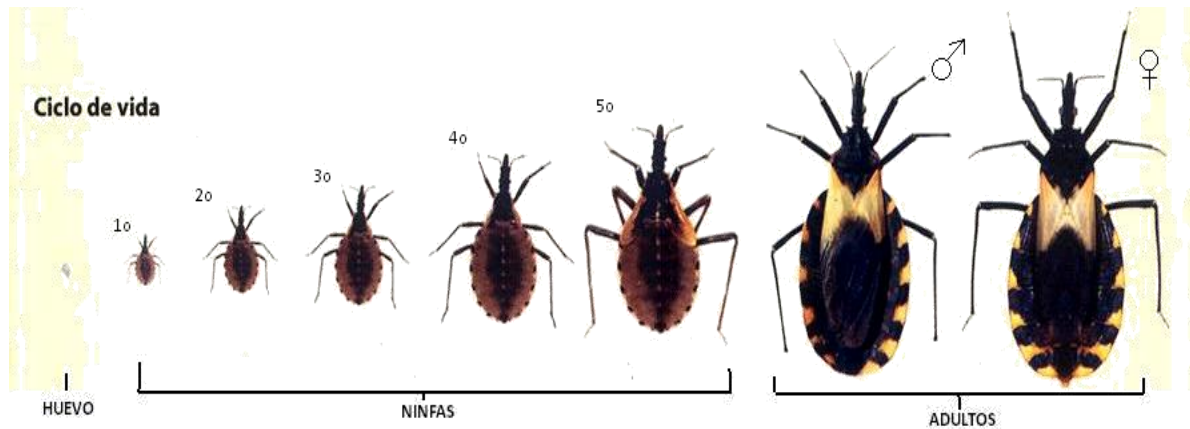


Figura 6. El ciclo de vida de *T. pallidipennis* consta de 5 estadios ninfales después de la eclosión del huevo, para finalmente llegar al estado adulto. Las hembras se logran diferenciar de los machos, por tener el extremo final del tórax en forma de "v". Folleto realizado por la Secretaría de Salud.

II.6.d. CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS Y FISIOLÓGICAS

Los Triatominae tienen una probóscide rectilínea, de calibre estrecho, sus mandíbulas están adaptadas para perforar superficies suaves, presentando una membrana articular entre el segundo y tercer segmento del rostro, que permite la rectitud del mismo (Figura 7). El tamaño de estos insectos varía dependiendo de su estadio ninfal, desde unos pocos milímetros (recién que eclosiona el huevo), hasta aproximadamente 3 cm o más (adulto), dependiendo de la especie (Dujardin, *et al.*, 2002; Noireau, *et al.*, 2009).

La adaptación a la hematofagia, que marca la aparición de los Triatominae, está asociada a la costumbre de frecuentar los nidos de aves y madrigueras de pequeños mamíferos, construidos de materiales vegetales donde abundan fitófagos y predadores (Dujardin, *et al.*, 2002). Esta adaptación es una de sus características biológicas, incluyendo a todos los estadios ninfales y adultos. La hematofagia es la habilidad para obtener y digerir sangre proveniente de vertebrados. Dicha habilidad ha sido un evento clave en la evolución de las ETA's, debido principalmente a que la capacidad reproductiva de los artrópodos aumenta con ésta fuente de nutrientes.

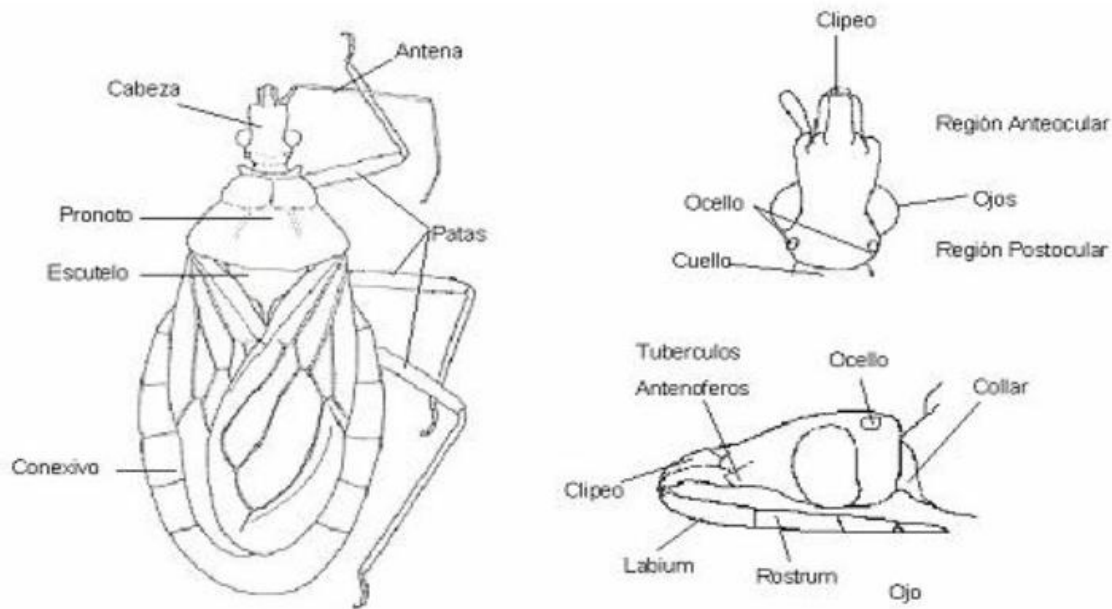


Figura 7. Morfología externa de la porción dorsal y acercamiento a la cabeza de un insecto triatomino. Tomado de Lent & Wygodzinsky, 1979.

La hemoglobina (Hb) es la proteína más abundante en la sangre de los vertebrados, alcanzando concentraciones por arriba de 150mg/mL y comprende el 60% del total de las proteínas de la sangre; por tal motivo, la degradación de la Hb en el sistema digestivo de insectos hematófagos, da como resultado la liberación de grandes concentraciones de grupos hemo (grupo prostético de la Hb). El grupo hemo es una molécula tóxica, debido a su capacidad para formar especies reactivas de oxígeno (ERO's) (Graca-Souza, *et al.*, 2006). Por ello, la adaptación a la hematofagia es un proceso complejo que propició cambios anatómicos, fisiológicos e inmunológicos en los insectos que presentan esta característica. Las alteraciones más significativas ocurren en:

1. Las partes del aparato bucal, para facilitar el acceso de sangre.
2. En las glándulas salivales, para producir moléculas capaces de bloquear la hemostasia en vertebrados.
3. En el intestino medio, para neutralizar la lesión inmune mediada por la sangre de vertebrados, así como para optimizar la digestión y absorción de los componentes sanguíneos (Mejía, *et al.*, 2006).

En los insectos hematófagos, la sangre es almacenada en la parte anterior del intestino medio sin que la digestión suceda y poco a poco pasará a la parte posterior, donde hay una secreción de enzimas digestivas y es ahí donde se llevará a cabo la absorción de nutrientes. Así, sólo una pequeña cantidad de

alimento es digerida cada vez y por ello, estos insectos pueden sobrevivir durante largos periodos de inanición (Kollien & Schaub, 2000). Debido a que estos insectos presentan esta característica en todos los estadios de su ciclo de vida, su dieta carece de algunas vitaminas y nutrientes. Para contrarrestar dicha carencia de nutrientes, en el lumen del intestino anterior habitan simbioses, los que producen y proveen nutrientes faltantes, los cuales se pasan de generación en generación. Cabe destacar, que sin estos microorganismos las ninfas no podrían mudar satisfactoriamente al siguiente estadio del ciclo de vida (Beard, *et al.*, 2001; Lehane, 2005).

Otra característica que tienen estos insectos, es que durante el proceso de alimentación, la endocutícula abdominal de los insectos se plastifica, dando como resultado la distensión abdominal y produciendo así el proceso de defecación, ocasionando que los insectos puedan ingerir cantidades de sangre equivalentes a varias veces su peso corporal, como ya se mencionó anteriormente (Carcavallo, *et al.*, 1985).

II.6.e. SISTEMA CIRCULATORIO

Los insectos tienen un sistema circulatorio abierto, el cual consta de un fluido llamado hemolinfa que recorre toda la cavidad corporal, mejor conocida como hemocele. La hemolinfa es el principal almacén de agua de los insectos, y debido a que la respiración de estos organismos se da de forma traqueolar, la hemolinfa no participa en el transporte de O₂ o CO₂ (Paskewitz & Christensen, 1996).

La porción celular de la hemolinfa está compuesta por hemocitos, los cuales participan en la defensa innata contra la invasión de patógenos de diferentes formas: fagocitosis, encapsulación de materiales foráneos y coagulación, pero también en procesos como el almacenamiento/distribución de nutrientes o la síntesis de proteínas. La parte restante de la composición de la hemolinfa consta de iones, plasma, moléculas y una gran cantidad de aminoácidos libres (Paskewitz & Christensen, 1996). Los tipos de hemocitos mayormente reportados en la literatura según sus características morfológicas, histoquímicas y funcionales son: prohemocitos, células granulares (granulocitos), plasmotocitos, células esferulares (esferulocitos) y oenocitoides. Estos hemocitos han sido descritos en especies de diferentes ordenes, tales como: Lepidoptera, Diptera, Orthoptera, Blattaria, Coleoptera, Hymenoptera, Collembola y Hemiptera (Lavine & Strand, 2002).

La hemolinfa también consta de una gran cantidad de iones inorgánicos. Trabajos en insectos lepidópteros de las especies *Hyalophora cecropia* y *Manduca sexta* demostraron la presencia de sodio,

calcio, potasio y magnesio (Jungreis, *et al.*, 1972). Otra reportada es el azúcar trehalosa, la cual se encuentra en altas concentraciones en la hemolinfa, convirtiéndola en el principal azúcar de la hemolinfa (Gu, *et al.*, 2009).

Por otro lado, la porción proteica comprende un rango muy amplio de proteínas de diferentes pesos moleculares. Las proteínas más abundantes en la hemolinfa de insectos triatominos son las lipoforinas y las proteínas de almacenamiento, ambas involucradas en procesos de metamorfosis y desarrollo; en el caso de las hembras, también se encuentran proteínas precursoras de vitelogenina (Downer & Chino, 1985; Chinzei, *et al.*, 1993). Otro tipo de proteínas que se encuentran en la hemolinfa son las proteínas que se unen a grupos hemo, las cuales cruzan el epitelio del intestino (Paiva-Silva, *et al.*, 2002). Otras proteínas presentes en la hemolinfa son las lectinas, éstas son proteínas multivalentes que pueden aglutinar células, uniéndose a los residuos de azúcares de las superficies de las membranas (Mello, *et al.*, 1999).

La hemolinfa contiene en gran cantidad péptidos de bajos pesos moleculares, entre ellos neuropéptidos, lisozimas y péptidos antimicrobianos. Los neuropéptidos son secretados por medio del sistema nervioso hacia la hemolinfa, desempeñando principalmente un papel de hormonas y mediando diferentes procesos fisiológicos; sin embargo, se encuentran en tan bajas concentraciones que es difícil detectarlos (Chen, *et al.*, 2009).

La porción humoral de la hemolinfa está conformada por la rápida síntesis y liberación de diferentes tipos de péptidos antimicrobianos (AMP's) después de una infección microbiana. Estos péptidos han sido desarrollados por los insectos para combatir agentes patógenos y mediar una respuesta inmunológica. Estas moléculas tienen bajos pesos moleculares, generalmente son catiónicos y están conformados por menos de 100 residuos de aminoácidos (Ravi, *et al.*, 2011).

Es importante destacar que cuando los insectos hematófagos están en contacto con microorganismos presentes en el aire y en la superficie de donde se estén alimentando, tendrán un tipo de respuesta inmunológica. Reportes previos indican que el ingerir parásitos lleva a un tipo de respuesta local (por ejemplo, en el tejido del intestino) y que puede ser llevada vía sistémica (hemolinfa), provocando así, una respuesta inmune generalizada; de igual forma, el sólo ingerir sangre puede ser un factor acarreador de infecciones bacterianas (Boulanger, *et al.*, 2006).

III. ANTECEDENTES

III.1. Perfil proteico de *T. pallidipennis*

En el trabajo titulado “Perfil proteico de la hemolinfa de *Triatoma pallidipennis* infectado con *Trypanosoma cruzi*” (Espinoza-De Aquino, 2010), se realizaron cinéticas de infección (se examinó la hemolinfa a diferentes días post alimentación y post infección), para detectar si existían cambios en hemolinfa a nivel proteico debido a la presencia del parásito en el tracto digestivo. En ese trabajo, se observaron una gran cantidad de proteínas principalmente de altos pesos moleculares, siendo las más abundantes y constantes las correspondientes a los pesos moleculares de: 241, 196, 110, 70, 59, 47, 43, 21, 15 y 14 kDa. Por medio de anticuerpos policlonales, se detectaron los cambios en la expresión de las proteínas con mayor expresión (200, 110, 73, 64 y 45 kDa), observando una mayor cantidad de cambios para el día 41 post infección, ya que en el grupo de insectos no infectados se observó una mayor cantidad de proteínas a diferencia de la hemolinfa de insectos infectados con el parásito. Por otro lado, también se detectaron péptidos menores a 20kDa, entre ellos uno de 13 kDa que presentó una disminución en el grupo de insectos infectados para el día 3 y que fue disminuyendo a lo largo de la cinética de infección. Un péptido más pequeño de 6-5 kDa se expresó únicamente en insectos infectados y finalmente se detectó un péptido de 4 kDa que apareció y aumentó su presencia al día 31 y 41 post infección respectivamente. Ese trabajo concluye que *T. cruzi* podría estar afectando de manera indirecta a los componentes de el sistema circulatorio de *T. pallidipennis*, lo que podría estar relacionado con componentes del sistema inmune de los insectos, principalmente AMP’s.

IV. JUSTIFICACIÓN

La relevancia de estudiar a los péptidos producidos por los insectos con importancia médica, radica en el interés de conocer más sobre las formas en que los insectos median su relación con agentes patógenos del humano. Algunas de las moléculas importantes en la fisiología de los insectos se encuentran en el sistema circulatorio (hemolinfa), por ello el interés de enfocarnos en este fluido. Hoy en día, la información existente sobre proteínas de bajo peso molecular presentes en la hemolinfa de insectos Triatominos es escasa y en especies mexicanas, es nula. Por ello, la importancia de trabajar con especies mexicanas de esta subfamilia.

V. HIPÓTESIS

Los péptidos menores a 20 kDa (péptidos antimicrobianos y lisozimas) tienen un papel determinante dentro del sistema inmune de insectos ante la presencia de algún patógeno, por lo que debe de existir una modificación en la expresión de éstas cuando *T. pallidipennis* se alimente y/o se exponga a la presencia de *T. cruzi*.

VI. OBJETIVO

Analizar si la alimentación y la infección con *T. cruzi* modifica la presencia y naturaleza de los péptidos menores de 20 kDa en la hemolinfa de *T. pallidipennis*.

VI.1. Objetivos Particulares

- ◆ Estudiar la presencia de péptidos menores a 20 kDa en la hemolinfa de insectos alimentados e infectados con *T. cruzi*.
- ◆ Identificar los cambios en la abundancia de los péptidos en la hemolinfa de insectos durante cinéticas de post alimentación y post infección.
- ◆ Determinar si existen cambios en la glicosilación de los péptidos en la hemolinfa de *T. pallidipennis* durante una infección con *T. cruzi*.
- ◆ Determinar la presencia de lisozimas en la hemolinfa de *T. pallidipennis*.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

VII.1. Insectos Triatominos utilizados

El modelo de estudio de este trabajo consistió en ninfas de 5º estadio de *T. pallidipennis*, debido a que en este estadio los insectos contienen una mayor cantidad de hemolinfa, a diferencia de los otros 4 en el ciclo de vida (Nation, 2008). Los insectos se mantuvieron a una temperatura de 25° - 28°C en frascos de vidrio con tapas ventiladas y se dejaron en un periodo de inanición de 15 días después de que mudaron a 5º estadio.

Se realizaron 2 experimentos independientes (cinéticas de infección), cada una consistió en 2 grupos de insectos: grupo control, insectos sin infección con *T. cruzi* (C) y grupo experimental, insectos infectados con el parásito (E). El laboratorio ya contaba con la hemolinfa correspondiente a otro experimento independiente y con este se tuvo un total de 3 experimentos independientes (3 cinéticas de infección), el número de insectos por cada cinética fue:

- Cinética 1: Un total de 10 insectos, 5 correspondientes al grupo control y 5 al experimental.
- Cinética 2: Un total de 14 insectos, 7 insectos control y 7 experimentales.
- Cinética 3: Un total de 16 insectos, 8 insectos control y 8 insectos experimentales.

Los insectos utilizados para éste trabajo fueron obtenidos de una colonia de insectos, establecida en el laboratorio del Dr. Ricardo Alejandro del Laboratorio de Entomología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, del Instituto Politécnico Nacional.

VII.2. Alimentación de los insectos

Los insectos fueron alimentados con sangre de ratones cepa BALB/c. Los ratones fueron proporcionados por el bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas. Los insectos se pusieron en recipientes de plástico tapados con una malla de poro fino (3 insectos por recipiente). Los ratones se metieron a redes hechos con malla metálica, a modo de inmovilizar al ratón y permitir que los insectos pudieran alimentarse.

En el caso de los grupos experimentales, la primera alimentación consistió de sangre de ratón infectado con *T. cruzi* cepa Ninoa (MHOM/MX/1994/Ninoa), aislada a partir de un caso agudo en Oaxaca

(Monteón, *et.al.*, 1996), en su punto máximo de infección (2.5×10^6 parásitos por ml de sangre), mientras que los grupos control se alimentaron de ratones sin infectar.

Los insectos pertenecientes a las cinéticas 1 y 3 se alimentaron 2 veces más (posterior a la primera alimentación) con ratones sanos: el día 17 y el día 31 post la primera alimentación. Mientras que los insectos de la cinética 2, sólo se alimentaron al día 43 posterior a la primera alimentación. La diferencia entre los tiempos de la alimentación se debe a que hubo problemas para conseguir los ratones con los que se alimentarían los insectos. Por lo que, para el análisis de los resultados se consideraron 3 experimentos independientes hasta los 10 días post alimentación y dos experimentos independientes para el día 17 a 41 post alimentación.

La presencia de *T. cruzi* a lo largo de las cinéticas se comprobó revisando las heces a partir del día 17 post infección (p.i.) y después de este día, cada vez que se extrajo hemolinfa. Para revisar parásitos en heces, se colectaron las heces con ayuda de una pipeta y se diluyeron en PBS (dilución 1:50), 10 μ l de esa mezcla se utilizó para hacer el conteo de parásitos por medio de la cámara de Neubauer al microscópio óptico.

VII.3. Extracción de hemolinfa

La extracción de la hemolinfa se realizó a diferentes días: 0 (antes de alimentar a los insectos), 1 (justo después de que los insectos se alimentaran), 3, 10, 17, 31 y 41 post alimentación (p.a.). Para la extracción de la hemolinfa, se realizó una punción en la membrana localizada entre la coxa y el trocánter, justo en la unión entre la tercera extremidad con el tórax. Se ejerció un poco de presión en el abdomen para que la hemolinfa fluyera en mayor cantidad.

La hemolinfa se colectó con una micropipeta y se mezcló inmediatamente en relación 1:1 con buffer anticoagulante: 0.098mM NaOH, 0.14M NaCl, 0.017M EDTA, 0.041M Acido cítrico pH 4.5 (Mead *et.al.*, 1986) e inhibidores de proteasas (EDTA 0.5M, PMSF 200mM, Leupeptin 10mM y Pepstatin 1mM). Una vez colectada la hemolinfa, se centrifugó durante 6 minutos a 10 000 rpm para separar el paquete celular del plasma, el sobrenadante se colocó en nuevos viales y se mantuvo en congelación a -20°C hasta el momento de su uso.

VII.4. Cuantificación de proteínas

Se realizó una cuantificación de proteínas en cada muestra de hemolinfa basada en el método de Lowry, usando el kit DC Protein Assay de BioRad, utilizando una curva estándar con concentraciones conocidas de Albúmina de Suero Bovino (BSA). La absorbancia se leyó a 655nm.

VII.5. Separación de proteínas por Electroforesis

Para la separación de proteínas se empleó electroforesis en geles de acrilamida en presencia de Dodecil Sulfato de Sodio (SDS/PAGE) y buffer de Tricina en el cátodo. La metodología para los geles de Tricina SDS/PAGE es utilizada para separar de manera más eficaz las proteínas presentes en un rango de 1-100 kDa, teniendo como donador de iones a la Tricina en lugar de la glicina (Schägger & Von Jagow, 1987). Para la preparación de los geles se utilizaron vidrios de 0.75 mm de grosor y acrilamida al 15 % para el gel separador y al 4% para el concentrador (48.5% acrilamida, 1.5% bisacrilamida). Los geles se prepararon con un amortiguador de Tris-Cl/SDS con pH 8.45, glicerol 80%, agua bidestilada, persulfato de amonio al 10% v/v y N, N, N, N'-tetrametilen-diamina (TEMED). La preparación de las muestras consistió en hervirlas por 5 minutos en presencia del amortiguador de muestra de Tricina (150 mM Tris/HCl pH.7, 6% SDS, 6% β-mercaptol, 30% glicerol, 0.05% Coomassie blue G-250). Los geles se corrieron con 2 amortiguadores de corrida: amortiguador del cátodo ubicado en la parte superior de la cámara (Trizma base 0.1M, Tricina 0.1M y SDS 0.1%) y amortiguador del ánodo (Trizma base 0.2M pH 8.9) ubicado en la parte inferior de la cámara. Los geles corrieron a 30 V por 1 hr, luego se cambió el voltaje a 150 V por 2 hrs. Finalmente, los geles se fijaron en solución fijadora (50% metanol, 10% ácido acético) por 30 minutos, transcurrido ese tiempo se tiñeron en Coomassie blue (0.025% Coomassie blue G-250, 10% ácido acético) y se quitó el excedente con ácido acético 10%. Se utilizaron marcadores de peso preteñidos, para bajos pesos moleculares ("Dual Xtra Standar", BioRad 161-0377).

VII.6. Análisis con lectinas

El análisis de la identificación de péptidos glicosilados se realizó por medio de Western Blot (WB) y se utilizaron 5 lectinas biotiniladas:

1. Concanavalina A (ConA): reconoce residuos de glucosa y manosa (Pierce 39302).
2. Lectina de *Psophocarpus tetranogonolus* (PT): reconoce N-acetil y D-galactosamina (Sigma L-3014).
3. Lectina de *Arachis hypogaea* (PNA): reconoce N-acetilgalactosamina/galactosa (Sigma L-6135).

4. Lectina de *Artocarpus integrifolia* (JACALINA): reacciona con galactosa, galactosil y N-acetilgalactosamina (Sigma L-4650).
5. Lectina de *Triticum vulgaris* (Wheat Germ Agglutinin, WGA): reconoce N-acetilglucosamina. (Sigma L-5142).

Para el análisis con lectinas, sólo se utilizaron algunas muestras de las hemolinfas de los insectos pertenecientes a la cinética 3 (debido a que era la cinética de la cual se tenía una mayor cantidad de hemolinfa con respecto a las otras 2). Las muestras utilizadas abarcaron puntos clave dentro de las cinéticas de infección: antes de alimentar a los insectos (tiempo 0), justo después de la alimentación (tiempo 1), al día 17 y al día 41 post alimentación del grupo control y del grupo de insectos infectados. Se cargaron 6 µg de proteína por carril en geles de Tricina 15% acrilamida, con peines de 15 pozos. Una vez terminado el tiempo de corrida, se realizó la transferencia de proteínas a una membrana de nitrocelulosa (Schleicher & Schuell de poro 20µm) en un sistema de transferencia húmeda (BioRad). La transferencia se realizó a 100 V por 1 hr 10 minutos en presencia de un amortiguador de transferencia (trizma base 0.025 M, glicina 0.2 M y metanol 20%), las membranas se tiñeron con Rojo Ponceau (Sigma P7170) para corroborar que la transferencia se haya realizado correctamente (con ésta tinción temporal se logran observar las proteínas) y se destiñó con PBS.

Para el Western Blot, las membranas se bloquearon por 2 hrs en PBS-Tween20 al 0.5%, transcurrido ese tiempo se agregaron las lectinas a una concentración de 5 µg/µl para WGA y JACALINA y 10 µg/µl para PT, PNA y ConA, y se dejaron incubando durante 12 hrs a 4°C en agitación constante. Posteriormente, se hicieron 3 lavados de 10 minutos cada uno con PBS-Tween20 al 0.5%. Terminados los lavados, se les agregó la estreptavidina peroxidasa en una dilución de 1:2000 en PBS-Tween al 0.5% y se dejó incubando por 2 hrs, después se repitieron los lavados como se mencionó anteriormente y finalmente se agregó 3,3-diaminobenzidina (0.5 mg/ml) en PBS y peróxido de hidrógeno al 0.02%, para revelar la reacción.

VII.7. Determinación de la actividad proteolítica por el método de SDS/PAGE con gelatina como sustrato

Se determinó la actividad proteolítica en geles de acrilamida-bisacrilamida copolimerizados con gelatina como sustrato enzimático, la actividad proteolítica se visualizó por la presencia de bandas claras en el fondo azul del gel (Heussen & Dowdle, 1980). La técnica se llevó a cabo de la siguiente forma: se preparó un mini gel de acrilamida-bisacrilamida en buffer de Tricina al 15% con 2% (p/v) de gelatina

como sustrato. Se utilizó extracto de epimastigotes como control positivo y hemolinfa de *T. pallidipennis* extraída al día 15 p.a., las muestras se diluyeron en amortiguador de muestra (relación 1:1) sin β -mercaptoetanol (0.5 M Tris-HCl pH. 6.8, Glicerol 20%, SDS 2% y azul de bromofenol 1%), el gel corrió a 30 V por 1 hr y posteriormente a 150 V. Una vez que terminó la electroforesis, el gel se lavó 2 veces (cada lavado de 30 minutos) en Tritón X-100 al 2.5% (v/v) en agitación constante. Una vez terminados los lavados, se retiró la solución anterior del gel y se incubó en una solución amortiguadora de acetatos-DTT 1M (ácido acético 0.2 M, acetato de sodio 0.2 M) y se ajustó el pH a 7.2, tratando de igualar al pH de la hemolinfa en condiciones naturales, se dejó al gel incubando durante 18 hrs. Finalmente, el gel se tiñó con una solución de azul coomassie (azul coomassie 0.2%, metanol 45% y ácido acético 10%) durante 2 hrs y el excedente se quitó con desteñidor (ácido acético 10%/metanol 40%), el gel se dejó en esta solución hasta lograr observar un contraste entre el fondo azul y las bandas.

VII.8. Determinación de la actividad de lisozimas en hemolinfa, después de una electroforesis SDS/PAGE

Las lisozimas son enzimas digestivas que hidrolizan el enlace β -1,4 glicosídico del enlace entre el ácido N-acetilmurámico y N-acetilglucosamina del peptidoglicano de la pared celular de bacterias (Fiolka, *et al.*, 2005). El método utilizado se basa en colocar como sustrato a la bacteria *Micrococcus lysodeikticus* (*M. lysodeikticus*) disuelta en acrilamida y correr en la electroforesis a la molécula con probable actividad de lisozima (Audy, *et al.*, 1989). Por medio de esta técnica determinamos la actividad digestiva de esta enzima mediante la presencia de zonas transparentes en el fondo blanco del gel de poliacrilamida. La metodología que se siguió consistió en: preparar mini geles de acrilamida-bisacrilamida 15% en presencia de SDS, a la mezcla se le agregó 0.2 % (m/v) de *M. lysodeikticus* (Sigma 7070) partiendo de un stock de 2% (m/v) que previamente se esterilizó en la autoclave (15 min, 16psi a 121 °C); una vez que el gel polimerizó, se cargaron las muestras de hemolinfa, una vez cargadas se agregó el amortiguador de corrida a la cámara (SDS 1%, Trizma base 0.12 M y glicina 1 M) y justo en la parte donde se encuentra el cátodo se agregó de 20 a 30 ml de L-ácido ascórbico (Sigma A-7506) en una concentración final de 0.8%, el gel se corrió a 200 V por aproximadamente 50 minutos. Terminada la electroforesis, el gel se incubó de 16-18 hrs en una solución renaturalizante (Tritón X-100 1% (v/v) y acetato de sodio 25 mM a pH 4.5), terminado el tiempo de incubación, el gel se puso en ácido acético 10% (Audy, *et al.*, 1989). Como control positivo se utilizó lisozima de huevo (HEWL) tipo "c" (Sigma L-7651).

Para inhibir la actividad de las lisozimas, se utilizó Imidazol (Sigma I-0250). El protocolo original para la inhibición de lisozimas consistía en medir en suspensión *M. lysodeikticus* en presencia de lisozimas de tipo “c” con Imidazol, la medición se realizaba por espectro de absorción y densidad óptica (Shinitzky, *et al.*, 1966). Sin embargo, modificamos el protocolo original, para probar al Imidazol como inhibidor de lisozimas en geles de poliacrilamida SDS/PAGE, por lo cual la preparación del gel con 0.2% de *Micrococcus* se realizó como se describió anteriormente, lo único que cambió fue la preparación de las muestras, ya que se les agregó diferentes concentraciones de Imidazol. Las muestras se prepararon de la siguiente forma: se cargaron 5 µg de proteína de hemolinfa (extraída al día 15 p.a.) y de lisozima HEWL 1.25 µg/µl de proteína, ambas llevaron amortiguador de muestra sin mercaptoetanol en relación 1:1 y se llevaron a un volumen final de 8 µl. Para el caso de las muestras que llevaron inhibidor, se prepararon igual pero se les agregó 0.8 M de imidazol partiendo de una concentración de 0.9 M diluido en agua bidestilada. Finalmente todas las muestras se hirvieron por 2 minutos y se cargaron en el gel.

VII.9. Detección de Pesos Moleculares, Densitometría y pruebas estadísticas

El análisis para detectar los pesos moleculares (PM) se hizo con el equipo Gel Logic 200 Imaging System de Kodak, con el programa Molecular Imaging Kodak. El PM de los péptidos se determinó en base a su frente de corrida o movilidad relativa (Rf).

El análisis de densitometría cuantitativo se realizó utilizando el programa de análisis de fotos ImageJ y se tomó como control de carga la proteína correspondiente a 40 kDa, la cual se encuentra de forma constitutiva en la hemolinfa de estos insectos en 5º estadio ninfal.

Para la estadística utilizamos el programa SPSS y Statistica versión 10. Se realizaron análisis de varianzas de 2 factores (ANOVA de 2 vías) para identificar las interacciones entre la presencia del parásito y los días a los que se extrajo la hemolinfa. En caso de que si hubiera interacción, se realizaron pruebas de T para identificar en que días se daba dicha interacción. En caso de que no existiera una interacción, se realizaron pruebas post hoc de Tukey para identificar los días a los que había una diferencia significativa en la densitometría.

VIII. RESULTADOS

VIII.1. Perfil peptídico de la hemolinfa de *T. pallidipennis* durante las cinéticas de infección

Para conocer la composición de los péptidos en las diferentes muestras de hemolinfa de *T. pallidipennis* de 5º estadio, la hemolinfa se separó por medio de electroforesis (SDS/PAGE). Se observaron en general 11 péptidos en ambos grupos de insectos de los pesos moleculares siguientes: 20, 18, 17, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9 y 2 kDa. De estos, los más abundantes fueron los de 20 y 18 kDa, a estos les siguieron en intensidad los de 17, 15, 14, 11 y 9 kDa; siendo los de menor intensidad los correspondientes a los pesos moleculares de 13, 12, 10 y 2 kDa (Figura 8). Los péptidos de 17 y 14 kDa se encuentran muy pegados a los péptidos superiores (18 y 15 kDa, respectivamente) por lo que en algunos geles si se logró separar con mayor eficacia ambas bandas y en otros no. En los geles presentados parece haber una pequeña variación en la concentración de proteína cargada (sobre todo en el grupo de insectos no infectados), sin embargo, al analizar los 3 experimentos independientes observamos la misma composición peptídica que la presentada en la Figura 8.

De los péptidos de 15, 11, 9 y 2 kDa se analizó su abundancia por medio de densitometrías cuantitativas. Estos péptidos no tuvieron cambios en su concentración a lo largo de los días en los que se analizó la hemolinfa, tampoco parecen variar en la condición de no alimentados (tiempo 0 de las cinéticas) y alimentados, ni entre los grupos no infectado e infectado. Para su análisis se calculó la media de todos los días analizados. Observamos que en ambos grupos de insectos (no infectado e infectado) el péptido de 9 kDa es el más abundante de los 4 que analizamos y el de 2 kDa el menos concentrado, sin embargo, no hay una diferencia estadística entre las concentraciones de los péptidos entre los grupos infectados y no infectados (Figura 9).

La alimentación de los insectos fue una de las variables analizadas en éste trabajo, aquí observamos que cuando los insectos ingieren sangre de ratones no infectados e infectados con el parásito (primera alimentación después de 15 días de inanición), no parece afectar la presencia y/o secreción de péptidos a la hemolinfa (Figura 8). Sin embargo, detectamos un ligero aumento en la densidad del péptido de 20 kDa en ambos grupos y una disminución del de 18 kDa justo después de que los insectos se alimentaron. Los insectos también se alimentaron a los días 17 y 31 post la primera alimentación, ambos grupos con ratones sanos.

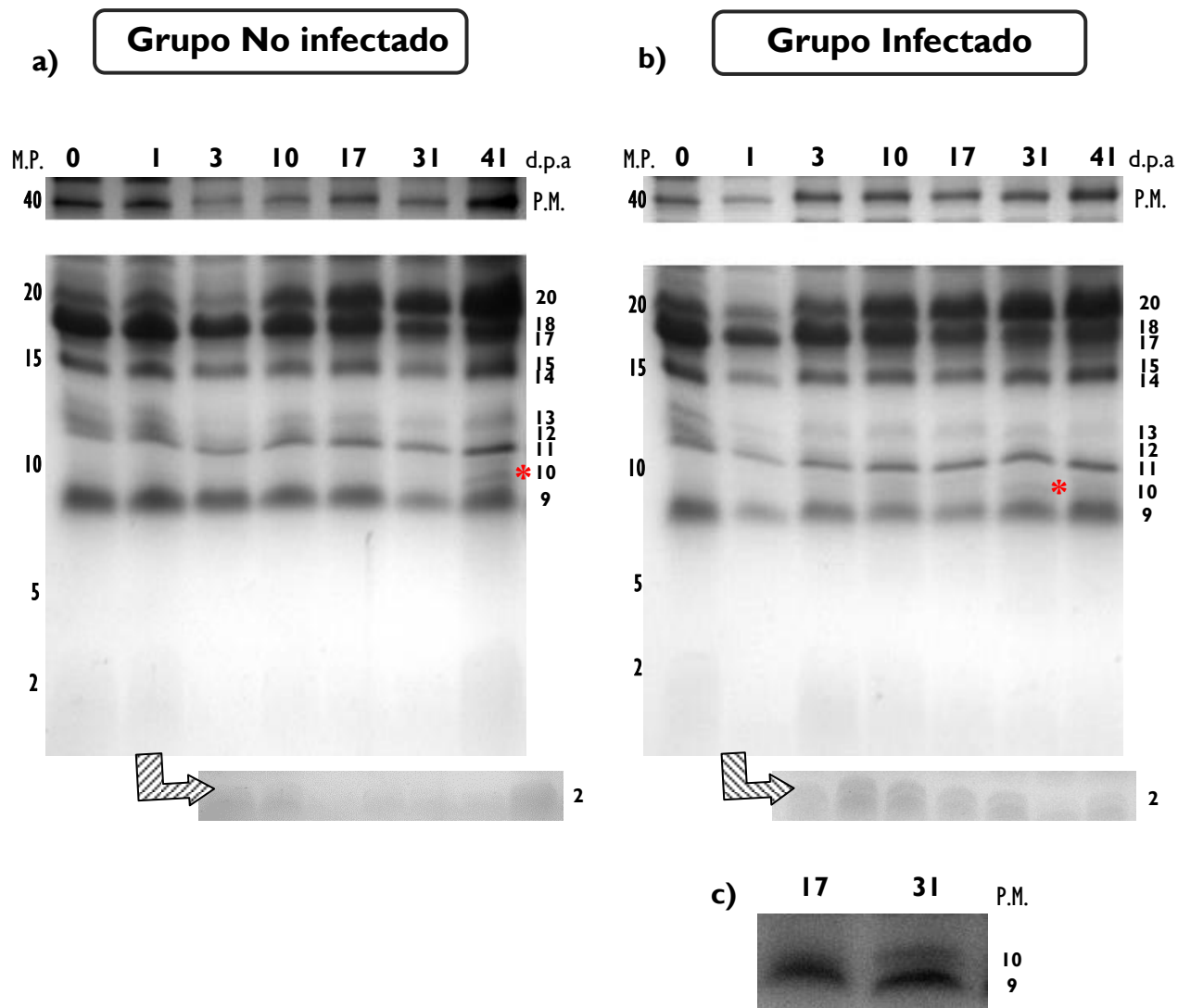


Figura 8. Análisis del perfil peptídico de la hemolinfa de insectos en SDS/PAGE con buffer de Tricina. Hemolinfa (6 μg de proteína) extraída a diferentes días (0, 1, 3, 10, 17, 31 y 41 post alimentación). **a)** Grupo de insectos no infectado, **b)** grupo de insectos infectado y **c)** Fragmento de un gel donde se aprecia mejor el péptido de 10 kDa al día 31 p.i. en el grupo infectado. Hemolinfa separada en geles de poliacrilamida al 15% con buffer de Tricina. Debajo de incisos a y b hay una flecha que muestra la zona menor de 4 kDa, donde se aumentó el contraste y se bajó el brillo para tener una mejor resolución del péptido de 2 kDa. Se utilizó la proteína de 40 kDa como control de carga. Los asteriscos señalan un péptido de 10 kDa que comienza a verse al día 41 p.a. en el grupo control y al día 31 p.i. en infectados. M.P.= marcador de peso, P.M.= peso molecular aproximado de los péptidos detectado con el programa de análisis de fotos Gel Logic 200 Imaging System de Kodak, d.p.a.= días post alimentación.

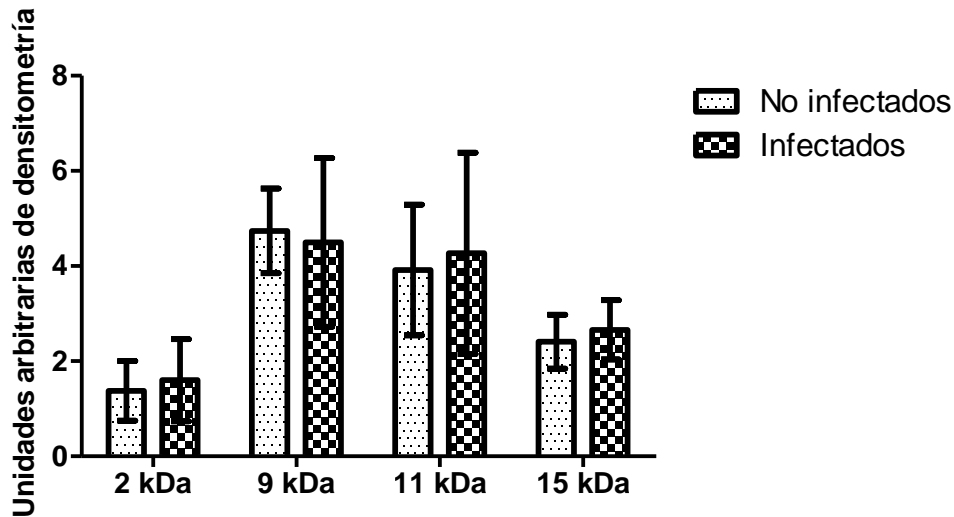


Figura 9. Densitometría cuantitativa de 4 péptidos (15, 11, 9 y 2 kDa) presentes en la hemolinfa de *T. pallidipennis*. Resultados de 3 experimentos independientes. Se muestra la Media de las 3 cinéticas de todos los días analizados \pm SD, la prueba estadística aplicada fue una T de Student .

VIII.2. Detección de cambios en la presencia de los péptidos a lo largo de una cinética de infección

De los 11 péptidos menores de 20 kDa detectados por electroforesis, sólo 3 mostraron algún cambio en su presencia y/o abundancia a lo largo de las cinéticas de infección.

El péptido de 10 kDa tuvo un cambio en su presencia, ya que se comenzó a observar en los últimos tiempos de las cinéticas. Apareció en el grupo de insectos no infectados al día 41 p.a. (Figura 8-a, asterisco), mientras que en insectos infectados se observó un péptido de tamaño similar antes, al día 31 p.i. En el perfil peptídico del experimento del grupo infectado mostrado en la Figura 8-b no se logra apreciar claramente al péptido de 10 kDa, por lo que en la Figura 8-c se muestra la zona de 10 - 9 kDa de otro experimento similar, donde vemos claramente la presencia de este péptido al día 31 p.i.

Los péptidos de 20 y 18 kDa que resultaron ser los más abundantes, mostraron un cambio en su concentración a lo largo de los días en los que se analizó la hemolinfa. El péptido de 20 kDa tiende a aumentar en ambos grupos (infectados y no infectados), después de que los insectos se alimentaron por primera vez. Para detectar si el aumento de dicho péptido era mayor en alguno de los 2 grupos de insectos analizados, se aplicó una prueba estadística ANOVA de 2 vías, sin embargo, no hubo una diferencia significativa ($p > 0.05$). Para comparar la hemolinfa de insectos sin alimentación con la hemolinfa de insectos después de su primera alimentación de ambos grupos de insectos, se realizaron pruebas post hoc de Tukey y obtuvimos que en ambos grupos de insectos (infectados y no infectados) hay un aumento

significativo para el día 10 posterior a la primera alimentación (Tabla 2). Al día 41 p.a. en el grupo de insectos no infectado se observa un mayor aumento en la densidad del péptido, sin embargo, no es significativo debido a que la desviación estándar es muy grande (Figura 10).

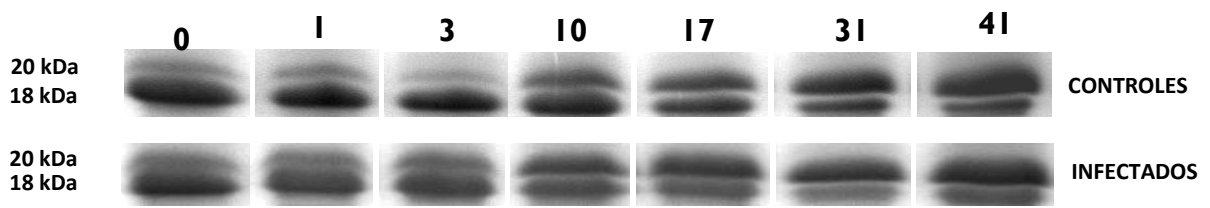
El péptido de 18 kDa tuvo una disminución en su abundancia a lo largo de las cinéticas. Al analizar la media de las muestras (aplicando una ANOVA de 2 vías) encontramos una diferencia significativa entre los insectos no infectados e infectados ($F= 16.3$, $p<0.001$, $N=38$) y también una diferencia significativa entre los días a los que se extrajo la hemolinfa post la primera alimentación ($F=27.126$, $p<0.001$, $N=38$). Para detectar en que días de las cinéticas se encontraba ese efecto de la interacción entre la presencia del parásito y los días post alimentación, se aplicó una prueba de T, donde se obtuvo que sólo al día 1 posterior a la primera alimentación existe dicha diferencia significativa asumiendo varianzas iguales ($p>0.05$) entre el grupo de insectos no infectados e infectados (Figura 11).

Tabla 2. Pruebas post hoc de Tukey para el péptido de 20 kDa.

d.p.a	No Infectados						Infectados							
	0	1	3	10	17	31	41	0	1	3	10	17	31	41
0		0.98	0.84	0.03	0.01	0.00	0		1	0.96	0.03	0.01	0	0.43
1	0.98		0.99	0.16	0.06	0.02	0	1		1	0.36	0.19	0.06	0.52
3	0.84	0.99		0.40	0.20	0.08	0	0.96	1		0.38	0.14	0.03	0.63
10	0.03	0.16	0.40		1	0.92	0.02	0.03	0.36	0.38		1	0.87	0.94
17	0.01	0.06	0.20	1		0.99	0.05	0.01	0.19	0.14	1		0.99	0.97
31	0	0.02	0.08	0.92	0.99		0.32	0	0.06	0.03	0.87	0.99		0.99
41	0	0	0	0.02	0.05	0.32		0.43	0.52	0.63	0.94	0.97	0.99	

d.p.a. = Días post alimentación

Diferencias significativas en los días post alimentación. En rojo se marcan los días donde se encontró una $p<0.05$



Péptido de 20 kDa

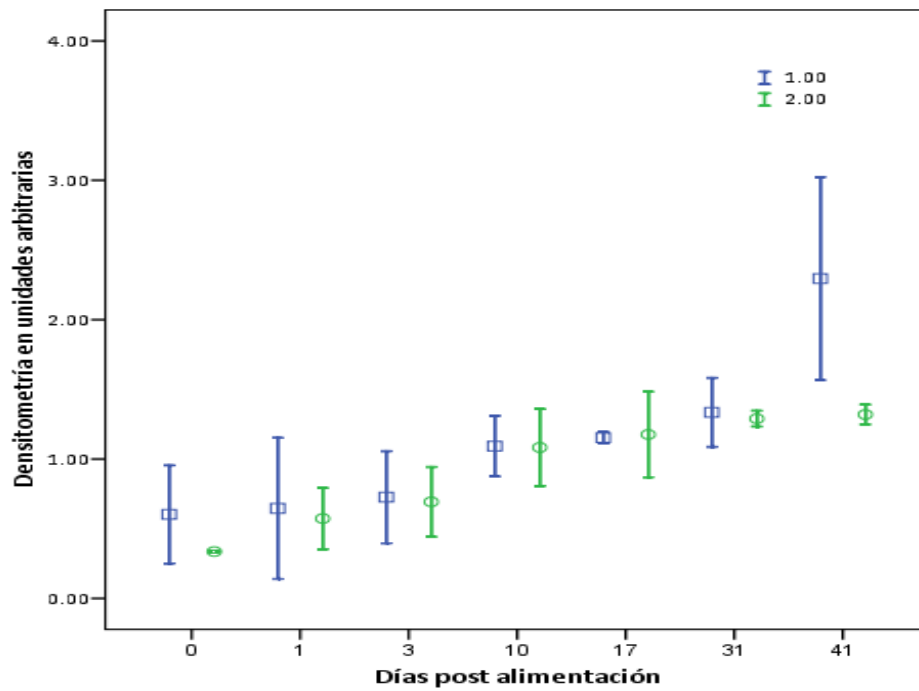


Figura 10. Densitometría cuantitativa de la banda de 20 kDa a diferentes días post alimentación. Datos de 3 experimentos independientes, se graficaron las medias \pm Error estándar. Se aplicó una ANOVA de 2 vías. El 1 representa al grupo no infectado y el 2 al grupo infectado.

Péptido de 18 kDa

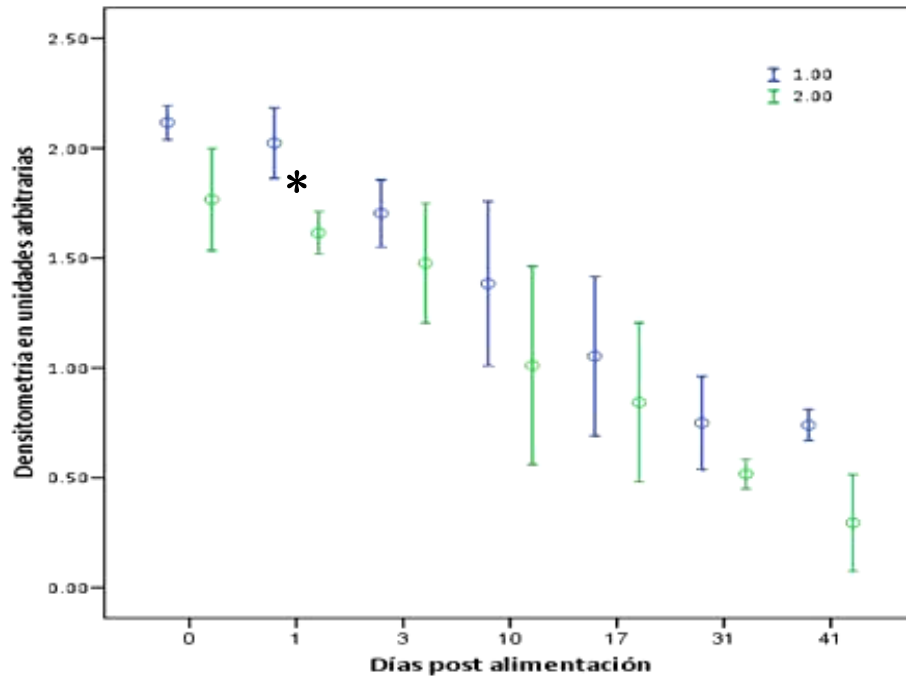


Figura 11. Densitometría cuantitativa de la banda de 18 kDa a diferentes días post alimentación. Datos de 3 experimentos independientes, se graficaron las medias \pm Error estándar. Se aplicó una ANOVA de 2 vías. El 1 representa al grupo no infectado y el 2 al grupo infectado. El asterisco muestra que al día 1 post alimentación hay una diferencia significativa entre el grupo de insectos infectado y el no infectado.

VIII.3. Caracterización de glicopéptidos por medio de lectinas biotiniladas

Para este ensayo, utilizamos muestras de hemolinfa correspondientes a los tiempos: 0 (sin alimentar), 1 (justo después de la alimentación), 17 y 41 d.p.a. De las 5 lectinas utilizadas, todas reconocieron al menos un glicopéptido menor o igual a 20 kDa.

La lectina que reconoce residuos de azúcar de tipo galactosa, galactosil y N-acetilgalactosamina (JACALINA) reconoció un total de 6 glicopéptidos de los pesos moleculares de 18, 17, 14, 11, 10 y 9 kDa; de los cuales los menos abundantes fueron los de 18 y 17 kDa. De los 6 glicopéptidos reconocidos, 5 fueron detectados en todas las muestras de hemolinfa analizadas, sin embargo, el de 10 kDa sólo reaccionó en la hemolinfa correspondiente al día 41 p.a. del grupo control (C-41) (Figura 12-a). Es importante destacar que en el perfil peptídico de la hemolinfa (Figura 8-a) se identificó que un péptido

de 10 kDa comenzaba su expresión para éste día en insectos control y al día 31 p.i. en insectos infectados.

La lectina que reconoce N-acetil y D-galactosamina (PT) reconoció 3 glicopéptidos de los pesos moleculares de 18, 17 y 11 kDa; de los cuales, los péptidos de 18 y 17 kDa reaccionaron en todas las muestras analizadas, mientras que el péptido de 11 kDa sólo fue reconocido en la hemolinfa de insectos extraída justo después de la alimentación (C-1) (Figura 12-b).

La lectina que reacciona con N-acetilglucosamina (WGA) identificó 1 glicopéptido de 14 kDa, este se encuentra glicosilado en todas las muestras de hemolinfa pertenecientes al grupo control (no infectado) y únicamente al día 41 p.i. en hemolinfa del grupo infectado. Como podemos observar, la intensidad de la reacción de la glicosilación de éste péptido va aumentando conforme avanzan los días en el grupo no infectado (Figura 12-c).

Residuos de glucosa y manosa (Con A), se observaron sólo en 2 péptidos correspondientes a los pesos moleculares de 18 y 20 kDa en todas las muestras analizadas, sin cambios aparentes en la intensidad de su glicosilación (Figura 12-d). Finalmente, la lectina de *Arachis hypogaea* (PNA), que reacciona con residuos de N-acetilgalactosamina y galactosa, reconoció un péptido de 13 kDa sólo en la muestra de hemolinfa que corresponde al día 41 p.a. (C-41). Para el caso de esta lectina, no se corrió la muestra correspondiente a hemolinfa de insectos sin alimentar debido a la falta de material para éste ensayo (Figura 12-e).

En resumen, el péptido que presentó una mayor variedad de residuos de azúcares fue el de 18 kDa, ya que reaccionó con 3 diferentes lectinas JACALINA, P.T. y Con A. Por otro lado, el péptido de 14 kDa fue reconocido por 2 lectinas, teniendo residuos de tipo galactosa, galactosil, N-acetilgalactosamina y N-acetilglucosamina; el péptido de 11 kDa también reaccionó con 2 lectinas (JACALINA y PT) estando glicosilado únicamente al día 41 p.a. con N-acetil y/o D-galactosamina. Los péptidos de 20, 13, 10 y 9 kDa sólo fueron reconocidos por una lectina (Tabla 2).

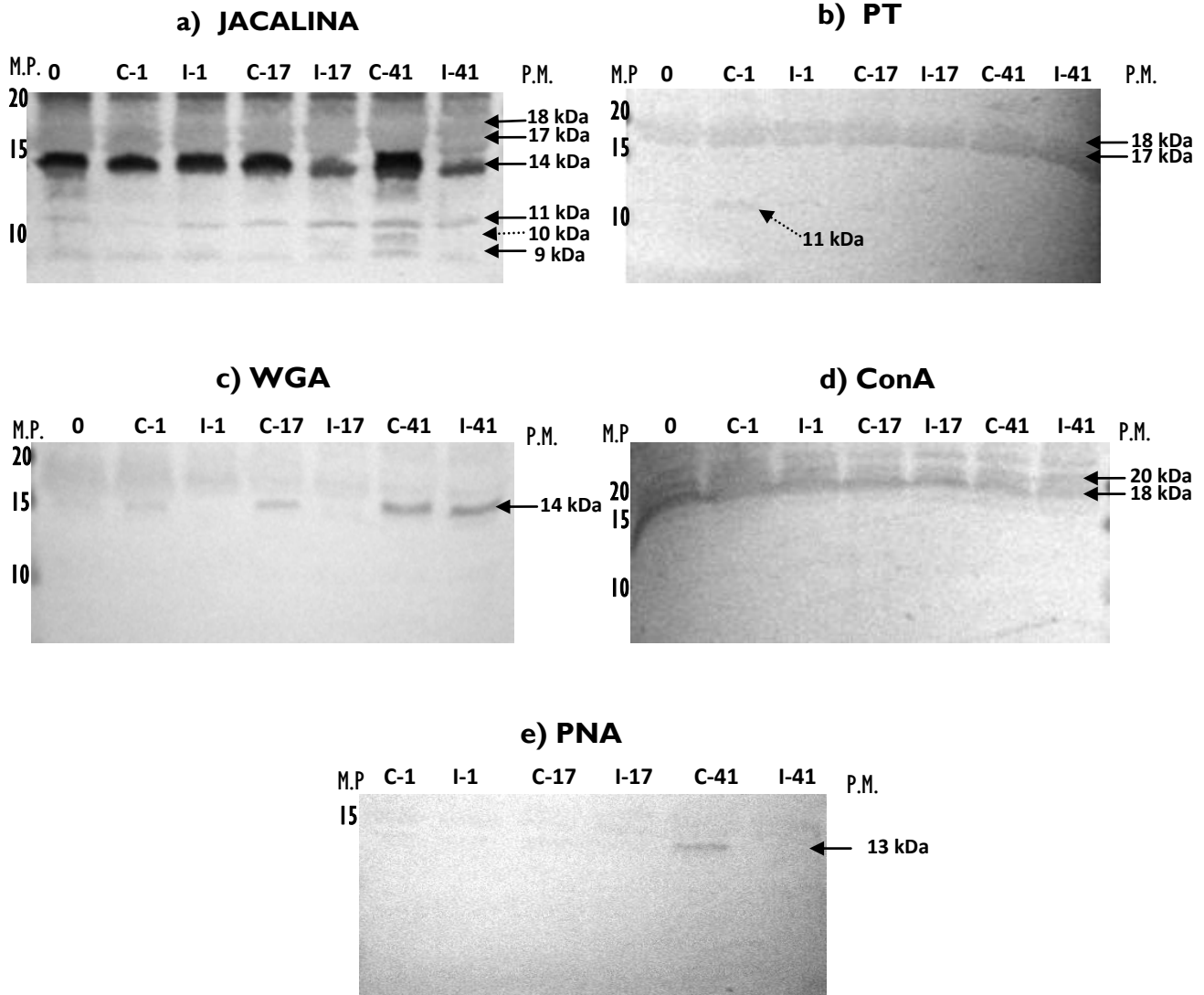


Figura 12. Ensayos de detección de glicopéptidos por medio de lectinas biotiniladas. *a)* Reconocimiento de galactosa, galactosil y N-acetilgalactosamina (JACALINA), *b)* Detección de N-acetil y D-galactosamina (PT), *c)* N-acetilglucosamina (WGA), *d)* glucosa y manosa (Con A) y *e)* N-acetilgalactosamina y galactosa (PNA). Las muestras utilizadas para éste ensayo corresponden a los días: 0 (sin alimentar), 1 (justo después de la alimentación), 17 y 41 d.p.a. del grupo control (C) e infectado (I). En cada ensayo de lectina se presenta una membrana de nitrocelulosa con 6 µg de proteína por carril, del lado izquierdo el marcador de pesos (M.P.) y de lado derecho una flecha con el peso molecular del glicopéptido detectado en kDa (P.M.).

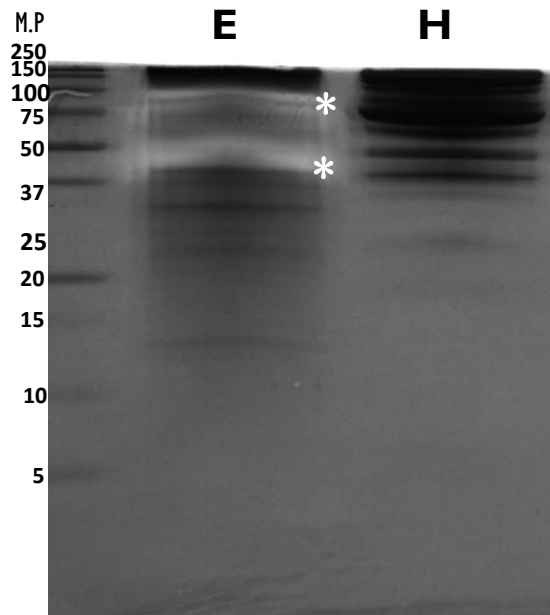


Figura 13. Determinación de la actividad proteolítica en péptidos de hemolinfa de *T. pallidipennis*. Se cargaron 50 μg de proteína tanto del extracto de epimastigotes (E) como de la hemolinfa (H). Los asteriscos muestran las 2 principales regiones donde se nota una clara actividad proteolítica en el extracto de *T. cruzi*. De lado izquierdo se muestra el marcador de peso (MP). Gel representativo de 2 ensayos independientes.

VIII.5. Detección de actividad de lisozimas tipo “c” en hemolinfa

La detección de la actividad de lisozimas en hemolinfa de *T. pallidipennis* se visualizó en geles de poliacrilamida 15% con SDS en presencia de 0.2% de *Micrococcus lysodeikticus* como sustrato. La actividad de ésta enzima se observó como una región transparente en el gel con fondo blanco, pero para tener una mejor resolución de los geles, éstos se fotografiaron con un fondo oscuro, siendo las bandas oscuras los lugares donde se llevó a cabo el proceso de hidrólisis.

En la Figura 14-a observamos 2 bandas en la muestra que contenía lisozima pura (L) de pollo tipo “c” (Sigma L-7651) utilizada como control positivo, de los pesos moleculares aproximados de 14.5 y 25 kDa. De ellas, la banda más abundante es la de 14.5 kDa y ambas bandas se presentan en muestras con y sin imidazol, siendo éste un inhibidor de lisozimas. También se analizó la hemolinfa de insectos extraída al día 15 p.a., y aquí observamos una banda de hidrólisis muy abundante de un peso molecular de entre 14 y 15 kDa en ambas condiciones (sin y con inhibidor). Cabe mencionar que al analizar con más detalle la zona con tinción de Coomassie blue se observaron dos péptidos 15 y 14 kDa, por la posición de la zona hidrolizada se concidero que el péptido de 14kda sería el que presentara la actividad de lisozima (Figura 14-b).

Nuestros datos indican que a una concentración de 0.8 M de Imidazol, la actividad de lisozimas es inhibida en un 27 % para el caso de la lisozima tipo “c” de pollo y para la lisozima de hemolinfa en un 10% (Figura 14-c).

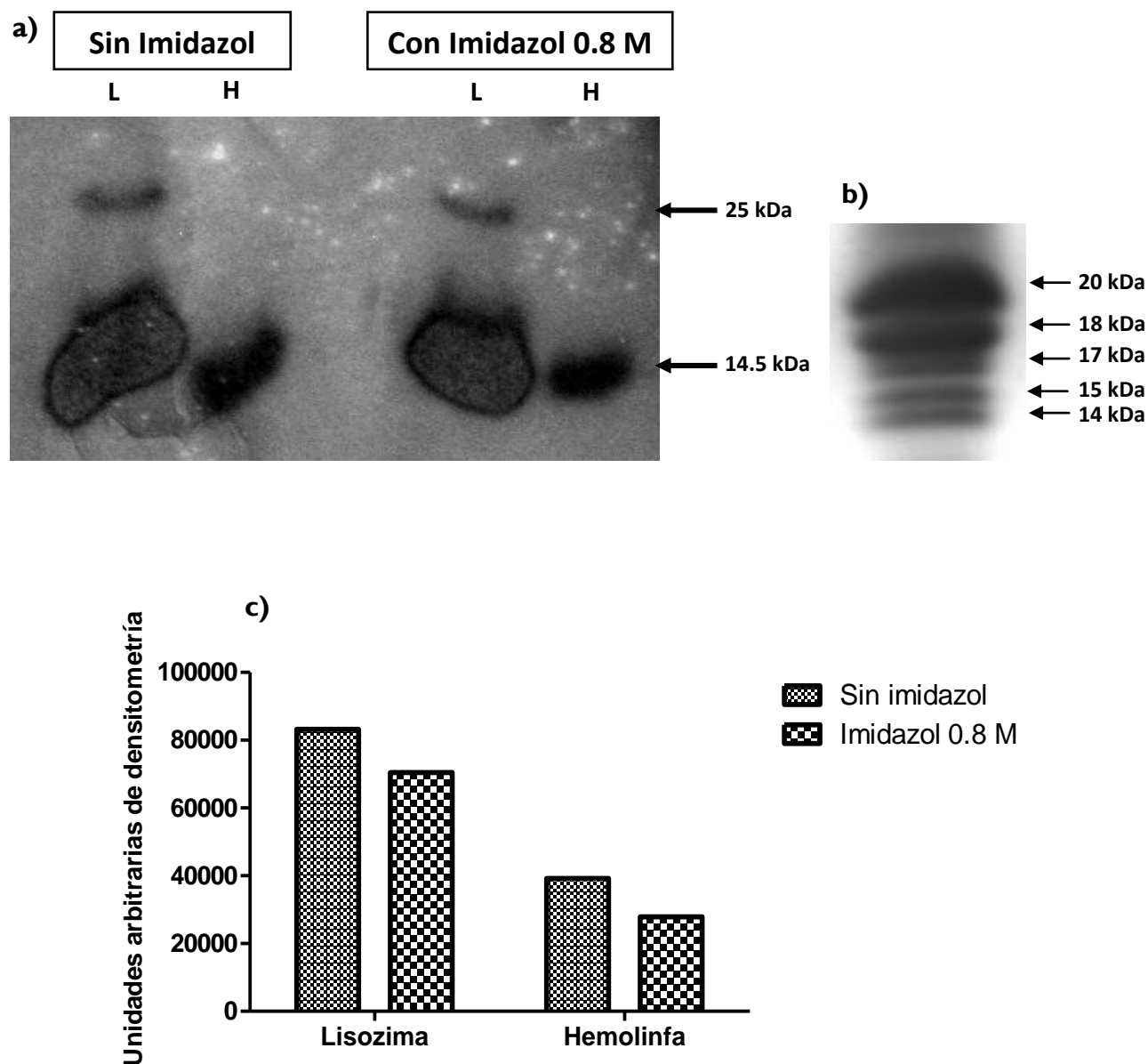


Figura 14. Determinación de la actividad de lisozimas tipo “c” en hemolinfa de *T. pallidipennis*. **a)** Gel de acrilamida SDS/PAGE 15% con 2% de *M. lysodeikticus*, se cargaron 5 µg de hemolinfa (H) de insectos 15 d.p.a. y 1.25 µg/µl de lisozima tipo “c” (L) también se cargó la misma concentración de proteínas con 0.8 M de Imidazol como inhibidor de lisozimas. Gel representativo de 2 experimentos independientes. **b)** Acercamiento a la región de 14-20 kDa de un gel de acrilamida 15% en buffer de Tricina (6 µg de proteína de muestra de hemolinfa 17 d.p.i.), **c)** Densitometría cuantitativa de las bandas con actividad de lisozimas con o sin la presencia de Imidazol al 0.8M.

IX. DISCUSIÓN

IX.1. Relación vector-parásito

La información existente sobre los mecanismos que intervienen en la relación vector-parásito de la enfermedad de Chagas, así como la información sobre la fisiología de insectos triatominos, está prácticamente confinada a especies sudamericanas, siendo *Rhodnius prolixus* el modelo de estudio por excelencia. Por ello la importancia de nuestro trabajo, el cual se enfocó en una especie de triatomo endémica de México con importancia médica, como lo es *Triatoma (Meccus) pallidipennis*, en el cual determinamos el perfil peptídico de la hemolinfa y las modificaciones en dichos péptidos cuando los insectos se alimentaron de sangre de ratones infectados con *T. cruzi* y cuando se alimentaron con sangre de ratones sanos.

Durante mucho tiempo se creyó que *T. cruzi* no generaba patogenicidad para los insectos vectores, sin embargo, durante las últimas tres décadas se han reportado trabajos que demuestran que la presencia del parásito en el tracto digestivo de los insectos genera factores de estrés (disminución en el tamaño de las gónadas y de la talla, así como retardo en el desarrollo al nuevo estadio ninfa) volviendo a los insectos vulnerables, dando como resultado un efecto patológico a nivel sistémico. Estos factores estresantes indican que el parásito genera competencia con el insecto por nutrientes, dando como resultado que el insecto se alimente más y con ello, haya una mayor propagación del parásito (Schaub, 1989; Botto-Mahan *et al.*, 2006).

Por el contrario, algunas otras especies de tripanosomátidos, tales como *T. brucei* o *T. rangeli* se alojan fuera del tracto digestivo, como en las glándulas salivales, pero pueden traspasar la pared del tracto digestivo, llegando a la hemolinfa, colonizando hemocitos y regresando a las glándulas salivales para posteriormente ser transmitidos por medio de la picadura del insecto al hospedero mamífero.

IX.2. Composición peptídica de la hemolinfa de *T. pallidipennis*

Los principales péptidos reportados en la hemolinfa de insectos corresponden a péptidos antimicrobianos (AMP'S), lisozimas (ambos con capacidad antimicrobiana) y también neuropéptidos, que son liberados al sistema circulatorio para actuar como hormonas, regulando muchos de los procesos fisiológicos de los insectos.

Los AMP'S son péptidos sintetizados principalmente por el cuerpo graso (homólogo al hígado en vertebrados), pero también pueden ser secretados por algunos hemocitos y por el lumen intestinal hacia el hemocele (Ganz, 2003; Bulet & Stocklin, 2005). Estas moléculas son liberadas a la hemolinfa o al lumen intestinal para eliminar agentes patógenos adquiridos durante la alimentación. Se les denomina antimicrobianos por su alta capacidad antibacterial y anti-fúngica. Hoy en día, se han caracterizado una gran variedad de estos péptidos en diferentes especies de insectos, incluidos algunos provenientes de la subfamilia Triatominae (Hemiptera: Reduviidae).

El presente estudio demuestra principalmente un aspecto importante, éste es que, cuando los insectos se alimentan, tienden a presentar un tipo de respuesta sistémica (ya que los parámetros medidos en este trabajo se realizaron en hemolinfa, la cual recorre toda la cavidad corporal de los insectos), es decir, cuando se alimentan con sangre de ratones no infectados algunos de los péptidos identificados tienden a sufrir modificaciones en la intensidad de su presencia y al alimentarse de ratones infectados con el parásito, otros péptidos sufren modificaciones en su glicosilación. Estos resultados sugerirían que los péptidos que presentaron alguna de las modificaciones mencionadas, podrían tratarse de AMP'S, principalmente por el peso molecular, siendo el proceso de la alimentación lo que estimularía su activación.

Actualmente se conoce una gran variedad de AMP'S en los diferentes grupos de organismos vivientes, con el paso del tiempo se han realizado diferentes clasificaciones, una de las más estrictas puede ser mediante sus características estructurales y sus secuencias de aminoácidos (para conocer más sobre la clasificación de estos péptidos ir al Anexo 1).

En una gran variedad de especies de insectos se conoce mucho sobre las características generales de las proteínas y/o péptidos en diferentes órganos de los insectos, tales como la estructura molecular, el lugar de síntesis, los genes que los codifican y en algunos casos hasta las funciones que tienen en la hemolinfa. Sin embargo, para el caso de los Hemípteros, pocos son los trabajos reportados. En los últimos años se han caracterizado algunos péptidos aislados de diferentes órganos. La prolixicina, es un AMP aislado de *R. prolixus*, constando de 21 residuos de aminoácidos y un peso molecular de 11 kDa, sus principales características estructurales son que poseen dos sitios fosforilados y no posee regiones glicosiladas en su secuencia de aminoácidos (Ursic-Bedoya, *et al.*, 2011). De los 11 péptidos detectados en nuestro trabajo, uno tiene un peso molecular de 11 kDa, éste péptido no presenta cambios en los diferentes días a los que se analizó la hemolinfa, fue uno de los que se encontraron en concentraciones

altas y cabe mencionar que en nuestros ensayos de identificación de glicopéptidos, éste péptido presenta residuos de galactosa, galactosil y/o N-acetilgalactosamina en todas las muestras de hemolinfa analizadas y únicamente tiene residuos de D-galactosamina en el grupo control justo después de que los insectos se alimentaron. Con estos resultados es posible que estemos hablando de un péptido glicosilado que no ha sido reportado en la literatura para este grupo de insectos.

Otros AMP's aislados de la hemolinfa de *R. prolixus* son las defensinas, inducidas por medio de la inoculación de insectos vía hemocele con bacterias de tipo Gram (-) y (+), *Escherichia coli* y *Micrococcus luteus*, respectivamente (López, *et al.*, 2003). Estos péptidos forman una super familia de AMP'S presentes en una gran variedad de organismos, desde plantas hasta mamíferos. Tienen un peso molecular de 4 kDa, su secuencia de aminoácidos cuenta con altas cantidades de cisteínas y prolina, con un aproximado de 33-46 residuos de aminoácidos (Vizioli & Salzet, 2002; Waniek, *et al.*, 2009), cabe destacar que las defensinas aisladas de insectos tienen una mayor eficacia contra bacterias de tipo Gram (+) (Ravi, *et al.*, 2011). En el presente trabajo, no se encontraron péptidos de este peso molecular, sin embargo eso no significa que la hemolinfa que analizamos no contenga dichos péptidos, si no que podría tratarse de que su concentración sea menor.

Las thanatinas son otros AMP'S también aislados de insectos Hemípteros (*Podisus maculiventris*), éstos péptidos constan de 21 residuos de aminoácidos, en su estructura poseen 2 residuos de cisteína y con ello forman un puente disulfuro, su peso molecular aproximado es de 2 kDa y cabe mencionar que hasta el momento no se han reportado semejanzas de éste péptido con algún otro AMP de otros insectos (Bulet, *et al.*, 1999; Vizioli & Salzet, 2002). Todas las muestras de hemolinfa de insectos analizada en este trabajo mostraron la presencia de un péptido de 2 kDa, el cual fue el menos concentrado de los 11 péptidos detectados y no pareció sufrir cambios en su densidad a lo largo de los días a los que se analizó la hemolinfa, éste péptido tampoco se encontró glicosilado.

Las dipterocinas son una familia de AMP's originalmente aisladas de *Phormia terranova* y actualmente encontrados en diferentes grupos de insectos, éstos péptidos están compuestos por 82 residuos de aminoácidos, siendo ricos en residuos de glicina y prolina en su secuencia de aminoácidos, contienen un dominio N-terminal el cual es rico en prolina y donde se encuentra un sitio consenso para la O-glicosilación, en general tienen un peso molecular de entre 9 y 10 kDa. El sitio consenso para la O-glicosilación es propicio para la unión a azúcares de tipo N-acetilgalactosamina, glucosa y galactosa; la presencia de ese sitio de glicosilación es lo que le permite tener actividad biológica contra bacterias y

hongos. En trabajos previos, deglicosilaron al péptido y enseguida realizaron ensayos de actividad antimicrobiana, teniendo como resultado una nula actividad, a diferencia de cuando el péptido se encuentra de forma natural con sus residuos de azúcares (Bulet, *et al.*, 1995; Lee, *et al.*, 2001). En nuestros resultados identificamos un péptido de 9 kDa que no sufre cambios en su expresión a lo largo de las cinéticas de infección y se encuentra glicosilado, éste péptido reaccionó ante la lectina de *Artocarpus integrifolia* (JACALINA), la cual reacciona con galactosa, galactosil y N-acetilgalactosamina. Lo anterior sugeriría, por el peso molecular y por los residuos de azúcares, que se podría tratar de una diptericina. Sin embargo, faltan estudios de secuenciación para poder determinar con precisión de que péptido se trata.

Por otro lado, las lisozimas son enzimas con actividad de hidrolasas que actúan sobre el enlace β -1,4 N-acetilglucosamina y ácido N-acetilmurámico del peptidoglicano que conforma la pared celular bacteriana. Estas enzimas se clasifican según su secuencia de aminoácidos en 6 tipos: tipo “c” (chicken type), tipo “g” (goose type), tipo “i” (invertebrate type), lisozimas de plantas, bacterianas y de fagos (Jong-Wan, *et al.*, 2011). Los insectos tienen lisozimas de tipo “c”, las cuales ya han sido aisladas de diferentes órdenes de insectos, entre ellos de Hemípteros (*R. prolixus*). Las lisozimas aisladas de estos triatomíneos presentan un peso molecular de aproximadamente 15 kDa (Ursic-Bedoya, *et al.*, 2008), mientras que la lisozima de clara del huevo de gallina “HEWL” tiene un peso de 14.5 kDa. Nuestros datos muestran la presencia de un péptido de entre 14 - 15 kDa, el cual está presente de manera constante en todas las muestras de hemolinfa analizadas y que no sufre cambios a lo largo de los días de estudio, ni cuando el insecto se encuentra en presencia del parásito. En los ensayos de reconocimiento de residuos de azúcares por medio de lectinas, encontramos glicosilación en el de 14 kDa, este reaccionó ante residuos de tipo galactosa, galactosil, N-acetilgalactosamina y N-acetilglucosamina; sin embargo, por la proximidad a la que se encuentran los péptidos de 14 y 15 kDa, el peso molecular de dicho péptido podría ser de 15 kDa. Por medio de los ensayos de actividad de lisozimas, pudimos corroborar que el péptido de entre 14 - 15 kDa se trataba de una lisozima de tipo “c”. Sin embargo, al separar los péptidos por medio de electroforesis, justamente los péptidos de 14 y 15 kDa quedaron muy juntos, por lo que es difícil determinar el peso molecular exacto por medio de geles de acrilamida. Ya que también pudo ser inhibido parcialmente con imidazol, en el futuro se debe de seguir caracterizando a este péptido y también secuenciarlo.

Los neuropéptidos son mensajeros químicos que modulan la respuesta del sistema nervioso, estas moléculas de señalización están involucradas en procesos de iniciación, modulación y regulación de la

mayoría de los procesos fisiológicos; estos péptidos necesitan ser secretados vía sistema circulatorio para cumplir sus funciones hormonales en órganos distantes que participan en procesos como alimentación, estrés, ecdisis, entre muchos otros. Hoy en día existe poca información sobre el aislamiento y caracterización de neuropéptidos en insectos, sin embargo la hormona de activación pre-ecdisis (PETH) ha sido bien estudiada, ésta hormona se puede encontrar en concentraciones de 30 a 45 nM en hemolinfa de insectos y crustáceos que están en etapa de pre-ecdisis (Chen, *et al.*, 2009; Rahman, *et al.*, 2002). Nuestros resultados indican la presencia de 11 péptidos <20 kDa, de los cuales suponemos que la gran mayoría podrían tratarse de AMP, pero también inferimos que entre esos 11 péptidos podría haber alguno de tipo hormonal. Estudios en el futuro podrían brindar mayor información al respecto.

En conclusión, nuestro trabajo demuestra que la presencia del parásito en el tracto digestivo de los insectos no estimula la secreción de péptidos a nivel hemolinfa, sin embargo, si parece afectar de alguna forma la glicosilación de algunos de ellos (14, 13 y 11 kDa). Esto concuerda con que el proceso evolutivo entre vector-parásito ha sido tan exitoso que el sistema inmune del insecto (al menos a nivel sistémico) no logra reconocer como patógeno al parásito. También fue posible detectar un péptido con actividad de lisozimas con un peso molecular de entre 14 kDa. Finalmente, observamos que el proceso de alimentación no es un factor estimulante para la secreción de péptidos a nivel hemolinfa ,pero si influye en la abundancia de algunos de ellos.

Es difícil conocer la naturaleza exacta de cada uno de los péptidos identificados en este trabajo sin contar con la secuencia de aminoácidos específica de cada uno. Por lo que en el futuro se planea mandar a secuenciar, principalmente a los péptidos que tuvieron algún cambio en su densidad, presencia y glicosilación a lo largo de los diferentes días a los que analizamos la hemolinfa.

X. CONCLUSIONES

- ❖ El perfil peptídico de la hemolinfa de *T. pallidipennis* consta de 11 péptidos menores de 20 kDa.
- ❖ De los 11 péptidos detectados, sólo 2 (20 y 18 kDa) tienen cambios en su abundancia a lo largo de las cinéticas de infección. El de 20 kDa aumentó y el de 18 kDa disminuyó, ambos en los dos grupos de insectos.
- ❖ Sólo el péptido de 10 kDa tuvo una variación en su presencia, ya que en el grupo no infectado apareció al día 41 post alimentación y en infectados al día 31 post infección.
- ❖ Nuestros análisis demuestran que la mayor cantidad de residuos de azúcares presentes en péptidos y proteínas son de tipo galactosa, galactosil y/o N-acetilgalactosamina.
- ❖ La hemolinfa contiene lisozimas de tipo “c” en concentraciones altas.
- ❖ Los resultados de este trabajo sugieren que la presencia de *T. cruzi* en el tracto digestivo de los insectos no parece afectar la secreción de péptidos, sin embargo, si logra haber modificaciones en la glicosilación de algunos de ellos.

XI. PERSPECTIVAS

- ❖ Secuenciar los péptidos para conocer su naturaleza antimicrobiana o de neuropéptidos, particularmente en aquellos que tuvieron algún cambio.
- ❖ Realizar ensayos *in vitro* con bacterias, para determinar cuáles péptidos tienen actividad antimicrobiana.
- ❖ Deglicosilar los péptidos que mostraron algún residuo de azúcar, con la finalidad de determinar si el azúcar en particular es lo que le confiere alguna actividad biológica al péptido.

XII. BIBLIOGRAFÍA

1. Almeida-de-Faria, M., Freymüller, E., Colli, W. & Alves, M. J. M. 1999. *Trypanosoma cruzi*: characterization of an intracellular epimastigote-like form. *Experimental Parasitology* 92: 263–274.
2. Álvarez, V. E., Niemirowicz, G. T. & Cazzulo, J. J. 2011. The peptidases of *Trypanosoma cruzi*: digestive enzymes, virulence factors, and mediators of autophagy and programmed cell death. *Biochimica et Biophysica Acta* 1824: 195–206.
3. Audy, P., Grenier, J. & Asselin, A. 1989. Lysozyme activity in animal extracts after Sodium Duodecyl Sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. *Comparative Biochemistry and Physiology* 92B: 523-527.
4. Azambuja, P., Garcia, E.S. & Ratcliffe, N.A. 2005. Gut microbiota and parasite transmission by insect vectors. *TRENDS in Parasitology* 21: 568-572.
5. Beard, C. B., Dotson, E. M., Pennington, P. M., Eichler, S., Cordon-Rosales, C. & Durvasula, R. V. 2001. Bacterial symbiosis and paratransgenic control of vector-borne Chagas disease. *International Journal for Parasitology* 31: 621-627.
6. Botto-Mahan, C., Cattán, P. E. & Mendel, R. 2006. Chagas disease parasite induces behavioural changes in the kissing bug *Mepraia spinolai*. *Acta Tropica* 98: 219–223.
7. Boulanger, N., Bulet, P. & Lowenberger, C. 2006. Antimicrobial peptides in the interactions between insects and flagellate parasites. *TRENDS in Parasitology* 22: 262-268.
8. Bulet, P., Hegy, G., Lambert, J., Dorsselaer, A.V., Hoffmann, J.A. & Hetru, C. 1995. Insect Immunity. The Inducible Antibacterial Peptide Diptericin Carries Two O-Glycans Necessary for Biological Activity. *Biochemistry* 34: 7394-7400.
9. Bulet, P. & Stöcklin, R. 2005. Insect Antimicrobial Peptides: structures, properties and gene regulation. *Protein and Peptide Letters* 12: 3-11.
10. Carcavallo, R. U., Rabinovich, J. E. & Tonn, R. J. 1985. Factores biológicos y ecológicos en la enfermedad de Chagas. Tomo I, Centro Panamericano de Ecología y Salud. Organización Panamericana de la Salud. Republica de Argentina.
11. Carcavallo, R. U., Jurberg, J., Lent, H., Noireau, F. F. & Galváo, C. 2000. Phylogeny of the Triatominae (Hemiptera: Reduviidae). Edit. Gama Philo Proposals for taxonomic arrangements. Vol. 1 pp. 80-86.
12. Carrada-Bravo, T. 2004. *Trypanosoma cruzi*: Historia natural y diagnóstico de la Enfermedad de Chagas. *Revista Mexicana de Patología Clínica* 51: 205-219.

13. Chen, R., Ma, M., Hui, L., Zhang, J. & Li, L. 2009. Measurement of neuropeptides in crustacean hemolymph via MALDI mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 20: 708–718.
14. Chinzei, Y., Azumi, C., Miura, K., Matsuoka, H. & Ando, K. 1993. Changes in Hemolymph Proteins and Their Synthetic Activities During Development and Engorgement, and After Juvenile Hormone Treatment in the Kissing Bug, *Rhodnius prolixus*. *Journal of Insect Physiology* 40:491-499.
15. Colwell, D. D., Dantas-Torres, F. & Otranto, D. 2011. Vector-borne parasitic zoonoses: Emerging scenarios and new perspectives. *Veterinary Parasitology* 182:14– 21.
16. Conforto A. & Sung, J. D. 2003. Chagas Disease. *Topics in Emergency Medicine* 25: 262-72.
17. De Souza, W. 2002. Basic cell biology of *Trypanosoma cruzi*. *Current Pharmaceutical Design*, 8: 269-285.
18. De Souza, W., De Carvalho, T. M. U. & Santos Barrias, E. 2010. Review on *Trypanosoma cruzi*: host cell interaction. *International Journal of Cell Biology* 2010:pii: 295394
19. Downer, R. G. H. & Chino, H. 1985. Turnover of protein and diacylglycerol components of lipophorin in insect haemolymph. *Insect Biochemistry* 15: 627 - 63
20. Dujardin, J-P., Schofield, J. & Panzera, F. 2002. Los vectores de la enfermedad de Chagas. *Academie Royale des Sciences d’Outre-Mer. Bélgica*.
21. Elliot, S. L., Adler, F. R. & Sabelis, M. W. 2003. How virulent should a parasite be to its vector? *Ecology* 84: 2568 - 2574.
22. Elston, D. M. 2004. Prevention of arthropod-related disease. *J Am Acad Dermatol.* 51: 947 - 54.
23. Espinoza-De Aquino, W.B. 2010. Perfil proteico de la hemolinfa de *Triatoma pallidipennis* infectado con *Trypanosoma cruzi*. Tesis de Licenciatura (Biología). Facultad de Ciencias, UNAM.
24. Ganz, T. 2003. The role of antimicrobial peptides in innate immunity. From the symposium *Comparative Immunology* presented at the Annual Meeting of the Society for Integrative and Comparative Biology, 2-6 January 2002, at Anaheim, California. 43: 300 - 304.
25. García, E.S. & Azambuja, P. 1991. Interactions of *Trypanosoma cruzi* within the insect vector. *Parasitology Today* 7: 240 - 244.
26. García, E.S., Ratcliff, N. A., Whitten, M. M., Gonzalez, M. S. & Azambuja, P. 2007. Exploring the role of insect host factors on the dynamics of *Trypanosoma cruzi-Rhodnius prolixus* interactions. *Journal of Insect Physiology* 53: 11 - 21.
27. Ghul, F. 2009. Enfermedad de Chagas: realidad y perspectivas. *Revista Biomédica* 20: 228 - 234.

28. Graca-Souza, A. V., Maya-Monteiro, C., Paiva-Silva, G.O., Braz, G.R.C., Paes, M.C., Sorgine, M., Oliveira, M.F. & Oliveira, P.L. 2006. Adaptations against heme toxicity in blood-feeding arthropods. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 36: 322 – 335.
29. Gu, J., Shao, Y., Zhang, C., Liu, Z. & Zhang, Y. 2009. Characterization of putative soluble and membrane-bound trehalases in a hemipteran insect, *Nilaparvata lugens*. *Journal of Insect Physiology* 55: 997 – 1002.
30. Guzman-Bracho, C. 2001. Epidemiology of Chagas disease in Mexico: an update. *Trends in Parasitology* 17: 372 - 376.
31. Heusse, C. & Dowdle, E. B. 1980. Electrophoretic analysis of plasminogen in polyacrylamide gels containing Sodium Dodecyl Sulfate and copolymerized substrates. *Analytical Biochemistry* 102: 196 - 202.
32. Hypsa, V., Tietz, D.F., Zrzavý, J., Rego, R.O.M., Galvao, C. & Jurberg, J. 2002. Phylogeny and biogeography of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae): molecular evidence of a New World origin of the Asiatic clade. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 23: 447 – 457.
33. Jong-Wan, K., Jeehyun, Y., Gil Ho, L. & Sung Moon, Y. 2011. Recombinant expression and refolding of the c-type lysozyme from *Spodoptera litura* in *E. coli*. *Electronic Journal of Biotechnology* 14: 1 – 6.
34. Jungreis, A. M., Jatlow, P. & Wyatt, G. R. 1972. Inorganic ion composition of haemolymph of the cecropia silkworm: changes with diet and ontogeny. *Journal Insect Physiology* 19: 225 - 233.
35. Kollien, A. H. & Schaub, G. A. 2000. The development of *Trypanosoma cruzi* in Triatominae. *Parasitology Today* 16: 381 - 386.
36. Lavine, M. D. & Strand, M. R. 2002. Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 32: 1295 – 1309.
37. Lavine, N. D., Corliss, J. O., Cox, F.E.G., Deroux, G., Grain, J., Hon1gberg, B. M., Leedale, G. F., Loeblich, A. R., Lom, J., Lynn, D., Merinfeld, E. G., Page, F.C., Poljansky, G., Sprague, V., Vavra, J., & Wallace, F. G. 1980. A newly revised classification of the protozoa. *Journal of Protozoology* 27: 37 - 58.
38. Lehane, M. J. 2005. *The biology of blood-sucking in insects*. E.U.A. Cambridge University Press, 2a edición, pp. 131 - 200.
39. López, L., Morales, G., Ursic, R., Wolff, M. & Lowenberger, C. 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.

40. Martínez, H. F., Villalobos, G.C., Ceballos A.M., De la Torre, P., Laclette, J.P., Alexandre-Aguilar, R. & Espinoza, B. 2006. Taxonomic study of the *Phyllosoma* complex and other triatomino (Insecta: Hemiptera: Reduviidae) species of epidemiological importance in the transmission of Chagas disease: Using ITS-2 and mtCytB sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 41: 279 – 287.
41. Martínez-Hernández, F., Martínez-Ibarra, J.A., Catalá, S., Villalobos, G., de la Torre, P., Laclette, J.P., Alexandre-Aguilar, R. & Espinoza, B. 2010. Natural crossbreeding between sympatric species of the *Phyllosoma* Complex (Insecta: Hemiptera: Reduviidae) indicate the existence of only one species with morphologic and genetic variations. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene* 82: 74 – 82.
42. Martínez-Ibarra, J.A., Ventura-Rodríguez, L.V., Meillon-Isais, K., Barajas-Martínez, H., Alexandre-Aguilar, R., Lupercio-Coronel, P., Rocha-Chávez, G. & Noguera-Torres, B. 2008. Biological and genetic aspects of experimental hybrids from species of the *Phyllosoma* complex (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 103: 236 - 243.
43. McGwire, B. S. & Kulkarni, M. M. 2010. Interactions of antimicrobial peptides with *Leishmania* and trypanosomes and their functional role in host parasitism. *Experimental Parasitology* 126: 397 – 405.
44. Mead, G. P., Ratcliffe, N. A. & Renwranz, L. R. 1986. The separation of insect hemocyte types of percoll gradients methodology and problems. *Journal Insect Physiology* 32: 167 - 177.
45. Mejia, J.S., Bishop, J.V. & Titus, R.G. 2006. Is it possible to develop pan-arthropod vaccines? *TRENDS in Parasitology* 22: 367 - 370.
46. Mello, C. B., Nigam, Y., García, E. S., Azambuja, P., Newton, N. P. & Ratcliffe, N. A. 1999. Studies on a haemolymph lectin isolated from *Rhodnius prolixus* and Its Interaction with *Trypanosoma rangeli*. *Experimental Parasitology* 91: 289 – 296.
47. Monteón, V. M., Furuzawa-Carballeda, J., Alexandre-Aguilar, R., Aranda-Fraustro, A., Rosales-Encina, J. L. & Reyes, P. A. 1996. American Trypanosomiasis: In Situ and generalized features of parasitism and Inflammation kinetics in a murine model. *Experimental Parasitology* 83: 267–274
48. Nation, J. L. 2008. *Insect physiology and Biochemistry*. CRC Press. Florida, U.S.A.
49. Nóbrega, A. A., Garcia, M.H., Totto, E., Obara, M.T., E. Costa, Sobel, J. & Araujo, W.N. 2009. Oral Transmission of Chagas Disease by Consumption of Açaí Palm Fruit, Brazil. *Emerging Infectious Diseases* 15: 653-655.

50. Noireau, F., Diosque, P. & Jansen, A.M. 2009. *Trypanosoma cruzi*: adaptation to its vectors and its hosts. EDP Sciences 40: 26.
51. Organización Panamericana de la Salud (PAHO). 2006. Estimación cuantitativa de la Enfermedad de Chagas en las Americas.
52. Paiva – Silva, G.O., Sorgine, M. H. F., Benedetti, C. E., Meneghini, R., Almeida, I. C., Machado, E. A., Dansa-Petretski, M., Yepiz-Plascencia, G., Law, J.H., Oliveira, P. L. & Masuda, H. 2002. On the biosynthesis of *Rhodnius prolixus* heme-binding Protein. Insect Biochemistry and Molecular Biology 32: 1533 – 1541.
53. Paskewitz S. M. & Christensen B. M. 1996. Immune responses of vectors. En Beaty B. and W. C. Marquat (Ed.) The biology of disease vectors.
54. Rahman, M. M., Vanden Bosch, L., Baggerman, G., Clynen, E., Hens, K., Hoste, B., Meylaers, K., Vercammen, T., Schoofs, L., De Loof, A. & Breuer, M. 2002. Search for peptidic molecular markers in hemolymph of crowd-(gregarious) and isolated-reared (solitary) desert locusts, *Schistocerca gregaria*. Peptides 23: 1907 – 1914.
55. Rassi, A., Jr., Rassi, A. & Marin-Neto, J. A. 2010. Chagas Disease. Lancet 375: 1388 - 1402.
56. Rassi, A., Jr., Rassi A. & Marcondes de Rezende, J. 2012. American Trypanosomiasis (Chagas Disease). Tropical Diseases 26: 275 – 291.
57. Ravi, C., Jeyashree, A. & Renuka, D. K. 2011. Antimicrobial peptides from insects: an overview. Research in Biotechnology 2: 1 - 7.
58. Rodríguez Coura, J. & Albajar Viñas, P. 2010. Chagas disease: a new worldwide challenge. Nature outlook 465: 6 – 7.
59. Rossi, M. A., Ramos S.G. & Bestetti R.B. 2003. Chagas heart disease:clinical-pathological correlation. Frontiers in Bioscience 8: 94-109.
60. Segura, E.L. & Sosa-Estani, S. 2008. Protozoan Diseases: Chagas Disease. En Public health and infectious diseases,Elsevier Inc pp. 341 - 353.
61. Schägger, H. G. & Von Jagow. 1987. Tricine-Duodecyl sulfate-polyacrilamide gel electrophoresis for separation of proteins in the range from 1-100 kDa. Analytical Biochemistry 166: 368 – 379.
62. Schamber-Reis, B. L. F., Nardelli, S., Régis-Silva, C. G., Campos, C. P. , Cerqueira, P. G., Lima, S. A., Franco, G. R., Macedo, A. M., Pena, S. D. J., Cazaux, C., Hoffmann, J.S., Machado Motta, M. C., Schenkman, S., Ribeiro Teixeira, S. M. & Machado, C. R. 2012. DNA polymerase beta from *Trypanosoma cruzi* is involved in kinetoplast DNA replication and repair of oxidative lesions. Molecular & Biochemical Parasitology 183: 122 – 131.

63. Schaub, G.A. 1989. Does; *Trypanosoma cruzi* stress its vectors? *Parasitology Today* 5: 185 - 188.
64. Schaub, G.A. 2009. Interactions of Trypanosomatids and Triatomines. *Advances in insect physiology* 37: 177 - 242.
65. Shinitzky, M., Katchalski, E., Grisaro, V. & Sharon, N. 1966. Inhibition of the lysozyme by Imidazole and indole derivatives. *Archives Of Biochemistry and Biophysics* 116: 332 - 343.
66. Talat, S., Thiruvikraman, M., Kumari, S. & Kaur, K.J. 2011. Glycosylated analogs of formaeicin I and drosocin exhibit differential pattern of antibacterial activity. *Glycoconj J* 28: 537 – 555.
67. Tay Zavala, J., Sanchez Vega, J.T., Calderon Romero, L., Romero Cabello, R., Ruiz Sánchez, D. & Garcia Tay, J. 2008. Estudios del ciclo biológico de *Triatoma pallidipennis* (Stat 1872) y otros aspectos sobre su biología. *Revista de la Facultad de Medicina, UNAM* 51: 56 - 59.
68. Ursic-Bedoya, R., Nazzari, H., Cooper, D., Triana, O., Wolff, M. & Lowenberger, C. 2008. Identification and characterization of two novel lysozymes from *Rhodnius prolixus*, a vector of Chagas disease. *Journal of Insect Physiology* 54: 593 – 603.
69. Ursic-Bedoya, R., Buchhop, J., Joy, J.B., Durvasula, R., & Lowenberger, C. 2011. Prolixicin: a novel antimicrobial peptide isolated from *Rhodnius prolixus* with differential activity against bacteria and *Trypanosoma cruzi*. *Insect Molecular Biology* 20: 775 – 786.
70. Vizioli, J. & Salzet, M. 2002. Antimicrobial peptides from animals: focus on invertebrates. *TRENDS in Pharmacological Sciences* 23: 494 - 496.
71. Waniek, P. J., Castro, H. C., Sathler, P. C., Miceli, L., Jansen, A. M. & Araújo, C. A. C. 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.
72. Wendel, S. 2010. Transfusion transmitted Chagas disease: Is it really under control? *Acta Tropica* 115: 28 – 34.
73. World Health Organization (WHO). 2002. Control of Chagas Disease. WHO Technical report series 905.

XIII. ANEXO

Clasificación de los Péptidos antimicrobianos tomando en cuenta su estructura molecular y composición de aminoácidos, se pueden dividir en tres principales clases (Bulet & Stöcklin, 2005):

- i. **Péptidos catiónicos lineales de α -hélice sin residuos de cisteína:** Este tipo es el más abundante en insectos, tienen un tamaño aproximado de 29-42 residuos y actúan con mayor eficacia contra bacterias Gram (-). El primer AMP caracterizado fue una cecropina aislada de *Hyalophora cecropia*.
- ii. **Péptidos cuya estructura está establecida por los puentes de disulfuro (establecidos por cisteínas):** Péptidos con diferente cantidad de residuos de cisteínas, se agrupan en 3 categorías dependiendo de su secuencia homológica ó de su estructura secundaria en solución acuosa:
 - a. Péptidos con α -hélice y β -lámina ($\alpha\beta\beta$, $\beta\alpha\beta\beta$)
 - b. Péptidos con 3 β -láminas entrelazados antiparalelamente.
 - c. Péptidos formando estructuras de β -láminas tipo horquilla.
- iii. **Péptidos que contienen una gran cantidad de residuos de prolina y/o glicinas:** Péptidos lineales formados de 14-39 aminoácidos, éstos a su vez se clasifican en 2 grupos:
 - a. Cadena corta: Menores a 20 residuos.
 - b. Cadena larga: Más de 20 residuos de aminoácidos.