



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

“CARACTERIZACIÓN DE PROTEÍNAS DE
HEMOLINFA DE *Triatoma pallidipennis*
INFECTADO CON *Trypanosoma cruzi*”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

CENIA EDITH ALMAZÁN MARÍN



DIRECTOR DE TESIS:
DRA. BERTHA ESPINOZA GUTIERREZ

México, DF. Junio 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

1. Datos del alumno
Apellido paterno
Apellido materno
Nombre(s)
Teléfono
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Carrera
Número de cuenta

2. Datos del tutor
Grado
Nombre(s)
Apellido paterno
Apellido materno

3. Datos del sinodal 1
Grado
Nombre(s)
Apellido paterno
Apellido materno

4. Datos del sinodal 2
Grado
Nombre(s)
Apellido paterno
Apellido materno

5. Datos del sinodal 3
Grado
Nombre(s)
Apellido paterno
Apellido materno

6. Datos del sinodal 4
Grado
Nombre(s)
Apellido paterno
Apellido materno

7. Datos del trabajo escrito.

Caracterización de proteínas de hemolinfa de *Triatoma pallidipennis* infectado con *Trypanosoma cruzi*.

67p
2014

1. Datos del alumno
Almazán
Marín
Cenia Edith
55 56160558
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
403010925

2. Datos del tutor
Dra.
Bertha Josefina
Espinoza
Gutiérrez

3. Datos del sinodal 1
Dr.
Juan Bibiano
Morales
Malacara

4. Datos del sinodal 2
Dr.
José Hugo
Aguilar
Díaz

5. Datos del sinodal 3
M. en C.
Ignacio
Martínez
Martínez

6. Datos del sinodal 4
Biól.
Rafael Enrique
Barba
Álvarez

A mis mejores amigos, mis padres.

Agradecimientos

Esta tesis fue dirigida por la Dra. Bertha Espinoza Gutiérrez en el laboratorio de Tripanosomiasis Americana, Departamento de Inmunología en el Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. Agradezco a la Dra. Espinoza Gutiérrez por todo el apoyo, tanto laboral como moral. Por toda la paciencia mostrada y su enorme comprensión. Por esos momentos que compartió corazón, oídos y mente en este largo camino.

Al Dr. Ricardo Alejandr  de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional por su colaboración en el mantenimiento de los especímenes de triatóminos.

Al Dr. Humberto Mendoza del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina, UNAM por la secuenciación por electrospray.

Al M. en C. Ignacio Martínez por su apoyo en el aprendizaje de las técnicas de laboratorio.

A mis sinodales, Dr. Juan B. Morales Malacara, Dra. Bertha Espinoza, Dr. Hugo Aguilar, M. en Ciencias Ignacio Martínez Martínez y Biol. Rafael Barba  lvarez por sus correcciones y apoyo.

Dedicatoria

A mis padres, Hortensia y José, por su enorme apoyo y amor, sin ellos no lo hubiera logrado. Por ser los primero en creer en mí a pesar de mis dudas. Todos los logros en mi vida son y serán dedicados a ellos.

A mis compañeros de vida, Klau, Carlos, Yazz y Adiv, por ser mis amigos incondicionales a pesar de la distancia. Por todas esas risas y momentos inolvidables que hicieron de este difícil camino, un camino de aprendizaje.

A mis compañeros de aventuras Daniel Vo, Gil, Dulce, Jellow, Oscar, Vladimir, Felipe, Etsaan, Damián, Román, Chucho, Cristina, Lily, María, Ana Laura, Erick, Gerardo, Moye, Luis Sandoval.

A mis compañeros de viaje Fabián, José Antonio, Josue e Israel.

A mis compañeros de laboratorio Nacho, Deyanira, Rodrigo, Ghiedanni, María Luisa, Andrea y Fernando.

ÍNDICE

I. Introducción.....	9
I.1. Enfermedad de Chagas.....	9
I.1.1. Distribución.....	9
I.1.2. Manifestaciones clínicas.....	10
I.1.3. Transmisión.....	13
I.1.4. Diagnóstico.....	14
I. 2. <i>Trypanosoma cruzi</i>	14
I.2.1. Taxonomía.....	14
I.2.2. Genética.....	15
I.2.3. Morfología.....	15
I.2.4. Ciclo de vida.....	15
I.3. Vectores.....	17
I.3.1. Taxonomía y Distribución en México.....	17
I.3.2. Ciclo de vida de triatóminos.....	18
I.3.3. Morfología.....	19
I.3.4. Fisiología.....	20
II. Antecedentes.....	25
II.1. Relación parásito-vector.....	25
II.2. Respuesta Inmune de Triatominae ante <i>Trypanosoma cruzi</i>	26
II.3. El proteoma en el estudio de la inmunidad en insectos.....	26
III. Justificación.....	28
IV. Hipótesis.....	28
V. Objetivos.....	29
VI. Material y Métodos.....	30
VI.1. Mantenimiento de triatóminos.....	30
VI.2. Obtención de hemolinfa.....	31
VI.3. Electroforesis SDS-PAGE.....	33
VI.4. Producción de anticuerpos anti-proteínas de hemolinfa.....	33
VI.5. Western-blot.....	33
VI.6. Electroforesis 2D.....	34

VI.7. Análisis de imágenes y selección de proteínas de interés.....	35
VI.8. Secuenciación de proteínas.....	36
VII. Resultados.....	37
VII.1. Caracterización de proteínas de hemolinfa de <i>T. pallidipennis</i>	37
VII.1.1. Perfil SDS-PAGE.....	37
VII.1.2. Perfil antigénico.....	38
VII.1.3. Mapa proteico 2D.....	39
VII.2. Caracterización de proteínas de hemolinfa de <i>T. pallidipennis</i> con bajo peso molecular.....	43
VII.3. Secuenciación por electrospray acoplado a masas.....	45
VIII. Discusión.....	46
IX. Conclusiones.....	55
X. Perspectivas.....	55
XI. Bibliografía.....	56
XII. Anexo I. Soluciones básicas.....	63
XIII. Anexo II. Fisiología de proteínas de hemolinfa.....	65

RESUMEN

La hemolinfa en insectos tiene importantes funciones en el metabolismo, fisiología y respuesta inmune de estos organismos. Algunos de los componentes de dicha repuesta son las proteínas y péptidos producidos por los hemocitos y cuerpo graso que son liberados a la hemolinfa. *Triatoma pallidipennis* es uno de los vectores transmisores más importantes de la enfermedad de Chagas en México, debido a su gran distribución y los índices de infección con *Trypanosoma cruzi*. El objetivo principal de este trabajo fue analizar las proteínas de hemolinfa ante la presencia de *T. cruzi*. Los resultados permitieron determinar los pesos moleculares y puntos isoelectricos de las proteínas presentes en la hemolinfa de *T. pallidipennis* por medio de electroforesis SDS-PAGE y bidimensional, así como identificar las bandas proteicas con actividad inmunogénica en conejo. Se encontraron 23 bandas proteicas en el análisis unidimensional, así como 11 bandas con actividad antigénica. En el análisis bidimensional de la hemolinfa perteneciente a *T. pallidipennis* infectado, se observaron 96 proteínas, siendo las más abundantes las correspondientes a puntos isoelectricos mayores a 5 con una heterogeneidad en los pesos moleculares. Se observó la presencia de dos grupos de proteínas, el primero mostró un peso molecular de aproximadamente 80 kDa y puntos isoelectricos desde 5.8 a 9. Para el segundo grupo, se determinó un peso molecular de aproximadamente 71 kDa y puntos isoelectricos desde 5.8 a 7.4. La organización peculiar de dichos grupos sugiere la presencia de isoformas o familias de una misma proteína. Se encontraron 31 proteínas que se encuentran solo en insectos infectados y 11 proteínas que presentan mayor abundancia ante la infección por *T. cruzi*.

I. INTRODUCCIÓN

I.1. ENFERMEDAD DE CHAGAS

Fue en el año de 1909, en Brasil donde Carlos Chagas descubrió el mismo parásito en la sangre de una niña enferma y en un insecto. Chagas identificó a éste como agente causal de una nueva enfermedad llamada Enfermedad de Chagas y el parásito *Trypanosoma cruzi* (Coura & Borges-Pereira, 2010).

I. 1. 1. Distribución

La Enfermedad de Chagas es la enfermedad parasitaria de mayor importancia en América Latina, donde se localiza desde el sur de Estados Unidos hasta Argentina y Chile (Fig. 1), por lo cual también es conocida como Tripanosomiasis americana (Días, 1992; Rassi *et al.*, 2010). Sin embargo, en las últimas décadas se ha observado una mayor frecuencia en Estados Unidos, Canadá, algunos países europeos y del Pacífico Occidental. Esto debido a la intensa migración de la población latina (Rassi *et al.*, 2010).

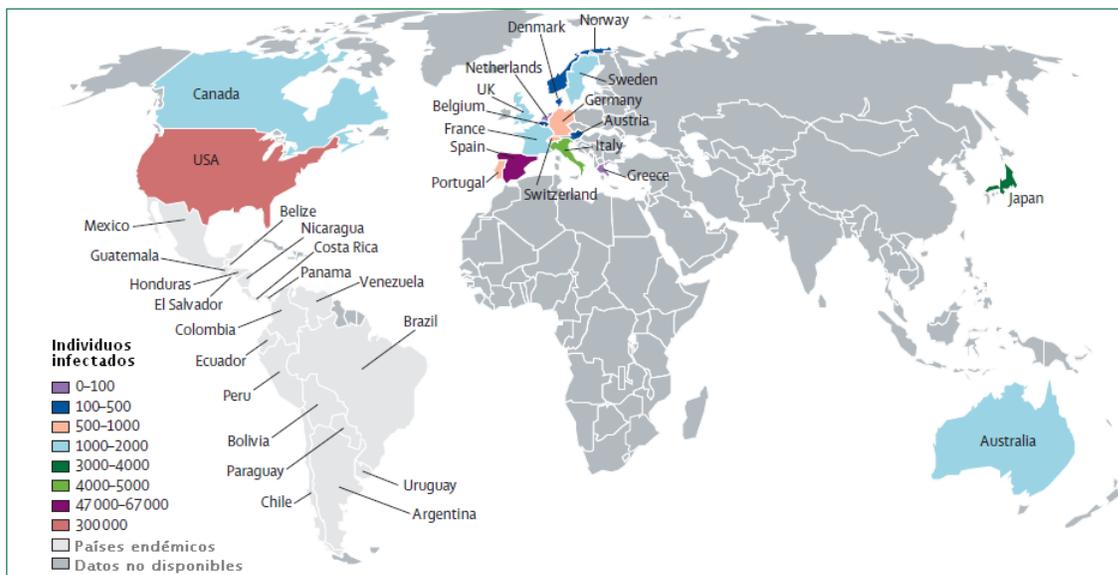


Figura 1. Distribución de la enfermedad de Chagas. Los países endémicos se muestran en color gris claro, principalmente en América Latina; sin embargo, en los últimos años han registrado casos en países donde la migración latina está presente. Modificado de Rassi *et al.*, 2010.

En el 2010, la Organización Panamericana de la Salud (PAHO) y la Organización Mundial de la Salud (WHO) estimaron que alrededor de 25 millones de personas vivían en

las zonas consideradas endémicas y que se exponían al riesgo de contraer la infección, de las cuales aproximadamente 7.7-10 millones estarían ya crónicamente infectadas por *T. cruzi*. Se calcula que en 2008 esta enfermedad mató a más de 10 000 personas (WHO, 2010; Rassi *et al.*, 2012).

Es notable el resultado de los programas que involucran control vectorial, tamizado sanguíneo, y educación de las poblaciones en riesgo. El principal programa inició en 1991 en las naciones del Cono Sur (Uruguay, Paraguay, Bolivia, Brazil, Chile y Argentina) y ha proveído la base para mucho de este progreso. Uruguay y Chile han sido certificados como libres de infección por el vector domiciliado *T. infestans* a finales de 1990, y Brasil fue declarado libre de transmisión en el 2006. En adición, el monitoreo de las donaciones sanguíneas ha aumentado, teniendo una cobertura actual en el 100% de los países endémicos (Rassi *et al.*, 2012).

I.1.2. Manifestaciones Clínicas

A la penetración del parásito en el organismo sigue un periodo de incubación de entre 4 a 14 días, tiempo en el que *T. cruzi* sufre transformaciones de tripomastigote sanguíneo a amastigote y se introduce en las células hospederas (Tay *et al.*, 1980; Gómez-Marín, 2010). El sitio de entrada del parásito se caracteriza por la presencia de tripomastigotes en leucocitos y células subcutáneas, y el desarrollo de un edema intersticial, infiltración linfocítica, e hiperplasia reactiva de los nódulos linfáticos adyacentes. Después de la diseminación a través del sistema linfático y el circulatorio, los parásitos se concentran principalmente en los músculos (incluido el miocardio) y las células ganglionares (Rassi *et al.*, 2012).

Esta enfermedad presenta dos fases clínicas y sólo la fase aguda, que dura entre 6 a 8 semanas, es curable (WHO, 2010). En la mayoría de los individuos, la fase aguda es asintomática. Los síntomas que se desarrollan (si éstos se desarrollan), alrededor de los 8-10 días después de la invasión celular, o a los 20-40 días después de una transfusión con sangre infectada con *T. cruzi*, son fiebre prolongada, malestar intenso de hígado, bazo, y nódulos linfáticos, y un edema subcutáneo (general o localizado). En la transmisión vectorial, hay signos en el sitio de entrada del parásito, conocido como Chagoma (Fig. 2i). La piel presenta un área endurecida con eritema e inflamación; cuando el sitio de entrada es

la membrana de la mucosa ocular se produce el Signo de Romaña que consiste en el edema unipalpebral, indoloro, que dificulta la apertura de los párpados (Romaña, 1935) (Fig. 2ii), donde los tripomastigotes metacíclicos invaden las células e inician un ciclo intracelular que dura un promedio de 4 días (Gómez-Marín, 2010). En esta misma fase entre el 5 y el 10% de los pacientes son sintomáticos y pueden presentar complicaciones viscerales, que se caracterizan por la presencia de fiebre, hepatoesplenomegalia, poliadenitis generalizada, anasarca, diarrea, signos bronquiales, cardiomegalia y meningoencefalia, principalmente en niños menores de 2 años (Tay *et al.*, 1980; Gómez-Marín, 2010; Rassi *et al.*, 2012). Un electrocardiograma (ECG) podría mostrar taquicardia sinovial, bloqueo atrioventricular de primer grado, bajo voltaje QRS, o cambios primarios en las ondas T; y una radiografía de pecho podría mostrar diferentes grados de cardiomegalia (Fig. 2) (Rassi *et al.*, 2012). Después del periodo agudo, la infección aparentemente se resuelve, sin embargo puede presentarse un periodo de latencia en la que los parásitos se multiplican lentamente dentro de las células. Hay disminución casi total de la sintomatología, permaneciendo así por largo tiempo.

Algunos años después (10 a 30 años) del inicio de la fase crónica, los parásitos permanecen ocultos principalmente en el músculo cardiaco y digestivo. Hasta un 30% de los pacientes sufren trastornos cardiacos y hasta un 10% presentan alteraciones digestivas (típicamente, agrandamiento del esófago o del colon), neurológicas o mixtas. Con el paso de los años, la infección puede causar muerte súbita o insuficiencia cardiaca por la destrucción progresiva del músculo cardiaco (WHO, 2010; Gómez-Marín, 2010).

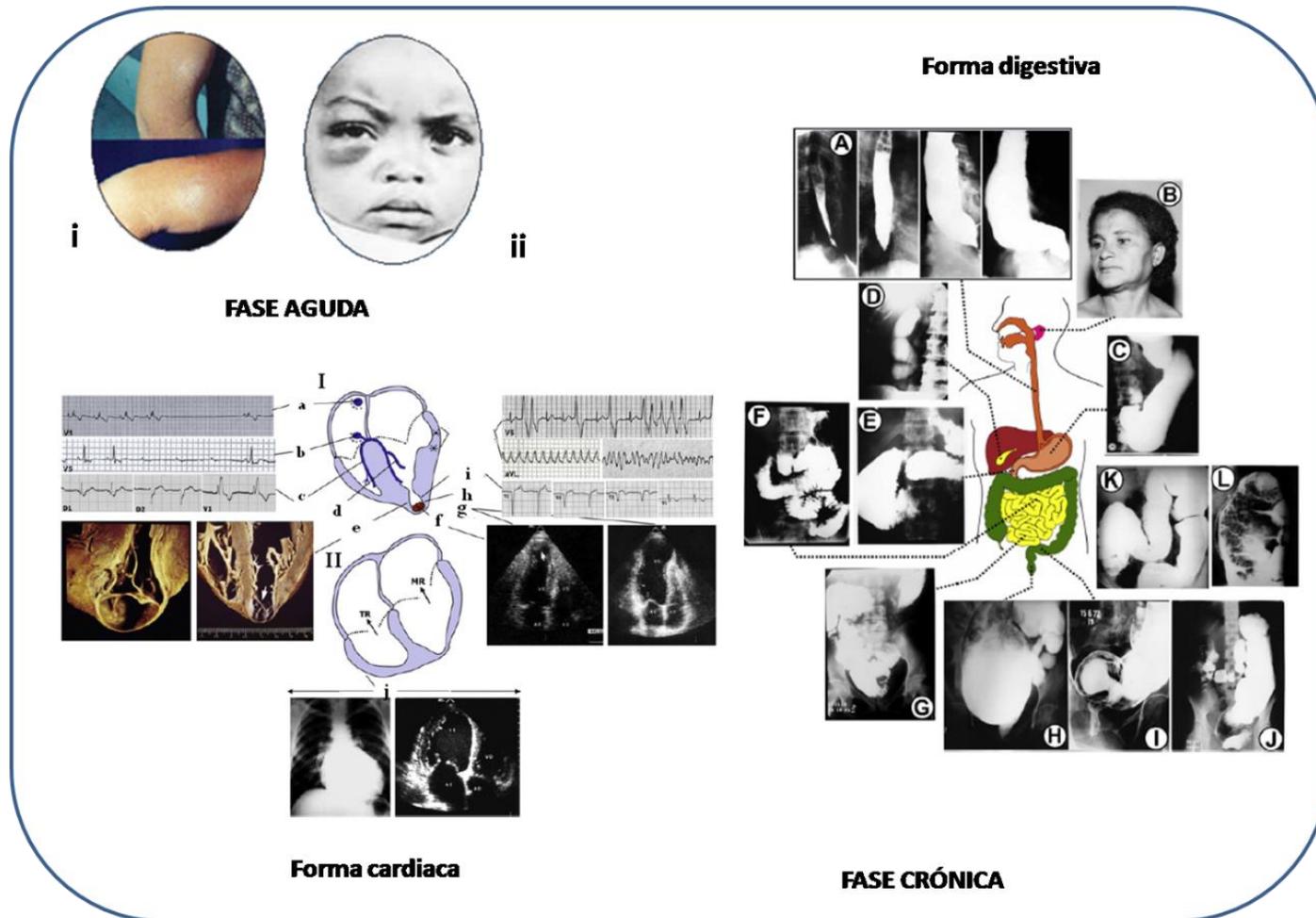


Figura 2. Manifestaciones clínicas. En la fase aguda se puede presentar un Chagoma de inoculación (i) o el Signo de Romaña, inflamación palpebral en un niño afectado por la enfermedad de Chagas (ii). En la fase crónica se distinguen manifestaciones cardíacas o digestivas. Forma cardíaca: a) Disfunción del nodo sinusal, b) Bloqueo atroventricular, c) Bloqueo de la rama derecha, d) Bloqueo fascicular anterior derecho, e) Aneurisma apical, f) Coágulo, g y h) Aneurisma apical, i) Ondas Q, j) Enfermedad cardíaca avanzada. Forma digestiva: A) Megaesófago, B) Parótidas hipertrofiadas en paciente con megaesófago, C) Megaestómago, D) Colescistomegalia, E) Megaduodeno, F) Megajejuno, G) Megaileum, H) Megarecto, I) Megasigmoides, J) Megarectosigmoides, K) Megacolón total, L) Fecaloma. (Tomado de Carrada-Bravo, 2004; Rassi et al., 2010; Rassi et al, 2012)

I.1.3. Transmisión.

Para los humanos, la infección por *T. cruzi* puede ocurrir en condiciones naturales, mediante el contacto con los triatóminos. El resultado dependerá de una serie de variables que regulan las posibilidades de infección. Entre estos se encuentran, el tiempo transcurrido entre la picadura y la defecación, el número de evacuaciones del vector y la cantidad durante este intervalo de tiempo, el número de parásitos depositados, el porcentaje de formas infectivas y su capacidad de penetración, la intensidad de la picazón, etc. (Rassi *et al.*, 2010).

Transmisión Vectorial. Es la forma más importante, ya que es el mecanismo natural de infección y sucede cuando un triatómino defeca sobre el huésped depositando junto con las heces a los tripomastigotes metacíclicos, los cuales pueden penetrar la piel indemne, la herida de la picadura, por acción mecánica en el momento del rascado, al frotarse los ojos con los dedos contaminados con materia fecal del vector, por la mucosa oral o nasal o al ingerir triatóminos infectados (Tay *et al.*, 1980). El número de nuevos casos anuales por transmisión vectorial es de 41 200 (tasa de 7.7 por cada 100 000 habitantes) (Gómez-Marín, 2010).

Otros mecanismos de transmisión. Durante la segunda mitad de la gestación los tripomastigotes sanguíneos de la madre pueden penetrar la barrera placentaria e infectar al producto (Tay *et al.*, 1980). El número anual de casos nuevos de Chagas congénito es de 14 385 (Gómez-Marín, 2010) y en algunas regiones de Bolivia, Chile y Paraguay la transmisión en mujeres con infecciones crónicas es del 5% (Rassi *et al.*, 2012). La transmisión por transfusión sanguínea o trasplante sucede de manera frecuente, ya que en países donde no tienen el control adecuado de los donadores y al usar sangre u órganos infectados, *T. cruzi* es transmitido a otras personas, ya que mantiene su viabilidad a la temperatura del refrigerador (4° C) hasta dos meses (Tay *et al.*, 1980). El riesgo después una transfusión de una unidad de sangre proveniente de un donador infectado es de 10-20% (Rassi *et al.*, 2012). Debido a que los tripomastigotes son predominantemente separados en la fracción de plaquetas durante la centrifugación, el riesgo de transmisión por este componente se ha reportado mayor. La transmisión oral por contaminación ocurre cuando

los alimentos estuvieron en contacto con heces de triatóminos infectados (WHO, 2010). Añez *et al.* (2009) registraron la supervivencia de formas de cultivo de *T. cruzi* en alimentos experimentalmente contaminados, siendo que en un 73% de las muestras de frutas, los parásitos permanecieron vivos en periodos entre 6 y 72 horas. Raramente se puede dar las infecciones accidentales que suceden al manipular sangre infectada, animales utilizados para mantener las cepas de *T. cruzi* y cultivos (Tay *et al.*, 1980).

I.1.4. Diagnóstico

El diagnóstico se puede dividir en epidemiológico y clínico, en el primero se tomarán en cuenta la zona de residencia del paciente, últimos viajes realizados con hincapié en zonas endémicas de la enfermedad, conocimiento de los triatóminos y antecedentes de picaduras. Dentro del diagnóstico clínico se encuentran: examen directo de sangre, método de Strout, hemocultivo, inoculación de animales de laboratorio, xenodiagnóstico, cortes histológicos, Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) y los métodos serológicos o inmunológicos (ELISA, Western-blot, hemaglutinación, inmunofluorescencia directa, etc.) (Gómez-Marín, 2010).

I.2. *Trypanosoma cruzi*

I.2.1 Taxonomía

T. cruzi es un protozooario que pertenece al super reino Eukaryota, clase Euglenozoa, orden Kinetoplastida, familia Trypanosomatidae, género *Trypanosoma*, subgénero *Schizotrypanum* (Levine *et al.*, 1980). Todos los miembros del orden Kinetoplastida poseen un organelo particular que los define, el kinetoplasto, el cual está constituido por DNA extranuclear localizado en un punto específico de la mitocondria (De Souza, 2002; Gómez-Marín, 2010). Dicha mitocondria tiene un solo genoma condensado en una estructura de minicírculos y maxicírculos dando lugar al DNA del kinetoplasto (kDNA) (Schamber-Reis *et al.*, 2012).

I.2.2. Genética

En 1999, un comité de expertos decidió agrupar las cepas de *T. cruzi* en dos grandes grupos, conocidos como *T. cruzi* I y *T. cruzi* II. Diez años después, la comunidad científica ha avanzado en el conocimiento de la diversidad de *T. cruzi*. La genotipificación de los diferentes *locus* ha revelado 6 distintas unidades discretas de tipificación o DTUs. Los DTUs están definidos como “serie de stocks que son genéticamente más relacionados uno con el otro que cualquier otro stock, y que son identificable por marcadores genéticos, moleculares e inmunológicos comunes”. Adicionalmente *T. cruzi* DTU II fue dividido en 5 subgrupos, IIa-e (Brisse *et al.*, 2000) basado en la información filogenética a partir de MLEE y marcadores RAPD. DTUs I y IIb corresponden, respectivamente, a *T. cruzi* I y *T. cruzi* II (Zingales *et al.*, 2009).

I.2.3. Morfología

La forma infectiva de *T. cruzi*, el tripomastigote, posee un cuerpo alargado y provisto de un flagelo, además de una membrana ondulante, estructuras que permiten su movilización dentro de la sangre. A lo largo del ciclo de vida sufren profundas alteraciones. Esas formas reciben nombres diferentes en función de su aspecto general, de la manera como el flagelo emerge del cuerpo y de la posición relativa de dos importantes estructuras intracelulares: el núcleo y el kinetoplasto. Las formas de epimastigote se encuentran en el intestino del vector, flagelados anchos y muy móviles con el cinetoplasto entre el núcleo y el flagelo libre. En el caso de los amastigotes las formas son redondeadas con un flagelo externo muy corto o inexistente. (Hoare & Wallace, 1966; Gómez-Marín, 2010).

I.2.4. Ciclo de vida

El parásito transmitido al huésped vertebrado en las heces de la chinche (en México principalmente *T. dimidiata* y *T. pallidipennis*) es llamado en esta etapa tripomastigote metacíclico. Los tripomastigotes pueden invadir inmediatamente las células o pueden ser transportados en la sangre a otros sitios del huésped. Dentro de las células se transforman en formas amastigotes que se multiplican rápidamente. Los amastigotes son redondeados con un flagelo externo muy corto o inexistente. El desarrollo de amastigotes a tripomastigotes se iniciaría después de cumplirse un número preprogramado de divisiones

intracelulares, al cabo de las cuales la célula huésped se destruye y los tripomastigotes entran en el torrente sanguíneo (tripomastigotes sanguíneos). Estos tripomastigotes pueden infectar otras células, pero no son capaces de multiplicarse en la sangre (Atias, 2006; Gómez-Marín, 2010).

Los vectores se infectan al alimentarse del hombre o de los animales domésticos o silvestres infectados (Fig. 3). Los tripomastigotes migran al intestino medio del insecto donde se transforman en epimastigotes, flagelados anchos, muy móviles, con el cinetoplasto entre el núcleo y el flagelo libre. Allí se dividen un gran número de veces. Los epimastigotes se transforman, después de unas 3 o 4 semanas, en tripomastigotes metacíclicos y migran al intestino posterior de donde son excretados con las heces en el momento de la picadura (Atias, 2006; Gómez-Marín, 2010).

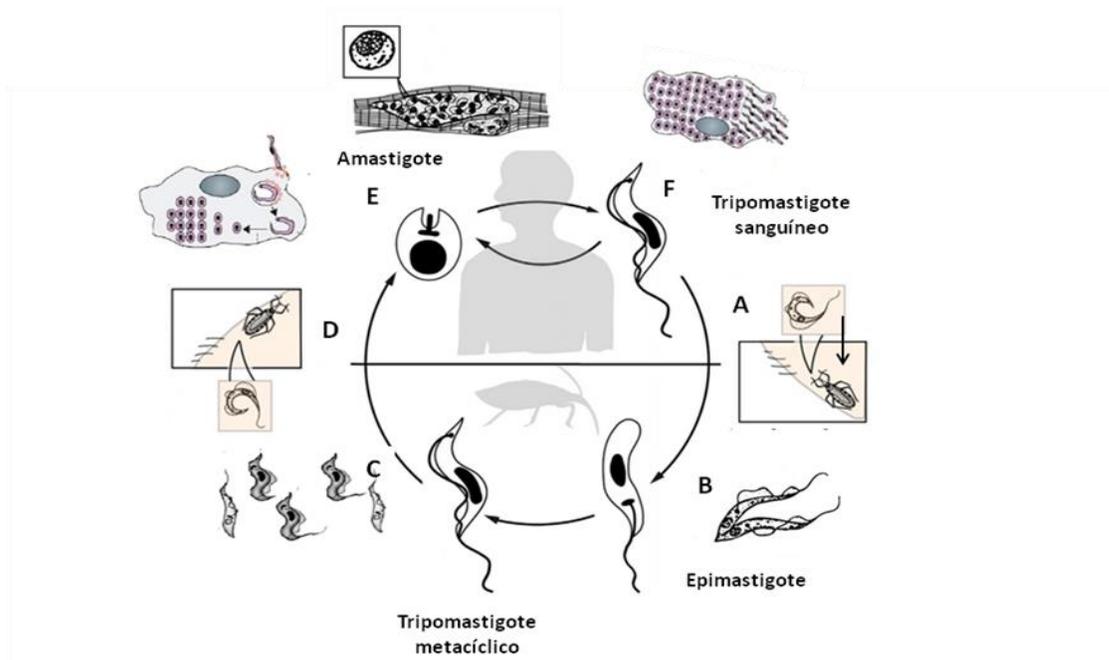


Figura 3. Ciclo de vida de *T. cruzi*. El ciclo comienza cuando la chinche no infectada se alimenta de un mamífero infectado por *T. cruzi* ingiriendo los tripomastigotes sanguíneos (A), éstos, en el tracto digestivo del insecto, viajarán hacia el intestino medio, transformándose en epimastigotes. Posteriormente, los epimastigotes comenzarán a multiplicarse por fisión binaria en el intestino posterior (B) y finalmente llegarán al recto, pasando por metaciclogénesis (convirtiéndose en tripomastigotes metacíclicos) (C), antes de salir por las heces del triatómino. Los tripomastigotes metacíclicos son introducidos al tiempo que el triatómino se alimenta y defeca cerca del sitio de alimentación. *T. cruzi* penetra por la piel infectando localmente (en la misma piel) o sistemáticamente (otros tejidos) (D) y puede infectar cualquier tipo de célula nucleada y se transforma en amastigote (E), este estadio se reproduce asexualmente dentro de la célula hasta lizarla (F). Algunos amastigotes infectarán a otras células y otros se transformarán en estadios sanguíneos. El ciclo continúa cuando otro vector se alimenta del huésped infectado. (Modificado de Álvarez *et al.*, 2012; Rassi *et al.*, 2010; www.cdc.org).

I.3. VECTORES

Dado que el principal factor de riesgo de infección con *T. cruzi* es el contacto estrecho con el vector y dada la diversidad de este en nuestro país es importante estudiar los aspectos biológicos de algunas de las especies más importantes.

I.3.1. Taxonomía y Distribución en México

Estos vectores pertenecen al orden de los Hemípteros, familia Reduviidae y subfamilia Triatominae y contiene numerosas especies que actúan como vectores actuales o potenciales de la enfermedad de Chagas (Lent & Wygodzinsky, 1979; Gómez-Marín, 2010). A nivel mundial se conocen 137 especies de triatóminos (Martínez-Hernández *et al.*, 2010) y sólo 3 géneros (*Triatoma*, *Rhodnius* y *Panstrongylus*) actúan como vectores de *T. cruzi* entre humanos y resorvorios (Carcavallo *et al.*, 2010).

La subfamilia Triatominae, es la única que presenta la hematofagia en el grupo de los Redúvidos (Dujardin *et al.*, 2002). Contiene 6 tribus con 18 géneros, siendo *Triatoma* (Tribu Triatomini), el más distribuido, con aproximadamente 70 especies (Hypsa *et al.*, 2002).

Las especies del género *Triatoma* se agrupan en 9 complejos, siendo el complejo *Phyllosoma* el más distribuido. Las especies que pertenecen a este complejo son: *Triatoma pallidipennis*, *Triatomma longipennis*, *Triatoma bassolsae*, *Triatoma phyllosoma*, *Triatoma mazotti*, *Triatoma mexicana* y *Triatoma picturata* (Martínez *et al.*, 2006). Este complejo ha sido evaluado y renombrado como género *Meccus*, basado en características morfológicas (Carcavallo *et al.*, 2010).

En México se han reportado aproximadamente 33 especies de esta subfamilia, abarcando 7 géneros: *Dipetalogaster*, *Eratyrus*, *Paratriatoma*, *Panstrongylus*, *Belminus*, *Triatoma* y *Rhodnius*. De éstas se han reportado 28 como especies endémicas y 23 infectadas de manera natural por *T. cruzi* (Martínez *et al.*, 2006). Dentro de las especies endémicas, que pertenecen al complejo *Phyllosoma*, se han encontrado los porcentajes de infección más altos, por ello su importancia epidemiológica (Martínez-Hernández *et al.*, 2010).

Las zonas de riesgo para la transmisión vectorial de la Enfermedad de Chagas en la mayoría de los países de América Latina, se ubican en las áreas rurales donde existe una

alta proporción de viviendas en condiciones precarias y una convivencia estrecha con los ambientes silvestres del vector (Magallón-Gastélum *et al.*, 2006), aunque también se ha encontrado la presencia de triatóminos en las zonas urbanas.

En México, la presencia rural de la infección se intensifica con el acelerado proceso de urbanización al poner en contacto a grandes sectores de la población con los vectores.

I.3.2. Ciclo de vida de triatóminos

Este grupo de insectos presentan un desarrollo hemimetábolo o metamorfosis incompleta. A grandes rasgos, poseen una probóscide dividida en tres segmentos y replegada debajo del tórax durante el reposo. El tamaño puede variar entre 5 a 45 mm, así como el color (amarillo claro a negro) (Gómez-Marín, 2010).

Después de la eclosión, los insectos de la subfamilia Triatominae pasan a través de 5 estadios ninfales antes de emerger en el estado adulto (Fig. 4). Durante todas estas fases son hematófagos. Bajo condiciones de laboratorio, el desarrollo de un triatómino es completado en un lapso de 6 meses aproximadamente. Generalmente, en condiciones naturales, una hembra puede ovopositar de 100 a 600 huevos durante su vida y el tiempo de incubación de un huevo varía entre 18 a 20 días. En cada uno de los estadios requieren 6-12 veces su peso en alimento, así como la activación hormonal para pasar a la ecdisis y dar origen a la siguiente muda (WHO, 2010; Noireau *et al.*, 2009; Schaub, 2009).

Los triatóminos normalmente son activos durante la noche, *T. infestans* tiene dos picos de actividad, al anochecer y al amanecer, correspondientes a la búsqueda de alimento y un lugar para descansar, respectivamente. La actividad está controlada por la luz y la temperatura (WHO, 2010). El hecho de que los triatóminos sean hematófagos obligatorios explica la estricta relación entre los insectos y sus fuentes de alimentos que afecta su biología y comportamiento (WHO, 2010).

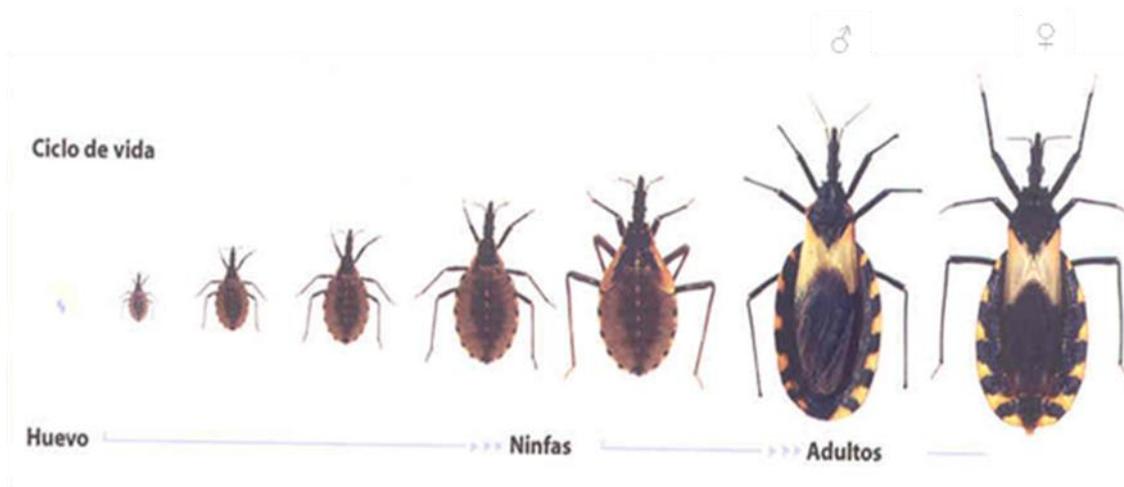


Figura 4. Huevo, estadios ninfales y adulto de *Triatoma pallidipennis*. Se muestra, de izquierda a derecha, los huevos, 5 estadios ninfales, el macho adulto y la hembra adulto. (Tomado de Instituto Nacional de Salud Pública-Bayer).

I.3.3. Morfología

Los triatóminos adultos difieren de los estados ninfales por la presencia de los ocelos y los órganos reproductores externos bien desarrollados, y en algunos de los casos, el desarrollo de las alas posteriores y anteriores (Lent & Wygodzinsky, 1979).

Las hembras se pueden reconocer de los machos por la forma terminal del abdomen, que puede ser en forma de punta o truncada. Las hembras son usualmente más grandes que los machos. El triatómino más grande que se conoce es *Dipetalosgaster maxima* de 4.4 cm y el más pequeño *Alberprosenia goyavarsagi* de sólo 5 mm (Lent & Wygodzinsky, 1979).

La mayoría de las especies de triatóminos se distinguen por los patrones de colores (Lent & Wygodzinsky, 1979).

La cabeza está orientada hacia delante, movable y tiene un cuello distinguible (Fig. 5). En la mayoría de las especies, la cabeza es de forma subcilíndrica y en promedio tres veces más larga que la distancia entre los ojos (Lent & Wygodzinsky, 1979). Las antenas consisten en cuatro partes articuladas. El tórax se divide en tres partes: protórax, mesotórax y metatórax, que son estructuras utilizadas en la taxonomía. El protórax está fuertemente desarrollado dorsalmente, formando el pronotum. La porción posterior de la superficie dorsal del mesotórax, visible entre la base de las alas, es el escutelum (Fig. 5).

Los triatóminos poseen dos pares de alas. Las alas anteriores, asociadas al mesotórax, son referidas como hemielitra, por ser elitros con una porción membranosa. Las

alas posteriores, apéndices del metatórax y cubiertas por el hemielitra, son uniformemente membranosas.

Las patas de estos insectos poseen una estructura generalizada, que consta de: coxa, trocánter, fémur, tibia y un tarso normalmente desarrollado (Fig. 5).

El abdomen es de forma ovoide. Formado por 11 segmentos, los urotergitos en la parte dorsal y los urosternitos en la ventral. El conexivum permite la expansión del abdomen durante la ingesta (Fig. 5).

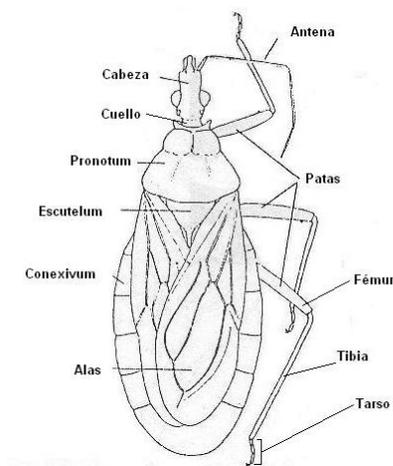


Figura 5. Aspecto general de un triatómino. Se muestran los principales segmentos del insecto, cabeza, tórax y abdomen. (Tomado de Lent & Wygodzinsky, 1979).

I.3.4. Fisiología

Los miembros de la subfamilia Triatominae poseen una probóscide rectilínea, estrecha con mandíbulas adaptadas para perforar superficies suaves, la rectitud de la probóscide se debe a una membrana articular entre el segundo y tercer segmento del rostro (Dujardin *et al.*, 2002).

La adaptación a la hematofagia está asociada a la costumbre de frecuentar nidos de aves y madrigueras de pequeños mamíferos, construidos a partir de materiales orgánicos y vegetales donde se encontraban fitófagos (las primeras opciones de alimentación) (Dujardin *et al.*, 2002) esta adaptación ha sido un evento clave en las enfermedades transmitidas por vectores.

La digestión de la hemoglobina por parte de los insectos hematófagos, da como resultado la liberación de grandes concentraciones de grupos hemo. Este grupo es una

molécula tóxica, debido a su capacidad de formar especies reactivas del oxígeno (EROs) (Graca-Souza *et al.*, 2006). Es por esto, que el cambio a este estilo de alimentación debió conllevar cambios anatómicos (aparato bucal), fisiológicos (glándulas salivales) e inmunológicos (mucosa del sistema digestivo) (Mejía *et al.*, 2006).

La sangre que queda almacenada en el intestino medio será procesada paulatinamente por una serie de enzimas digestivas y ahí es donde se llevará a cabo la asimilación de nutrientes (parte posterior). Solo una pequeña cantidad de alimento es digerida, ampliando la sobrevivencia por largos periodos de inanición (Kollien & Schaub, 2000). Ante esta asimilación paulatina y su consiguiente carencia de algunos nutrientes, el intestino anterior cuenta con una serie de simbioses, que aportan los nutrientes faltantes (Lehane, 2005).

La endocutícula abdominal de estos insectos se plastifica, permitiendo así la distensión abdominal (por lo que pueden ingerir grandes cantidades de sangre) y produciendo la defecación (Carcavallo *et al.*, 1985).

Hemolinfa: función y componentes

Poseen un sistema circulatorio abierto, siendo la hemolinfa el tejido circundante de toda la cavidad corporal (hemocèle). Dicha hemolinfa es el almacén de agua, y debido a su respiración traqueal, ésta no participa en el transporte de O₂ o CO₂ como lo hace la sangre (Paskewitz & Christensen, 1996).

Las células que componen la hemolinfa, y que también poseen una función inmunológica son los hemocitos, que participan en procesos de almacenamiento y distribución de nutrientes o síntesis de proteínas. Los tipos de hemocitos que más se reportan en la literatura son: prehemocitos, granulocitos (o células granulares), plasmotocitos, esferulocitos (o células esferulares) y oenocitoides. Estos hemocitos han sido descritos en diferentes especies de órdenes como: Lepidoptera, Diptera, Orthoptera, Coleoptera, Hymenoptera, Collembola y Hemiptera (Lavine & Strand, 2003).

La parte proteica de la hemolinfa reportada está básicamente conformada por lipoforinas y proteínas de almacenamiento, ambas participan en la metamorfosis y desarrollo de estadios (Chinzei *et al.*, 1993). También encontramos a las proteínas que unen grupos hemo, que tienen la capacidad de cruzar el epitelio intestinal (Paiva-Silva *et al.*,

2002). Otras proteínas presentes son las lectinas, que aglutinan células debido a su gran afinidad a los azúcares (Mello *et al.*, 1996).

Las lipoforinas son las encargadas del transporte de lípidos en la hemolinfa (y otros tejidos) en insectos.

La información actual sugiere que, a diferencia de los mamíferos, tanto la transferrina y la ferritina participan en el transporte de hierro, y que las ferritinas de insectos son principalmente proteínas de secreción. La sobreexpresión de estas proteínas está asociada con el aumento en la deposición de hierro, cambios en el crecimiento celular y mejora en la respuesta a un reto oxidativo (Pham & Winzerling, 2010).

En invertebrados, las lectinas son de vital importancia en el reconocimiento y eliminación de patógenos. La fagocitosis tiene interacción directa con sustancias humorales, entre ellas las aglutininas (o lectinas). Las lectinas son proteínas que tienen la habilidad de aglutinar células con carbohidratos complementarios en sus superficies de manera específica y reversible. Pueden reconocer todo el azúcar, un sitio en especial, una secuencia de azúcares o las uniones glicosídicas. La hemolinfa posee actividad hemaglutinante con la cual aglutina los eritrocitos de los vertebrados y algunos microorganismos, debido a esto, una gran variedad de estudios se han concentrado en las relaciones parásito-vector (Mohamed *et al.*, 1992; Patnaik *et al.*, 2012). Además de las hemaglutininas, las formas inducibles de aglutininas por acción de una herida o algún microorganismo han sido reportadas en *Sarcophaga peregrina* (Díptera), en *Anticarsia gemmatalis* (Lepidóptera) y en *Manduca sexta* (Lepidóptera) (Patnaik *et al.*, 2012). LDL1 (lectina 1 de *B. discodalis*) y GSL (lectina β -1,3-glucano específica), ambas encontradas en *B. discodalis*, juegan un papel muy importante, la primera tiene propiedades muy similares a las MBLs (lectinas de unión a manosas en vertebrados) en términos de especificidad, estructura y activación del complemento. La GSL se ha encontrado que muestra similitud a las proteínas C-reativas. Estas dos lectinas endógenas también son capaces promover la activación de a cascada de la profenolixidasa (Patnaik *et al.*, 2012).

De menor tamaño, podemos encontrar péptidos, que tienen diversas funciones, como son: neuropéptidos, lisozimas y péptidos antimicrobianos (AMPs).

Los neuropéptidos son secretados por medio del sistema nervioso hacia la hemolinfa, desempeñando principalmente un papel hormonal y mediando diferentes

procesos fisiológicos como la alimentación, estrés, ecdisis, etc. Se encuentran en tan bajas concentraciones que es difícil detectarlos (Chen *et al.*, 2009). Hoy en día existe poca información sobre el aislamiento y caracterización de neuropéptidos en insectos. La hormona de activación preecdisis (PETH) ha sido bien estudiada, esta 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).

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 peptidoglucano 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 poseen lisozimas tipo “c”, las cuales ya han sido aisladas de diferentes órdenes, entre ellos de hemípteros (*R. prolixus*). Las lisozimas aisladas de estas chinches presentan un peso molecular ~15 kDa (Ursic-Bedoya *et al.*, 2008).

Los AMPs, producidos también por el cuerpo graso (Tsakas & Marmaras, 2010), se consideran evolutivamente como unas armas ancestrales. En diferentes modelos, algunos aspectos de la inmunidad innata son constantes. Ahora está claro que los parásitos ingeridos inducen una respuesta inmune local (en el intestino) que puede ser seguida por una respuesta sistémica (en la hemolinfa) (López *et al.*, 2003), ya que la mayoría de ellos no invaden la hemolinfa, como lo hace *Plasmodium sp.* Por esta razón, la inducción de la síntesis de AMP no puede ser atribuida a la migración del parásito a la hemolinfa o asociada al daño tisular. Un entendimiento concreto de cómo los AMPs son inducidos en los tejidos que no tienen contacto con el parásito, el papel multifuncional de los AMPs, y las moléculas de señalización involucradas en la inducción de la respuesta sistemática son imperativos para saber cómo los insectos, y otros organismos, sobreviven a la presencia del patógeno.

Más de 150 AMPs han sido caracterizados y aislados en insectos. Son pequeñas moléculas (12-50 aminoácidos) catiónicas que se unen a la membrana aniónica de bacterias y hongos (Tsakas & Marmakas, 2010). Algunos de los péptidos antimicrobianos más estudiados son las dipterocinas (atocinas, sarcotoxin II, abaecinas, apidaecinas, hymenoptaecinas, etc), las cecropinas (bactericiditas, sarcotoxin I, ceratotoxina), las

lisozimas, las defensinas (sapecinas, sarcotoxin III, formicinas, royalisinas), las coleptericinas, drosocinas, entre otras (Beaty & Marquardt, 2003). También se han clasificado en 4 grupos dependiendo de la composición de aminoácidos: a) cecropinas, b) péptidos ricos en cisteínas, c) péptidos ricos en prolina, y d) péptidos ricos en glicina.

La parte restante de la hemolinfa se compone de iones, plasma, aminoácidos libres y otras moléculas (Paskewitz & Christensen, 1996). Dentro de los iones que posee la hemolinfa, se han mencionado en especies de lepidópteros como *Hyalophora cecropia* y *Manduca sexta* la presencia de Na^+ , Ca^+ , K^+ y Mg^+ , así como la trehalosa, que se piensa es el principal azúcar en la hemolinfa (Gu *et al.*, 2009).

II. ANTECEDENTES

II. 1. Relación parásito-vector

La interacción *T. cruzi*-Triatómino es compleja y es mediada por muchos factores del insecto y del parásito (García *et al.*, 1999). El parásito se multiplica y diferencia en el tracto digestivo del triatómino. Si los tripomastigotes en sangre son ingeridos por el vector, la primera transformación en epimastigotes ocurre en el estómago e inicia unas horas después de la ingestión del parásito. La tasa de diferenciación y desarrollo del parásito en el tracto digestivo depende de la cepa/clona del parásito, así como la especie del vector (García *et al.*, 1999). La transformación a tripomastigotes metacíclicos ocurre en todo el tracto predominantemente en el recto (García & Azambuja, 1991).

El establecimiento de la infección por *T. cruzi* en el tracto digestivo del huésped es afectado por muchos factores del insecto. Entre éstos se incluye un factor lítico de cultivo que fue purificado y caracterizado como péptido básico que lisa la membrana del eritrocito, liberando hemoglobina libre para la digestión (Azambuja *et al.*, 1983). El factor lítico lisa muchas cepas/clonas del parásito, con diferente cinética de lisis (García *et al.*, 1999). Por ejemplo, los experimentos *in vitro* con epimastigotes de diferentes cepas de *T. cruzi* demuestran que algunos flagelados son más resistentes que otros a la acción del agente lítico (García *et al.*, 1999).

Además, las lectinas juegan un papel importante en el establecimiento de *T. cruzi*, debido a su capacidad aglutinante (Mello *et al.*, 1996).

García *et al.* (1999) demostraron que la diferenciación de los epimastigotes en tripomastigotes metacíclicos en el intestino del insecto se realiza si la hemoglobina o los péptidos correspondientes a los residuos 30-49 y 35-37 de la cadena α D-globina son agregados a la dieta infectiva. Además, postulan que los fragmentos de globina, liberados por las enzimas proteolíticas que atacan a la hemoglobina, modulan la dinámica de transformación de *T. cruzi* en el tracto digestivo del vector.

II.2. Respuesta de Triatominae contra *Trypanosoma cruzi*

Algunos investigadores sugieren que existen factores intestinales que participan en el desarrollo de *T. cruzi* (Isola *et al.*, 1986). El parásito se desarrolla dentro del tubo digestivo del vector donde la presencia de enzimas digestivas y un factor hemolítico producen un ambiente hostil (en donde puede haber inducción de lisis) para este parásito (Azambuja *et al.*, 1983). En el caso de *R. prolixus*, y del resto de los triatóminos no se ha demostrado que se induzcan moléculas antibacteriales y tripanolíticas, pero sí lisozimas y formación de nódulos cuando se inocula en hemolinfa. Además, el número de *T. cruzi* en la hemolinfa está directamente relacionado con la actividad de PO (Fenol oxidasa) que decrece temprano después de la desaparición del parásito (Mello *et al.*, 1995). Al parecer, *T. cruzi* no tiene la habilidad de escapar de algunas respuestas inmunes de la hemolinfa. Se ha demostrado que los carbohidratos sobre la superficie del parásito son distintos entre diferentes cepas (Mello *et al.*, 1996). Por lo tanto, las lectinas del intestino y hemolinfa y los carbohidratos de la superficie del parásito pueden ser determinantes en la efectividad de la interacción tripanosoma-*Triatoma*, pero es difícil hacer generalizaciones acerca de dicha relación sin tomar en consideración muchas de las cepas del parásito en cuestión.

II.3. El Proteoma en el estudio de la hemolinfa en Insectos

La proteómica se refiere al análisis global del complejo de proteínas de una mezcla, que involucra la habilidad de analizar e identificar dichas proteínas en células, tejidos, fluidos corporales e incluso pequeños organismos (De Morais *et al.*, 2003), dicho análisis proteómico permite observar directamente la influencia de una perturbación en la expresión bajo ciertas condiciones (Castellanos-Martínez *et al.*, 2011).

En la mayoría de los trabajos, el estudio de la proteómica involucra la identificación por medio de técnicas de separación de mezclas de proteínas o geles de electroforesis de alta definición (como la Electroforesis 2D) visualizando un gran número de péptidos separados por medio de métodos espectrométricos (De Morais *et al.*, 2003).

Recientemente, la proteómica se ha expandido para cubrir estudios de cambios en la expresión de proteínas en tejidos o fluidos corporales (como la hemolinfa) en distintos estadios de desarrollo (Zhang *et al.*, 2014), bajo influencia de variables ambientales

(Yergey *et al.*, 2002) o ante la interacción con algún parásito (Vierstraete *et al.*, 2004; Hoffman, 2003; Paskewitz & Shi, 2005; Castellanos-Martínez *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2014).

La hemolinfa en los insectos tiene un papel importante en el transporte de nutrientes y de hormonas, almacenamiento de aminoácidos, balance hídrico, respuesta a heridas e inmunidad (Zhang *et al.*, 2014). También se sabe que contiene una relativamente alta concentración de serpinas (proteínas que regulan la actividad de proteasas tipo serina) (Moreira *et al.*, 2014), y dichos procesos proteólicos involucran la formación de melanina (cascada de la profenoloxidasa) para la encapsulación de patógenos (Kanost *et al.*, 2001).

La mayor parte de los estudios sobre inmunidad en insectos, por medio de la proteómica, se han llevado a cabo en *D. melanogaster* (Díptera), donde han identificado cuatro genes con alta similitud a las proteínas que presentan enlaces tioéster (TEP) de factores de complemento y a la superfamilia de la alfa-2 macroglobulina en mamíferos (Lagueux *et al.*, 2000), además de proteasas, inhibidores de proteasas o serpinas, enzimas con actividad parecida a la profenoloxida, peptidoglicina, hidroximonooxidasa y transferrina (Levy *et al.*, 2004), enzimas metabólicas, proteínas estructurales, proteínas con propiedades de chaperonas (proteínas de shock térmico) y algunas involucradas en respuesta inmune como son la thiorredoxina, la profenoloxidasa y algunas serinas proteasas (De Morais *et al.*, 2003). Estas proteínas que juegan un papel central en la respuesta inmune de los insectos, regulando procesos como la coagulación de la hemolinfa, melanización de la superficie de patógenos y la síntesis de péptidos antimicrobianos (Gorman & Paskewitz, 2001; Moreira *et al.*, 2014).

En el caso de *Anopheles gambiae* (Díptera), Paskewitz y Shi (2005) muestra la presencia de algunas proteínas constitutivas que pueden tener una función en la inmunidad. Estas incluyen la subunidad PPO2, dos dominios de anclaje de serinas proteasas (CLIP B4 y A6), una proteína thioéster (TEP15), dos serpinas (SRPN2 y SRPN15), una cistatina y apolipoproteína III (apoLPIII), la proteína TEP1, capaz de unirse a bacterias Gram negativas promoviendo su fagocitosis (Levashina *et al.*, 2001).

III. JUSTIFICACIÓN

Triatoma pallidipennis es uno de los vectores de la enfermedad de Chagas más importantes en México debido a su distribución y los porcentajes de infección con *T. cruzi*. A pesar de la poca información sobre los componentes de la hemolinfa del género *Triatoma*, se sabe que ésta juega un papel esencial en la interacción vector-parásito.

IV. HIPÓTESIS

- Si existe una respuesta sistémica ante la presencia del parásito, se observarán cambios en el patrón 2D de proteínas en hemolinfa comparando un vector infectado contra uno no infectado.

V. OBJETIVOS

Objetivos generales

- Caracterizar proteínas de la hemolinfa de *T. pallidipennis*.
- Comparar la abundancia de estas proteínas en insectos infectados y no infectados con *T. cruzi*.

Objetivos particulares

- Estudiar las proteínas de hemolinfa de *T. pallidipennis* por medio de la electroforesis SDS-PAGE.
- Determinar que patrón de bandas proteicas tiene actividad antigénica por medio de la elaboración de anticuerpos policlonales en conejo.
- Caracterizar un mapa 2D de la proteínas que se mantienen constantes y diferenciales en la hemolinfa de *T. pallidipennis* sin infectar.
- Caracterizar un mapa 2D de las proteínas que se mantienen constantes en la hemolinfa de *T. pallidipennis* infectado por *T. cruzi*.

VI. MATERIAL Y MÉTODOS

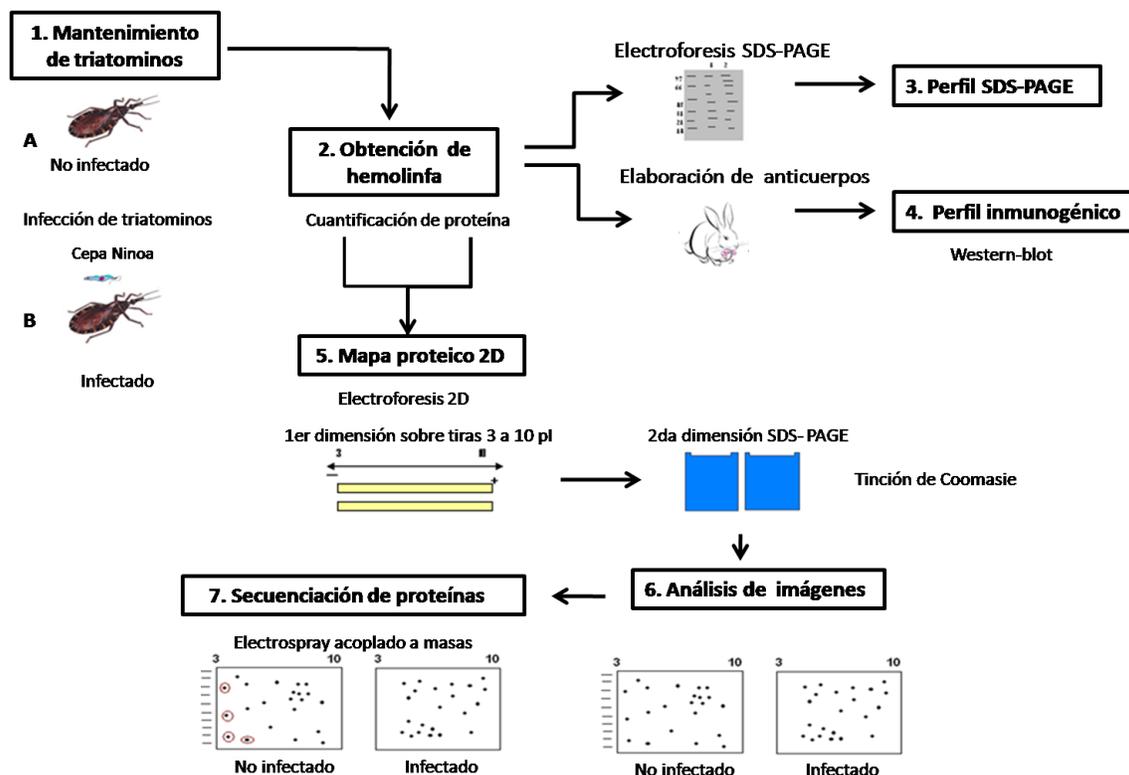


Figura 6. Diseño experimental para el análisis de hemolinfa. El mantenimiento de triatóminos en ambas condiciones A) insectos no infectados y B) insectos infectados con la cepa Ninoa de *T. cruzi*. Enseguida se obtuvo la hemolinfa de los insectos en cada una de las condiciones por medio de la punción con alfiler entomológico. Se procede a la electroforesis SDS-PAGE y la obtención de anticuerpos. La otra parte de la hemolinfa se analizó por electroforesis 2D en las dos condiciones. La mezcla de proteínas es aplicada a las tiras IPG con pI de 3 a 10 que separan a las proteínas en base a su punto isoeléctrico. En seguida, las tiras son sometidas a la segunda dimensión en un gel SDS-PAGE en el cual las proteínas son separadas en base a su peso molecular. Los gels son fijados y teñidos en plata. Después de la tinción, los puntos resultantes son identificados y cuantificados. El análisis de imagen se realizó con el software (PD-QUEST). Finalmente, se realizó una secuenciación por electrospray acoplada a masas.

VI. 1. Mantenimiento de los triatóminos.

Se utilizaron 15 triatóminos adultos machos en cada uno de los experimentos, provenientes de la colonia de *Triatoma pallidipennis* (Tabla 1) que se mantuvieron en frascos de vidrio de boca ancha a 28 °C y humedad relativa de 60% en el laboratorio de Entomología del Departamento de Parasitología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional. Dicha colonia se inició con ejemplares

colectados en 1985 en la localidad de Progreso en el estado de Morelos (Calvo-Mendez *et al.*, 1992).

Tabla 1. Secuencia de experimentos para el análisis de hemolinfa de *T. pallidipennis*.

Experimento	Especie	Estadio/ Sexo	Condición
1	<i>T. pallidipennis</i>	Adulto/♂	No infectado
2	<i>T. pallidipennis</i>	Adulto/♂	No infectado
3	<i>T. pallidipennis</i>	Adulto/♂	No infectado
4	<i>T. pallidipennis</i>	Adulto/♂	No infectado
5	<i>T. pallidipennis</i>	Adulto/♂	No infectado
6	<i>T. pallidipennis</i>	Adulto/♂	Infectado
7	<i>T. pallidipennis</i>	Adulto/♂	Infectado
8	<i>T. pallidipennis</i>	Adulto/♂	Infectado
9	<i>T. pallidipennis</i>	Adulto/♂	Infectado
10	<i>T. pallidipennis</i>	Adulto/♂	Infectado

En cada experimento se utilizaron 15 individuos.

Para la infección de triatóminos se inmovilizó a los ratones por medio de malla de alambre y los vectores adultos se alimentaron con ellos por un lapso de 30 minutos. Se emplearon 15 ratones hembras de la cepa CD-1 con un peso de 22 gr. La infección se llevó a cabo mediante la disolución de heces de triatóminos (con 1000 parásitos aproximadamente) que posteriormente se disolvieron en una solución isotónica. La disolución se inyectó intraperitonealmente a cada ratón. Se utilizó la cepa Ninoa que fue aislada en el año de 1984 por xenodiagnóstico a partir de una paciente chagásica aguda del estado de Oaxaca. Esta cepa se mantiene en el laboratorio por pases cada 28 días en ratones BALB/C. Dicha cepa ha sido caracterizada y pertenece al grupo genético DTU1, antes *T. cruzi* genotipo I (Bosseno *et al.*, 2001).

VI.2. Obtención y tratamiento de Hemolinfa.

Para la obtención de hemolinfa tanto en individuos infectados (30 días post-infección) como no infectados, se pinchó con una aguja entomológica entre la coxa y el trocánter de una de las patas del triatómino. Enseguida con ayuda de un capilar y oprimiendo el abdomen del triatómino para promover la expulsión de hemolinfa, se colectaron las gotas provenientes de la herida. Se le agregó el buffer de lisis (14M de Urea,

4M de tiurea, 52 mM de Tris-Base y 8% de CHAPS, más inhibidores de proteasa [25 μ L de EDTA, 5 μ L PMSF, 10 μ L Leupeptin y 1 μ L Pepstatin]) en proporción 1:1, para que las concentraciones finales al agregar la hemolinfa sean las reportadas (7M de urea, 2M de tiurea, 26 mM de Tris-Base y 4% de CHAPS) (Martínez-Velazco, 2004). Se centrifugó a 16,000 g durante 15 minutos y se procedió a almacenar en alícuotas de 20 μ L a -70° C.

Para la cuantificación de proteína contenida en la muestra de hemolinfa se utilizó el 2D Quant kit según las indicaciones del proveedor (Amersham Biosciences). Brevemente, primero se preparó la solución de color mezclando 100 partes del agente A (6 mL) y 1 parte del agente B (60 μ L). Se realizó una curva patrón usando 2 mg/mL de albúmina sérica de bovino (BSA). Se utilizó 6 tubos y se agregó la solución estándar. El tubo 1 se utilizó como el ensayo en blanco (sin proteína) (Bradford, 1976). Por otro lado, se prepararon 6 tubos que contenían 3 μ L de la muestra a ensayar, siendo 3 tubos los correspondientes a la muestra con hemolinfa infectada y 3 tubos a los de hemolinfa sin infectar. Se agregaron 250 μ L de solución precipitante a cada tubo (incluyendo los tubos de la curva estándar), colocando en el vórtex brevemente e incubando los tubos de 2 a 3 minutos a temperatura ambiente. Enseguida se agregaron 250 μ L de solución co-precipitante a cada tubo y se mezcló brevemente por inversión. Para sedimentar la proteína se centrifugó los tubos a 12,800 g por 5 minutos. Un pequeño pellet fue visible. Se decantó el sobrenadante rápidamente para evitar la resuspensión o dispersión del pellet. Se centrifugó de nuevo para separar cualquier líquido restante del fondo del tubo y utilizando una micropipeta se removió el sobrenadante restante. Enseguida se agregaron 50 μ L de solución de cobre y 200 μ L de agua milli Q en cada tubo, usando el vórtex brevemente para disolver la proteína precipitada. Se agregaron 250 μ L de la solución de color a cada tubo y se mezcló por inversión. Se colocó cada una de las muestras en los pozos de una placa de polipropileno suave de 96 pozos, se leyó la absorbancia de cada muestra y de la curva patrón a 490 nm usando el lector de microplacas. Se realizó una curva patrón colocando la absorbancia en el eje de las “x” contra la cuantificación de la proteína. Y se usó dicha curva para determinar la concentración de la proteína en las muestras.

VI. 3 Electroforesis de proteínas SDS- PAGE

La separación de las proteínas se realizó por medio de la electroforesis en geles de Duodecil Sulfato de Sodio (SDS-PAGE por sus siglas en inglés). El procedimiento comienza con un set de tubos distintos para cada muestra con distintas concentraciones a probar, se le agregó PBS a cada tubo para completar un volumen final de 10 μ L y después 2 μ L del amortiguador de corrida (trizma base 0.12, glicina 1M, SDS 0.01 M). Se colocaron los vidrios para elaborar el gel y se agregó una solución de acrilamida al 12% para el gel separador hasta un milímetro menos de donde se colocó el peine, enseguida se agregó la solución de acrilamida al 4% para el gel concentrador y se colocó el peine. Una vez polimerizados, se agregaron las muestras y los marcadores de peso molecular (MPM; no. catálogo 10748-010) y se corrió a 200 volts aproximadamente por 40 minutos (Laemmli, 1970).

VI.4. Producción de anticuerpos anti-proteínas de hemolinfa.

Para la producción de anticuerpos, un conejo fue inmunizado con la hemolinfa extraída como anteriormente se explicó. La hemolinfa (500 μ g) fue mezclada con un volumen igual al adyuvante completo de Freund (Gibco) y dicha emulsión fue inyectada subcutáneamente al conejo (Fig. 6). Dos inyecciones similares fueron aplicadas al día 7 y 15 posterior a la primera inmunización, pero esta vez utilizando adyuvante incompleto de Freund (Gibco). El conejo fue sangrado parcialmente una semana después de la última inmunización, y las muestras pre-inmunes e inmunes fueron analizados por Western-blot y en base a los resultados, se realizó el sangrado total del conejo y se procedió al almacenaje del suero a -20° C (Perez-Morales, 2007).

VI.5. Western Blot.

Para el análisis de las muestras de suero preinmune e inmune, se utilizó la técnica de Western-blot. Se realizó la electroforesis SDS-PAGE con una concentración de 100 μ g de hemolinfa en un gel de poliacrilamida al 12%, las proteínas separadas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa con un sistema de transferencia semi-seco (Bio-Rad) (Fig. 6). La transferencia se realizó cubriendo la membrana, el gel y los papeles filtro con 20 mL de amortiguador de transferencia (ver anexo I) a 20 V durante una hora. Los sitios de unión

no específicos de las membranas fueron bloqueados con leche descremada al 10% en PBS durante 12 horas a 4° C. Posteriormente, las membranas fueron incubadas durante 2 horas a temperatura ambiente con el anticuerpo primario (suero del conejo, dilución 1:5000) en una solución de leche descremada al 10% en PSB. Las membranas fueron lavadas tres veces durante 10 minutos cada vez con PSB Tween 20 0.01% y a continuación incubadas durante 2 horas a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario (IgG anti-rabbit acoplado a HRP [Invitrogen no. catálogo A1054], dilución 1:1000) diluidos en PSB Tween 20 0.01%. Finalmente, las membranas fueron lavadas tres veces durante 10 minutos cada vez con PBS Tween 20 0.01% y reveladas con el sustrato 3,3- diaminobenzidina (0.5 mg/ml en PBS) y 0.02% de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) (Sánchez et. al, 2001).

VI.6. Electroforesis de proteínas 2D.

La primera dimensión comenzó con la hidratación de tiras de IPG (pI 3-10) con el buffer de hidratación (7M Urea, 2M tiourea, 4% CHAPS) (Vierstraete *et al.*, 2004) y 100 µg de proteína. A este volumen se le agregaron 2.63 µL de DDT (agente reductor) y 2.5 µL de IPG (ayuda a formar el gradiente de pH) (Biorad no. catálogo 163-2002), para conseguir un volumen total de 125 µL se agregó el volumen necesario del amortiguador de rehidratación (0.0525 g de Urea, 0.019 g de tiourea, 0.005 g de CHAPS y trazas de Azul de bromofenol para 125 µL). Cada tira se colocó para la hidratación en la cámara Protean IEF cel Biorad. Se dejó reposar las tiras con la solución de hidratación durante 90 minutos y se agregó aceite mineral para evitar que la tira se deshidrate. Enseguida se dejó reposar durante toda la noche. Al siguiente día, se lavaron las tiras IPG con agua milli Q y se colocaron en la cámara para la primera dimensión haciendo coincidir los polos de las tiras con los de la cámara. Se agregaron 2 mL de aceite mineral en cada canal que contuviera una tira. Enseguida se hicieron coincidir los polos de la cámara con los del aparato de isoelectroenfoque (IEF), se inició el programa de electroforesis (200 volts durante 20 minutos, 4000 volts durante 2 horas y el tiempo necesario hasta llegar a 10 000 volts). Al término de la primera dimensión se lavaron las tiras IPG con agua milli Q y se elaboró el amortiguador de equilibración (0.335 mL de Tris-Cl ph 8.8, 3.6 g de Urea, 3.45 mL de glicerol, 0.2 g de SDS y trazas de azul de bromofenol para un volumen total de 10 mL, siendo 2.5 mL para cada tubo). Cada una de las tiras IPG se colocó en una solución de 2.5

mL de amortiguador de equilibración más 0.025 g de DTT. Se dejó reposar por 15 minutos. Enseguida, se retiraron las tiras y se colocaron en una solución de 2.5 mL de amortiguador de equilibración más 0.065 g de Iodoacetamida. Se dejaron reposar durante 15 minutos. Durante el tiempo en que las tiras IPG se encontraban en el amortiguador, se procedió a elaborar el gel de poliacrilamida al 12 % (APS al 15%, acrilamida al 30%-bisacrilamida 0.8%, TEMED, Tris-Cl pH 8.8 y agua milli Q) para la 2da dimensión. Para la solidificación del gel se hicieron coincidir los vidrios de la cámara y se colocó la solución de poliacrilamida (Laemmli, 1970). Una vez solidificados los geles se hicieron coincidir los polos de las tiras con el gel con respecto a como se colocaron en la cámara y se introducen las tiras de modo que el extremo de pI 3 este del lado del pozo de los MPM y estando en contacto con el gel de acrilamida. Para inmovilizar las tiras sobre el gel se le agregó agarosa al 5%. Se corrió la segunda dimensión durante 40 minutos a 200 volts (Martínez-Velazco, 2004).

Para la secuenciación se requirió una tinción azul de Coomasie, compatible con la técnica de electrospray acoplado a masas. Se sumergieron los geles en solución de azul de Coomasie (0.25% de azul de Coomasie, 50% metanol y 10 % ácido acético) (Biorad, cat. 161-0406) durante 1 hora y se lavaron con un desteñidor (20% metanol y 7% ácido acético) hasta que el fondo del gel fue transparente (Martínez-Velazco, 2004).

VI. 8. Análisis de imágenes y selección de proteínas de interés.

Las imágenes de los geles se obtuvieron por el analizador Fluor S y fueron analizadas con el software PD Quest de acuerdo con los protocolos que provee Bio-Rad (Levy *et al.*, 2004). Esto incluyó la detección automatizada de puntos, además de aquellos que coincidan por medio del alineamiento de geles (Levy *et al.*, 2004). Se procedió a determinar el punto isoeléctrico y el peso molecular de los puntos.

Un vez seleccionadas las proteínas, se cortó cada una con ayuda de un escalpelo (Vierstraet *et al.*, 2004) se colocaron de manera individual en tubos independientes, rotulados previamente, junto con 200 μ L de agua milli Q y se almacenaron a -70° C. Posteriormente se procedió a digerir las proteínas por medio de una solución enzimática que contiene 5ng/ μ L de tripsina en un buffer de digestión (50nM de carbonato de amonio y 5mM de cloruro de calcio). Los péptidos resultantes fueron extraídos con una solución

50mM de carbonato de amonio durante 30 minutos y dos veces en una solución 50% de acetonitrilo y 5% ácido fórmico (Vierstraete *et al.*, 2004).

VI. 7. Secuenciación de proteínas.

La secuenciación por Electrospray acoplado a masas se llevó a cabo en la Facultad de Medicina, Departamento de Bioquímica con el Dr. Guillermo Mendoza Hernández. El proceso de electrospray, comienza en la punta del emisor del aparato, el líquido comienza a salir de la aguja, se carga y asume una forma cónica, o cono de Taylor. El líquido asume esta forma porque cuando se carga, una forma cilíndrica puede contener más carga que una esfera. En la punta del cono, el líquido cambia de forma a una fina línea, esta línea se vuelve inestable y se dispersa en pequeñas gotas. Estas gotas están altamente cargadas (con la misma carga) provocando que se repelan entre ellas y ocupando la mayor superficie posible. En todo este proceso, las partículas (analito) se ionizan, según sea la naturaleza química y el peso molecular de éstas, el número z puede variar entre 2 y 40 o ser aún mayor. Si el analito es una especie química única, el espectro resultante mostrará una serie regular de señales que reflejan los diferentes valores de m/z . Estas diferencias en las cargas serán interpretadas en un espectro de masa resultante en un número de picos igual al número de valores diferentes de z (Erra-Balsells, 2004).

VII.1.2. Perfil antigénico.

Dentro del análisis proteico, se produjeron anticuerpos policlonales en conejo, para conocer aquellas proteínas que sean antigénicas, es decir, que induzcan la producción de anticuerpos y tener una herramienta para caracterizar mejor las proteínas. Después de cuantificar nuestra concentración de proteína, se realizaron 3 inmunizaciones (días 1, 7, 14) con una concentración aproximada de 1mg /ml en cada una. Transcurrida una semana después de la última inmunización, se tomó una pequeña muestra de sangre del conejo y se realizó un western-blot para cerciorarnos de la producción de anticuerpos anti-hemolinfa. En la Figura 8 se observar el reconocimiento de 11 bandas antigénicas, que al ser comparadas con el perfil proteico, se pueden observar 5 bandas proteicas con características antigénicas (45 kDa, 66 kDa, 90 kDa, 115 kDa y una mayor a los 180 kDa). Las bandas proteicas más abundantes en el perfil proteico que indujeron una respuesta antigénica fueron la de 115kDa, 90 kDa y 45 kDa.

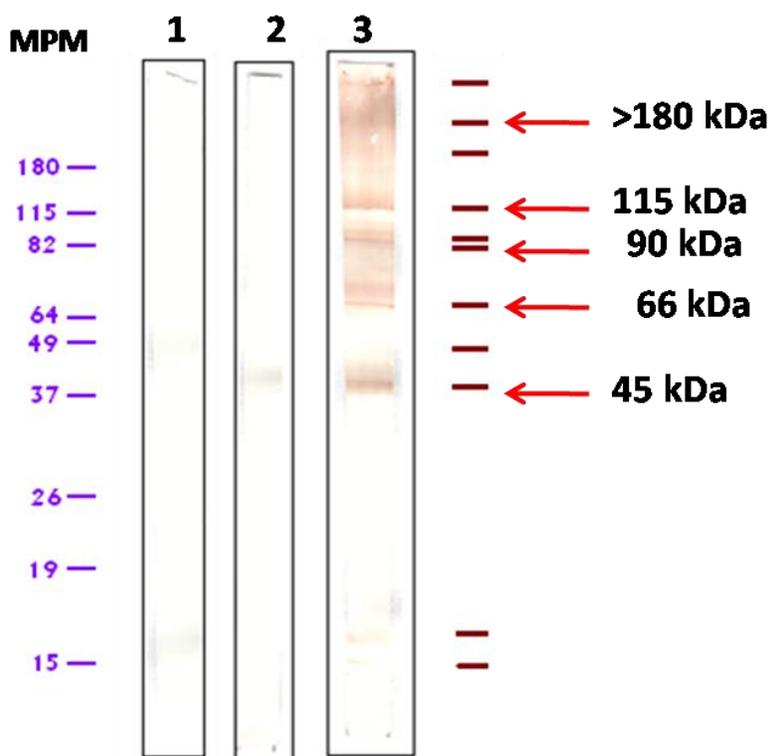


Figura 8. Western-blot de proteínas de hemolinfa de *T. pallidipennis*. Se muestran las bandas antigénicas en orden ascendente: 45 kDa, 66 kDa, 90 kDa, 115 kDa y una mayor a los 180 kDa. Se utilizaron anticuerpos policlonales de conejo anti-hemolinfa. La membrana contiene proteínas de hemolinfa. 1er anticuerpo: carril 1, control negativo; carril 2, 1:5000 de suero preinmune; carril 3, 1: 5000 de suero inmunizado; 2do anticuerpo: 1:2000 de anti-Ig rabbit. PM: pesos moleculares.

VII.1.3. Mapa proteico 2D

Enseguida se procedió a la realización del mapa 2D y los geles se analizaron manualmente así como con ayuda del software PDQuest.

Se obtuvo el mapa 2D de proteínas de hemolinfa de *T. pallidipennis* infectado por *T. cruzi* (fig. 9A), siendo 96 proteínas los que se mantienen constantes. Cada proteína está enumerada en la figura y su peso molecular y punto isoeléctrico en la Tabla 2.

Las proteínas más abundantes en los insectos infectados fueron la serie de 80 kDa (proteínas 1-4), 117.6 kDa (proteína 5), 39.04 kDa (proteína 17), 39.71 kDa (proteína 18), 43.34 kDa (proteína 19), 48 kDa (proteína 20), 78 kDa (proteína 53), 79 kDa (proteína 54), dos de 45 kDa (proteínas 57 y 58), 19.92 kDa (proteína 69), 13.6 kDa (proteína 74), 18.99 kDa (proteína 76), y la serie de 14 kDa (proteínas 81-85) (Tabla 2).

En la tabla 3 se muestran las proteínas que solo aparecen cuando el insecto se encuentra infectado por *T. cruzi*.

La figura 9B, muestra un gel representativo del mapa 2D de proteínas de hemolinfa de *T. pallidipennis* no infectado. Se observa que 47 proteínas se observaron de manera constante a lo largo de los geles analizados (de tres experimentos independientes). Las proteínas más abundantes fueron la de 18.19 kDa (proteína 89), 18.61 kDa (proteína 109), 17.47 kDa (proteína 110), 24.06 kDa (proteína 69), 51 kDa (proteína 19) y la de 51.38 kDa (proteína 20), siendo estas proteínas excelentes candidatos para la secuenciación. También se observa que la zona ácida (pI 3 a 4.5) presenta una cantidad mínima de proteínas (puntos 1, 2, 3 y 4).

Dentro de las proteínas que llamaron nuestra atención, se encuentran aquellas que parecen desaparecer en la condición de infectado (Fig 9A; puntos 97-110; Tabla 4), es decir, la expresión de estas proteínas parece no presentarse cuando el insecto se encuentra infectado por *T. cruzi*.

Tabla 2. Proteínas de hemolinfa de *T. pallidipennis*.

Proteína	PM	pI	Proteína	PM	pI	Proteína	PM	pI	Proteína	PM	pI
1[^]	80.94	3.56	25*	245.4	6.31	49	79.4	6.6	73	14.24	5.89
2[^]	80.09	3.69	26*	245.32	6.49	50	79.64	6.55	74	13.6	6.2
3[^]	80.16	3.86	27*	231.08	6.69	51	78.34	6.73	75	23.7	5.6
4[^]	80.78	4.01	28*	236.37	7.27	52[^]	78.5	6.75	76	21.5	5.56
5	117.6	5.4	29*	204.64	7.03	53[^]	78.47	7.06	77	19.03	5
6*	174.5	5.39	30*	208.45	7.24	54	79.05	7	78	19.1	5
7*	210.32	5.38	31*	236.3	7.24	55	79.9	6	79	21.25	5.68
8*	252.26	5.39	32*	236	7.24	56	73.87	5.87	80	21.23	5.61
9*	278.88	5.38	33*	236	7.16	57[^]	45.3	5.8	81*	14.26	5.68
10*	280.33	5.5	34*	236	7.1	58[^]	45	6.14	82*	14.2	5.58
11*	174.52	5.58	35*	236	6.99	59	70.47	6.31	83*	14.3	5.44
12*	276.19	5.66	36*	236	6.69	60	69.92	6.49	84*	14.19	5.11
13	236.37	5.65	37*	236	6.33	61	69.21	6.69	85*	13.4	5
14	116.92	5.59	38*	236	6.09	62	70.39	6.83	86	14.93	4.95
15	121.97	5.66	39*	302.08	8.95	63	47.28	6.92	87	16.2	4.9
16	83.07	5.65	40*	250.58	9.04	64	47.02	7.15	88	16.3	5.1
17	39.04	5.1	41	83.99	8.71	65	46.9	7.3	89	15.44	5.38
18	39.71	5.27	42	85.41	9	66	51.51	7.82	90	16.47	5.46
19[^]	44.34	5.33	43	84.5	9.2	67	34.2	6.04	91	16.36	5.27
20[^]	48.03	5.4	44	78.85	9.07	68	21.2	6.02	92	17.68	5.37
21*	46.51	5.45	45	79.68	8.79	69	19.92	6.02	93	17.75	5.21
22*	40.66	5.52	46	90	7	70	22.1	6.6	94	16.4	5.6
23*	229.89	5.87	47	88.11	7.03	71	21.43	6.76	95	15.4	5.6
24*	248.37	6.09	48	85.7	6.91	72	17.73	8.34	96	45.8	5.7

* Proteínas que solo se encuentran en los insectos infectados pero fuera del rango de PM en los insectos no infectados.

[^] Proteínas que se sobreexpresan en los insectos infectados.

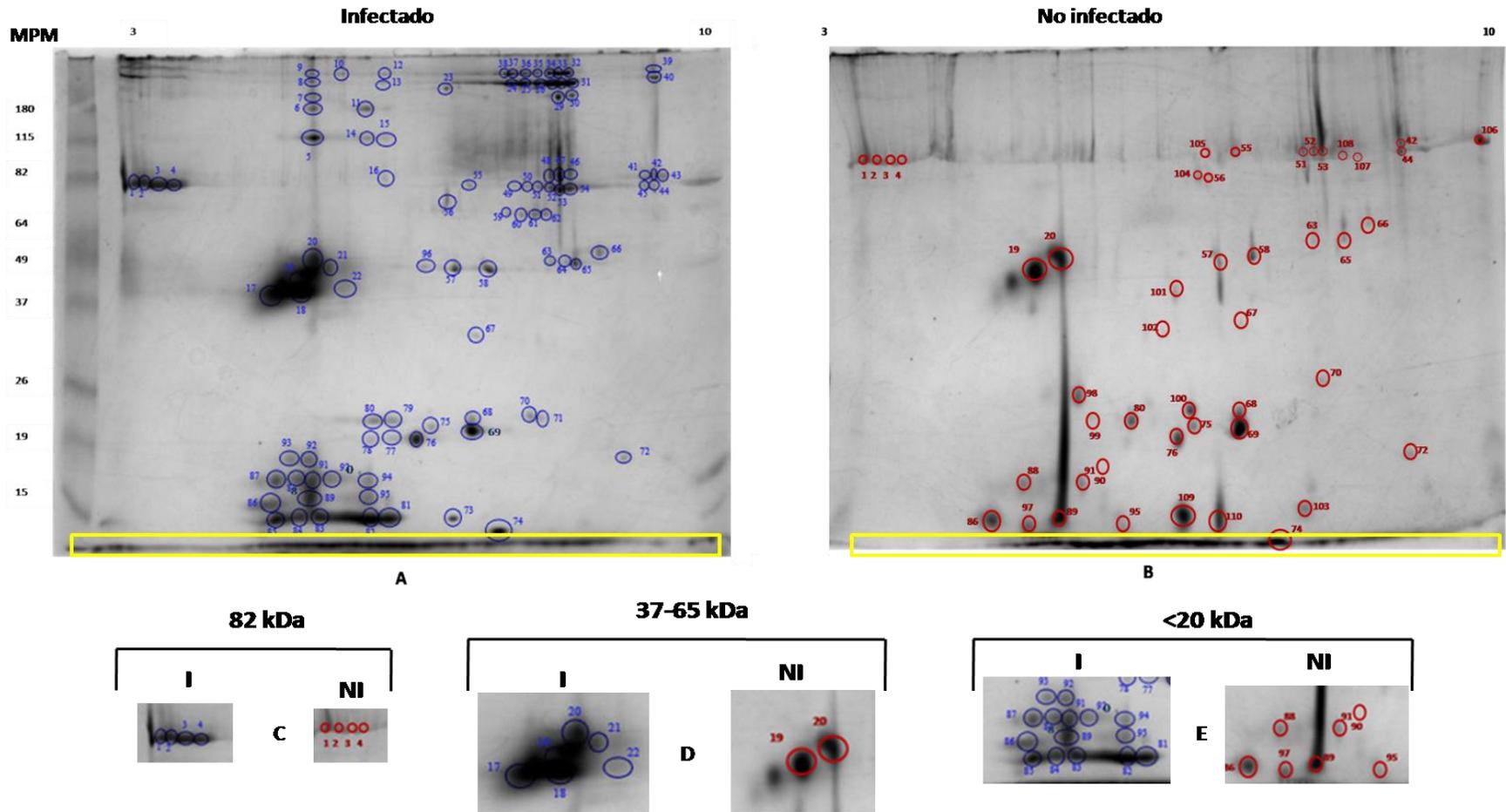


Figura 9. Proteínas de hemolinfa de *T. pallidipennis*. Geles representativos de 3 experimentos independientes. A) Proteínas de hemolinfa de *T. pallidipennis* infectado con *T. cruzi*. B) Proteínas de hemolinfa de *T. pallidipennis* no infectado. C) Zona de 82 kDa y pI entre 3 a 4 en ambos geles. D) Zona entre 37-65 kDa y pI entre 5 a 5.8 en ambos geles. E) Zona menor a los 20 kDa y pI entre 4.9 y 5.6. Recuadros amarillos muestran la zona de bajos pesos moleculares sin definir. En ambos geles I: infectado; NI: no infectado. Concentración de proteína 100 μ g; 12% acrilamida; tinción de Coomassie.

Tabla 3. Proteínas de hemolinfa exclusivas de insectos infectados con *T. cruzi*

Proteína	PM	pI	Proteína	PM	pI
5	117.6	5.4	59	70.47	6.31
13	236.37	5.65	60	69.92	6.49
14	116.92	5.59	61	69.21	6.69
15	121.97	5.66	62	70.39	6.83
16	83.07	5.65	64	47.02	7.15
17	39.04	5.1	71	21.43	6.76
18	39.71	5.27	73	14.24	5.89
41	83.99	8.71	77	19.03	5.69
43	84.5	9.2	78	18.91	5.6
45	79.68	8.79	79	21.25	5.68
46	89.19	7.16	87	16.2	4.9
47	88.11	7.03	92	17.68	5.37
48	85.7	6.91	93	17.75	5.21
49	79.88	6.38	94	16.4	5.6
50	79.64	6.55	96	45.8	5.7
54	79.05	7.22			

Las proteínas que aumentan su abundancia ante la infección: puntos 1 (80.9 kDa), 2 (80 kDa), 3 (80.1 kDa), 4 (80.7 kDa), 19 (43.3 kDa), 20 (46.5 kDa), 52 (78.9 kDa), 53 (78.4 kDa), 57 (45.3 kDa), 58 (45 kDa) (Tabla 2, marcadas con ^).

Tabla 4. Proteínas de hemolinfa exclusivas de los insectos no infectados.

Proteína	PM	pI
97	18.1	5.11
98	27.34	5.11
99	24.9	5.2
101	44.3	5.7
102	35.9	5
103	18.83	6.83
104	72.1	5.9
105	81.92	5.9
106	88.29	9.27
107	54.8	8
108	80	7.7
109	18.6	5.77
110	17.47	5.97

En la Figura 9C se muestra el grupo de las proteínas de 82 kDa que muestra un cambio en la abundancia de las proteínas en los insectos infectados. Esto se ve más claramente en las proteínas de 37-65 kDa (Figura 9D). De igual manera en las proteínas de pesos moleculares menores a los 20 kDa se observa una mayor abundancia en los insectos infectados (Fig. 9E). Los recuadros amarillos en la Figura 9 (infectado y no infectado) denotan un aumento en la cantidad (y sin definición) de proteínas en los pesos moleculares muy bajos.

Haciendo una comparación (tomando los PM) entre las bandas más abundantes del perfil antigénico (Figura 8) y del mapa 2D (Figura 9), podemos observar que la proteína de 14.2 kDa está en la banda de 14.5 kDa, las proteínas de 16.2 y 16.4 kDa están contenidas en la banda de 15 kDa, las proteínas de 45, 45.3 y 45.8 kDa en la banda de 45 kDa, la proteína de 89.2 kDa en la banda de 90 kDa y la proteína de 116 kDa en la banda de 115 kDa.

VII.2. Caracterización de proteínas de hemolinfa de *T. pallidipennis* con bajo peso molecular.

Para poder observar las proteínas por debajo del rango de peso molecular utilizado en la mayoría de los geles obtenidos con 12% de acrilamida, se optó por aumentar la concentración a 15%, esperando una mejor definición de dichos grupos de proteínas.

En la figura 10, se muestran las proteínas con bajos pesos moleculares de los insectos. En los insectos no infectados, se observaron 14 proteínas que se mantuvieron constantes (Fig. 10B) (tabla 5), aunque todos ellos parecen estar alrededor de los 14 kDa.

En la figura 10C se muestra un grupo de 3 proteínas de 9 kDa que se observaron tanto en insectos infectados como en los no infectados.

Se observa también la presencia de proteínas por debajo de los 6 kDa (15 proteínas) en los insectos infectados (Figura 10D), sin lograr una definición de proteínas en los insectos no infectados.

Tabla 5. Proteínas de bajo peso molecular de hemolinfa de *T. pallidipennis* en la condición de no infectado.

Punto	PM	pI
1	14.9	4.9
2	14.8	4.9
3	14.75	5.19
4	14.85	5.19
5	14.8	5.19
6	14.9	5.5
7	14.7	5.47
8	14.7	5.5
9	14.69	5.6
10	14.67	5.7
11	14.68	5
12	13.56	6.32
13	14.82	6.5
14	14.67	6.7

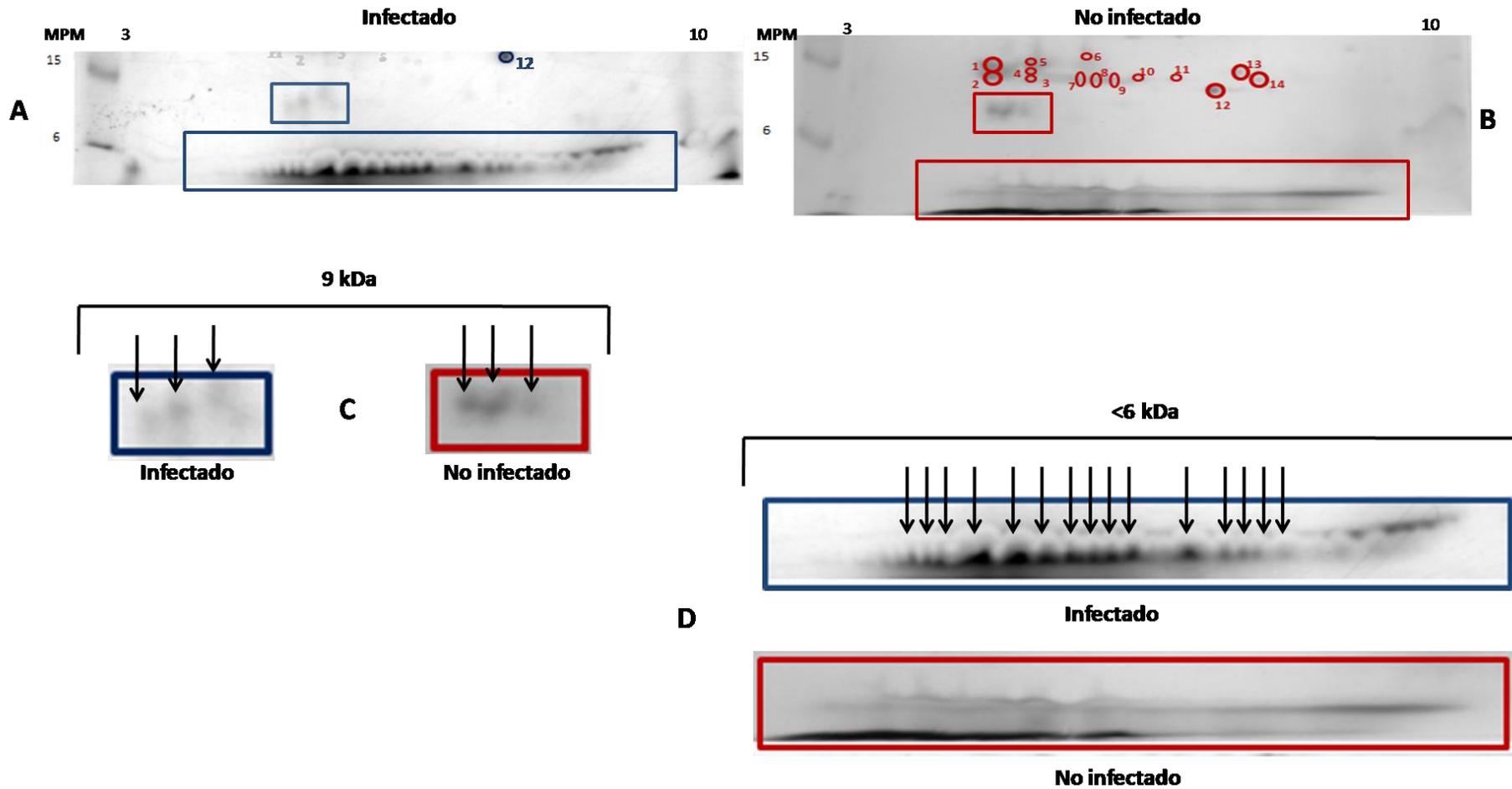


Figura 10. Proteínas de hemolinfa de *T. pallidipennis* de bajo peso molecular. A) Proteínas de hemolinfa <math>< 15 \text{ kDa}</math> de *T. pallidipennis* infectado con *T. cruzi*. B) Proteínas de hemolinfa <math>< 15 \text{ kDa}</math> de *T. pallidipennis* no infectado. C) Proteínas de 9 kDa de *T. pallidipennis*. D) Proteínas <math>< 6 \text{ kDa}</math> de *T. pallidipennis*. Concentración de proteína 100 μg ; 15% acrilamida; tinción azul de Coomassie.

VII.3. Secuenciación por electrospray acoplado a masas.

Después del análisis de las proteínas que se mantuvieron de manera constante en los insectos, 69 proteínas fueron seleccionadas para la secuenciación por electrospray acoplado a masas. Al comparar las secuencias de aminoácidos resultantes con las bases de datos actualizadas, no se encontró ninguna coincidencia con proteínas de otros artrópodos.

VIII. DISCUSIÓN

La mayoría de los estudios realizados en torno a la enfermedad de Chagas se han enfocado en tratar de dilucidar el fenómeno de la infección y control desde la perspectiva del parásito y sin tomar en cuenta la gran importancia del papel del vector en la transmisión y la enorme repercusión que tendría establecer la respuesta sistémica del insecto ante la infección con *T. cruzi* y más aún, localizar los mecanismos y moléculas de defensa como posibles controles a nivel vectorial e inclusive como tratamientos en la enfermedad. En países sudamericanos, el control de los vectores se basa en la eliminación de la chinche por medio de insecticidas y algunos autores han propuesto la utilización de insecticidas en nuestro país para la disminución del vector (Rojas-Wastavino *et al.*, 2004), sin embargo, otras alternativas han sido propuestas, como el control biológico mediante la manipulación del simbiote *Rhodococcus rhodnii* (Beard *et al.*, 1992) o la identificación de proteínas que actúen directamente sobre el parásito, siendo innecesaria la eliminación del vector, sino potencializando la respuesta inmune del insecto.

La hemolinfa de *Rhodnius prolixus* contiene 2 principales proteínas, las de almacenaje (SP) y las lipoforinas (LP) en todos los estadios y en ambos sexos, y la vitelogenina (Vg) como principal proteína precursora en la formación del huevo, es decir participan el desarrollo, metamorfosis y reproducción (Chinzei *et al.*, 1993). En la mayoría de los insectos dichas proteínas son sintetizadas en el cuerpo graso y transportadas a la hemolinfa, llevando a cabo la función de movilización de lípidos y nutrientes através de los tejidos, lo que nos habla de un constante movimiento de estas proteínas en el sistema circulatorio del insecto (Grillo *et al.*, 2003; Tufail & Takeda, 2012). Por sus repercusiones en diversos procesos fisiológicos, las podemos encontrar en todos los estadios ninfales (formación de cutícula y ecdisis) (Kanost, 1990). En adultos también están presentes y se cree su función recae en el almacenamiento de nutrientes durante los largos periodos de inanición. Lo que nos llevaría a pensar en la regulación de su expresión dependiendo del estado fisiológico del insecto. Las SP son proteínas hexaméricas de 500 kDa aproximadamente es su estado nativo, pero compuesta por subunidades de entre 70 y 80 kDa (Tufail & Takeda, 2012). La proteína que presentó la mayor abundancia en este trabajo (66 kDa) podría referirse a una SP, tanto por el peso como la abundancia presentadas, y tomando en cuenta trabajos posteriores realizados en el mismo laboratorio de

Tripanosomiasis Americana, donde dicha proteína se mantiene constante durante el 5to estadio ninfal, y no presentaba cambios en la expresión, como se ha documentado en la literatura para estas proteínas (Espinosa De Aquino, 2010). Un tipo de SP encontradas en *Calliphora erythrocephala* (Díptera), llamadas arilforinas, también coinciden con el peso de las subunidades, y manteniendo una función de almacenamiento podríamos pensar que se conservan en varias especies de insectos (Tufail & Takeda, 2012). Las LP están formadas por dos subunidades (apoLps) de 240 y 75 kDa aproximadamente. En el trabajo de Espinosa De Aquino (2010) utilizando geles de tricina, pudo separar dos de 75 y 72 kDa, ambas con expresión mayor al resto de las proteínas, tomando en cuenta que estos geles permiten separar las proteínas hidrofóbicas, y tanto las SP y LP están asociadas a la movilización de lípidos, es posible que estas bandas, tanto en este trabajo como en el de Espinoza, pertenezcan a una SP o LP.

La banda de 66 kDa también se mantiene constante en diferentes especies de triatóminos. Cavanoso y Rubiolo (1993), al realizar un perfil hemolinfático de diversos vectores de *T. cruzi*, encontraron que esta abundante banda se mantiene en todas las especies estudiadas, tanto en 5to estadio ninfal como en adultos, reforzando la importancia y funcionalidad de esta proteína (o subunidades de proteína).

Otros dos aspectos a destacar son que al comparar las bandas encontradas en el perfil proteico de un adulto es mayor que en el 5to estadio ninfal, es que al menos se mantienen constantes 5 grupos de proteínas, a los 90 kDa, a los 60-66 kDa, a los 45 kDa, a los 40 kDa y a los 26 kDa, haciéndonos suponer que estas proteínas están relacionadas con procesos fisiológicos básicos, como el metabolismo. El segundo aspecto a considerar es la diferencia en el número de bandas dependiendo del estadio. Mientras que en este trabajo encontramos un aproximado de 23 bandas (con 20 µg de proteína) y en el trabajo realizado con individuos del 5to estadio ninfal se encuentra un aproximado de 14 bandas, siendo la región menor a los 37 kDa la que presenta menor número de bandas. Esto ya había sido reportado en la literatura para otros triatóminos, Cavanoso y Rubiolo (1993) encontraron que el número de bandas cambia dependiendo del estadio, encontrando un aproximado de 13-18 bandas para el 5to estadio ninfal y 14-20 bandas en los adultos. Esto nos podría hablar de las diferencias que existen en las proteínas durante el desarrollo y que aunque se

piense que debería existir una mayor síntesis de proteínas en un estadio ninfal (por los requerimientos de nutrientes), se podría deber a procesos de regulación en la expresión.

En cuanto a las proteínas con características antigénicas, pudimos observar que algunas de las bandas más intensas presentes en el gel SDS-PAGE fueron las que condujeron a la producción de anticuerpos, siendo las de pesos arriba de los 37 kDa las más antigénicas y las de bajos pesos moleculares parecen no tener dicha actividad. También pudimos observar que poseen característica antigénica las dos bandas en los 82 kDa, que con anterioridad mencionamos pudieran ser subunidades de alguna SP. Estas bandas fueron corroboradas posteriormente en el laboratorio, presentando similitud con 4 bandas proteicas de 64 kDa, 45 kDa, 110 kDa y 73 kD ante la inmunización de conejos con hemolinfa de 5to estadio ninfal (Espinosa De Aquino, 2010) demostrando que a pesar de la diferencia en el desarrollo, ambos estadios comparten proteínas constitutivas antigénicas.

El objetivo principal de este trabajo fue encontrar las proteínas que se expresaran de manera constitutiva, ya que hasta el momento, no existe ningún reporte del perfil proteico de hemolinfa de *T. pallidipennis* por medio de 2D, y esto nos permitió realizar la comparación con el perfil proteico del insecto infectado.

Se analizaron 47 proteínas que se mantienen constantes a lo largo de los geles analizados (de tres experimentos independientes) de los insectos no infectados. Las proteínas más abundantes fueron la de 18.19 kDa (punto 89), 18.61 kDa (punto 109), 17.47 kDa (punto 110), 24.06 kDa (punto 69), 51 kDa (punto 19) y la de 51.38 kDa (punto 20), siendo estas proteínas excelentes candidatos para la secuenciación. También se observa que la zona ácida (pI 3 a 4.5) presenta una cantidad mínima de proteínas (proteínas de 80 kDa), que parece ser algo común en estudios similares realizados en otros insectos.

Ante la imposibilidad de obtener resultados por la secuenciación por electrospray acoplado a masas y la poca información del genoma de *T. pallidipennis* solo se discutirán posibles analogías basados en pesos moleculares y puntos isoeléctricos reportados para otros insectos.

La proteína 19 (44.3 kDa) se presenta tanto en los insectos infectados como en los no infectados, notándose un visible aumento en la abundancia en los insectos infectados. Buscando en la literatura, encontramos que esta proteína tiene peso molecular y punto isoeléctrico muy cercano a la Serpina 2 (Srpn 2; inhibidor de serinas proteasas) de

Anopheles gambiae que se presenta de manera constitutiva. Algunas serinas proteasas poseen un dominio que funciona como activador de la cascada de la profenoloxidasas (PPO), importante en la melanización de patógenos y parásitos, y en la señalización asociada a la respuesta inmune (Paskewitz & Shi, 2005). Este grupo contiene enzimas que directamente activan PPO así como a un grupo de homólogos de serinas proteasas (SPH) que son críticos en la formación del complejo PPO en otros insectos (Kanost *et al.*, 2004). No podemos asegurar que sea la misma proteína; sin embargo, al ser una proteína presente en varias especies de insectos y participe de un proceso fisiológico que se mantiene a lo largo de todo el grupo, es de esperarse que se presente también en *T. pallidipennis* y de ser así, la diferencia en la abundancia podría tener repercusiones en la respuesta inmune del vector.

La proteína de 23.7 kDa muestra coincidencia con la glutatión S transferasa (GST-SI-I). Pertenecen a un grupo de enzimas detoxificantes que catalizan la reducción del glutatión (GSH) con sustratos electrofílicos. Se ha identificado estas enzimas en lepidópteros como *Galleria mellonella*, *Wiseana cervanata*, *Plutella xylostella* (Yu, 1996). Una de las razones por las que se le ha dado gran importancia a estas moléculas es la relación que pueden tener con la resistencia a insecticidas y desde luego, las repercusiones adaptativas para las especies que las presentan.

Algunas proteínas solo se presentaron en los insectos no infectados, los puntos 97 al 110. Dentro de estas proteínas, la proteína de 24.9 kDa tiene similitudes con dos proteínas de *A. gambiae*, la cadena ligera de la Ferritina y la cadena pesada de la Ferritina. Estas proteínas están involucradas en el secuestro y transporte de hierro. Proteínas homólogas se presentan en la hemolinfa del mosquito de la fiebre amarilla *Aedes aegypti* (Dunkov *et al.*, 1995). La regulación de estas proteínas ante la exposición a un agente infeccioso fue reportado en *D. melanogaster* (Vierstraete *et al.*, 2004) abriendo la posibilidad que este mecanismo de regulación se presente en *T. pallidipennis*. Otra proteína que no se expresa en el infectado, es la número 102 (36 kDa), que parece tener similitud con una proteína salival de *A. gambiae* (D7H1). Esta proteína pertenece a la superfamilia que contiene a las proteínas de unión a feromonas y moléculas odoríferas. Anofelina y culicina son dos proteínas salivales ampliamente referidas como de la familia D7, así como la hamadarina que funciona como un agente anticoagulante y antiinflamatorio (Isawa *et al.*, 2002). Esta

proteína de 36 kDa es similar a la banda de alrededor de los 37 kDa del perfil proteico, que además de ser de las más abundantes, resulta ser antigénica, al activar la producción de anticuerpos en conejo.

En el mapa 2D de proteínas de hemolinfa de *T. pallidipennis* infectado por *T. cruzi* 96 proteínas se mantienen constantes. La proteína de 46.5 kDa comparte similitud en PM y punto isoeléctrico (pI) con otra serpina (Srpn15) de *A. gambiae*. Esta serpina es regulada después de la infección bacteriana y ante la presencia del parásito causante de la malaria (Kafatos, 2002). Esta proteína que suponemos pueden ser serpina, se encuentra en un grupo muy abundante de nuestros geles (Fig. 9D), abriendo la posibilidad que existan otras proteínas de esta familia en *T. pallidipennis*.

Las dos proteínas de 78.3 y 78.5 kDa son similares a un subunidad de la PPO2. La PPO está implicada en reacciones de defensa, como la cicatrización de heridas y la melanización. En Lepidoptera, las profenoloxidasas se cree son liberadas desde un tipo de hemocito, los oenocitoides, ante la ruptura de la célula (Kawabata *et al.*, 1995).

La proteína de 45.3 kDa (en insectos infectados y no infectados) muestra coincidencia con CLIPA6 (homólogo de serina proteasa) (Paskewitz & Shi, 2005).

La proteína de 34 kDa (también presente en ambos grupos) coincide con una aldo/keto reductasa de *A. gambiae*.

La proteína de 13.4 kDa comparte similitud con una proteína de unión a moléculas odoríferas (OBP9). Esta proteína también pertenece la superfamilia que contiene a las proteínas de unión a feromonas y moléculas odoríferas (como la D7H1 descrita con anterioridad). OBP9 se cree transporta moléculas de olor desde las aperturas interiores de los poros a las proteínas receptoras (ORs) localizadas en las membranas de las neuronas olfativas (Wojasek & Leal, 1999). Proteínas con similitudes en la unión de moléculas odoríferas han sido reportadas en la hemolinfa de *Ceratitis capitata* y *Tenebrio molitor* (Coleóptera) (Christophides *et al.*, 2000). Algunas OBP aumentan su presencia en la hemolinfa durante la respuesta inmune en *D. melanogaster* (Levy *et al.*, 2004) mientras que en otros puede que estén involucradas en la unión y transporte del grupo hemo (Oliveira *et al.*, 1995).

La proteína de 90 kDa muestra coincidencia con una quitinasa de *A. gambiae*. Las quitinasas ha sido reportadas en especies de diferentes ordenes, Lepidoptera, Diptera,

Coleoptera, Hemipter, etc., presentando funciones muy variadas que van desde la digestión, muda, respuesta inmune y patogeneicidad (Arakane & Muthukrishnan, 2010).

Las proteínas de 79 kDa parecen tener similitud con fenoloxidasa (PO6). En *D. melanogaster*, todo el sistema de activación durante las infecciones sépticas ha sido reportada que depende de la activación cascada proteolítica y el rompimiento de la serpina 27^a (Spn27A). Ambos eventos inducidos por el reconocimiento de productos microbianos a través de los receptores de reconocimiento de patrones llevando a la transcripción de genes incluyendo los que regulan la activación de la ProPO. Sin embargo, aún en la actualidad la importancia de estas moléculas en la respuesta inmune es controversial. PO está involucrada en la coagulación en insectos. Se ha identificado en *Galleria mellonella*, *A. gambiae*, *D. melanogaster*, donde ha mostrado contribuye a la formación del coágulo (Bidla *et al.*, 2009).

Las proteínas de 19 kDa coinciden con una apolipoproteína (apoLP-III). En algunos insectos, funciona estabilizando lipoproteínas de baja densidad (LDLp) facilitando el transporte de partículas cargadas a través del hemocele a diversos tejidos. ApoLp-III puede tener otros roles fisiológicos relacionados con la inmunidad (Niere *et al.*, 2001). Es posible que juegue un papel en el reconocimiento de partículas de superficie bacterianas y fungales (Whitten *et al.*, 2004) y promueva la activación de hemocitos (Dettloff *et al.*, 2004), encapsulación celular (Whitten *et al.*, 2004), y la activación de PPO (Mullen & Goldsworthy, 2003). Estas proteínas en *T. pallidipennis* son proteínas ácidas (pH 5) que coinciden con el 20-25% a las apoLP-III de otros insectos (Paskewitz & Shi, 2005).

Las proteínas que aumentan su abundancia ante la infección fueron: la de 80.9 kDa, 80 kDa, 80.1 kDa, 80.7 kDa, 43.3 kDa, 46.5 kDa, 78.9 kDa, 78.4 kDa, 45.3 kDa, 45 kDa y 19 kDa.

En el caso de la proteína de 21.5 kDa muestra similitud con una adenilcinasa. Estas proteínas aumentan su expresión ante las heridas, como en *A. gambiae*, en donde se cree que el incremento de enzimas metabólicas se debe a la necrosis del tejido circundante a la herida. En invertebrados, la necrosis o apoptosis seguida a una herida resulta en la liberación de considerables cantidades de proteínas citoplasmáticas en el sistema circulatorio. La adenilcinasa es una proteína citosólica que antes se conocía como

miocinasa, porque es encontrada en altas concentraciones en el músculo (Paskewitz & Shi, 2005).

Cabe mencionar que dentro del patrón de proteínas entre los geles analizados, se mostraban dos grupos de proteínas en la zona básica de alto peso molecular, el primer grupo, tenía un peso molecular de aproximadamente 77.7 (+/- 7) kDa y su pI iba desde 5.84 a 9. El segundo grupo, tenía un peso molecular de aproximadamente 65.03 (+/- 0.084) kDa y puntos isoeléctricos desde 5.83 a 7.41. Dichos grupos presentaban una formación que llamaba la atención y revisando la literatura, los grupos que presentan esta característica, con pesos moleculares iguales y en un rango de puntos isoeléctricos variados, han sido caracterizados como familias de proteínas o isoformas de una sola proteína.

Hasta el momento no sabemos si estas proteínas están relacionadas con la respuesta sistémica del vector, pero esperamos que tengan algún papel crucial cuando el triatómino está infectado, como ha pasado en otros insectos como *D. melanogaster* y *A. gambiae* que ante una infección microbiana expresa proteasas, inhibidores de proteasas y enzimas con actividad parecida a la profenoloxidasa (Levy *et al.*, 2004; Paskewitz & Shi, 2005).

Consultando la literatura, notamos que los elementos más importantes de la respuesta inmune innata en insectos está representada por los péptidos antimicrobianos, éstos pueden expresarse durante una infección de una manera sistémica (es decir, en la hemolinfa) aunque la infección sea en otro tejido, además estos péptidos poseen pesos moleculares muy pequeños (entre 4.5 y 6 kDa). En los geles analizados de ambas condiciones se observaron proteínas sin definir en el rango menor a 20 kDa, por lo que se precedió a aumentar la concentración de acrilamida a un 15%, intentando definir y separar mejor las proteínas contenidas en esta zona. Dentro de las proteínas menores a 15 kDa, en la hemolinfa de insectos no infectados, se observaron 14 proteínas que se mantuvieron constantes, todas alrededor de los 14 kDa.

Por medio de la secuenciación sabríamos de qué proteínas se tratan e inferir porque éstas no se presentan o cambian su expresión cuando el insecto está infectado con *T. cruzi*; sin embargo, se podría suponer que hay un proceso de regulación relacionada con la infección. La presencia de proteínas de menores pesos moleculares (<6 kDa), y de mayor concentración en los insectos infectados abre la posibilidad a posteriores estudios que nos permitan una mejor definición y la consiguiente caracterización de éstas.

Trabajos posteriores en el laboratorio nos dan la evidencia de este grupo de proteínas de bajo peso molecular en *T. pallidipennis*. En el trabajo de Espinosa De Aquino (2012) se encontró la presencia de dos lisozimas y tres defensinas en diferentes tejidos de *T. pallidipennis*, como primer reporte de AMPs en triatóminos mexicanos, y aunque este trabajo se centró en medir la expresión de genes, los AMPs probablemente se encuentran circulantes en la hemolinfa sin importar el sitio de síntesis.

La prolixina y las defensinas encontradas en *Rhodnius prolixus* (11 kDa y ~4kDa respectivamente) y las tanatinas de otros hemípteros (~2 kDa) son AMPs que también podríamos encontrar en este grupo de proteínas de bajo peso molecular. En el trabajo de Díaz-Garrido (2013) con el uso de geles de tricina, se reportó la presencia de un péptido de 2 kDa que es candidato a ser una tanatina, así como una posible diptericina, por peso molecular y residuos de azúcares presentes. En este mismo trabajo, la presencia de un péptido de ~15 kDa que ante el ensayo de reconocimiento de residuos de azúcares y de actividad de lisozima, se pudo corroborar que se trata de una lisozina tipo “c”. Todas estas evidencias en *T. pallidipennis* no ayudan a inferir la presencia de AMPs en nuestro trabajo; sin embargo, una posterior secuenciación de estas proteínas nos ayudaría a saber cuáles proteínas son las que se presentan en los adultos de este vector.

En resumen, se ha reportado en otros vectores la presencia de algunas proteínas constitutivas que pueden tener una función en la inmunidad. Estas incluyen la subunidad PPO2, dos dominios de anclaje de serinas proteasas (CLIP B4 y A6), una proteína thioéster (TEP15), dos serpinas (SRPN2 y SRPN15), una cistatina y apolipoforina III (apoLPIII) (Paskewitz & Shi, 2005) que probablemente también están presentes en la hemolinfa de *T. pallidipennis*. Además la importancia de los péptidos involucrados en la respuesta sistémica a parásitos tiene un papel evolutivo en una gran cantidad de especies y que a diferencia de los antibióticos convencionales como la penicilina, por la que se desarrolla rápidamente una resistencia, en las cepas sensibles a los AMP es muy poco probable que se desarrolle dicha resistencia, dando un mayor impacto en la industria farmacéutica en contra de las enfermedades bacterianas. La diversidad de estos péptidos en los diferentes reinos y por lo tanto la misma secuencia de un péptido es difícilmente reportada en dos especies de animales, incluso en aquellos que están relacionados (Zasloff, 2002), sea por este motivo

que la comparación de secuencias en la técnica del electrospray no diera resultados satisfactorios.

La mayoría de los proyectos de proteómica han sido llevados a cabo en organismos cuyos genomas están secuenciados y disponibles en las bases de datos; contrariamente, el éxito de la identificación de proteínas en organismos sin secuencia de genoma recae en las distancias filogenéticas entre éstos y los disponibles en bases de datos, así como el tipo y la calidad de la espectrometría usada; sin embargo, los avances tecnológicos en la biología proveen la posibilidad de rápidamente generar información de secuencias de novo a larga escala ampliando las posibilidades para futuras identificaciones (Castellanos-Martínez *et al*, 2011).

IX. CONCLUSIONES

- 47 proteínas se mantienen constantes en los insectos no infectados de *T. pallidipennis* macho adulto.
- 96 proteínas se mantienen constantes en los insectos *T. pallidipennis* macho adulto infectados con *T. cruzi*.
- 31 proteínas se presentan sólo en los insectos infectados con *T. cruzi*.
- 11 proteínas se sobreexpresan en los insectos infectados con *T. cruzi*.

X. PERSPECTIVAS

- Usar geles de tricina para definir la zona de bajos pesos moleculares.
- Realizar secuenciación por espectrometría de masas para encontrar similitudes con proteínas ya secuenciadas en otros insectos.
- Realizar geles para identificar serinas proteasas.
- Utilizar anticuerpos disponibles para identificar la presencia de serpinas y proteínas que participan en la cascada de la fenol oxidasa.

XI. BIBLIOGRAFÍA

1. Álvarez VE, Niemirowicz GT & Cazzulo JJ. 2012. The peptidases of *Trypanosoma cruzi*: Digestive enzymes, virulence factors, and mediators of autophagy and programmed cell death. *Biochimica et Biophysica Acta -Proteins and Proteomics*, 1824: 195-206.
2. Añez N, Cristante G, Romero M. 2009. Supervivencia e infectividad de formas metacíclicas de *Trypanosoma cruzi* en alimentos experimentalmente contaminados. *Bol Mal Salud Amb*, 49: 91-96.
3. Arakane Y & Muthukrishnan S. 2010. Insect chitinase and chitinase-like proteins. *Cellular and molecular life sciences*, 67: 201-216.
4. Atias A. 2006. *Parasitología Médica*. Ed. Med. 4ª ed. México. 615 pp.
5. Azambuja P, Guimarães JA, Garcia ES. 1983. Haemolytic factor from the crop of *Rhodnius prolixus*: evidence and characterization. *Journal of Insect Physiology*, 29: 833-839.
6. Beard CB, Mason PW, Aksoy S, Tesh RB, Richards FF. 1992. Transformation of an insect symbiont and expression of a foreign gene in the Chagas' disease vector *Rhodnius prolixus*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 46: 195-200.
7. Beaty BJ & Marquardt WC. 2003. *The biology of Disease Vectors*. University Press of Colorado, EUA. 632 pp.
8. Bidla G, Hauling T, Dushay MS. 2009. Activation of insect phenoloxidase after injury: endogenous versus foreign elicitors. *Journal of Innate Immunology*, 1: 301-308.
9. Bosseno MF, Ordoñez R, Kasten FL, Espinoza B, Flores A, Gastélum EM & Brenière SF. 2001. Isoenzyme variability of five principal triatomine vector species of Chagas disease in Mexico. *Infection, Genetics and Evolution*, 1: 21-28.
10. Bradford MM. 1976. Bradford assay. *Analysis Biochemistry*, 72: 245-248.
11. Brisse S, Barnabé C, & Tibayrenc M. 2000. Identification of six *Trypanosoma cruzi* phylogenetic lineages by random amplified polymorphic DNA and multilocus enzyme electrophoresis. *International Journal for Parasitology*, 30: 35-44.
12. Calvo-Mendez M, Noguera B, Alejandr  R. 1992. La vía oral: una puerta de acceso para *Trypanosoma cruzi*. *Revista Latinoamericana de Microbiologia*, 34: 39-42.
13. Canavoso LE, Rubiolo ER. 1993. Hemolymphatic components in vectors of *Trypanosoma cruzi*: study in several species of the subfamily Triatominae (Hemiptera: Reduviidae). *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 35: 123-128.
14. Carcavallo RU, Jurberg J, Lent H, Noireau FF, Galvao C. 2010. Phylogeny of the Triatominae (Hemiptera: Reduviidae). *Edit. Gama Philo Proposals for Taxonomic Arragements*. 1:80-86.
15. Carcavallo RU, Rabinovich JE & Tonn RJ. 1985. Factores biológicos y ecológicos en la Enfermedad de Chagas. Tomo I, Centro Panamericano de Ecología y Salud. Organización Panamericana de la Salud. Argentina.
16. Carrada-Bravo T. 2004. *Trypanosoma cruzi*: Historia natural y diagnóstico de la enfermedad de Chagas. *Revista Mexicana de Patología Clínica*, 51: 205-219.
17. Castellanos-Martinez S & Gestal C. 2011. Immune response of *Octopus vulgaris* against the infection by the gastrointestinal parasite *Aggregata octopiana*. *Journal of Shellfish Research*, 30: 997-998.

18. Chen R, Ma M, Hui L, Zhang J & Li L. 2009. Measurements of neuropeptides in crustacean hemolymph via MALDI mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 20: 708-718.
19. 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.
20. Christophides GK, Mintzas AC, Komitopoulou K. 2000. Organization, evolution and expression of a multigene family encoding putative members of the odourant binding protein family in the medfly *Ceratitis capitata*. *Insect Molecular Biology*, 9: 185-195.
21. Coura JR, Borges-Pereira J. 2010. Chagas disease: 100 years after its discovery. A systemic review. *Acta Tropica*, 115: 5-13.
22. De Moraes Guedes S, Vitorino R, Tomer K, Domingues R, Ferrer Correia AJ, Amado F, Domingues P. 2003. *Drosophila melanogaster* larval hemolymph protein mapping. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 312:545-554.
23. De Souza W. 2002. Basic cell biology of *Trypanosoma cruzi*. *Current pharmaceutical design*, 8: 269-285.
24. Dettloff M, Wittwer D, Weise C, Weise A. 2001. Lipophorin of lower density is formed during immune responses in the lepidopteran insect *Galleria mellonella*. *Cell and Tissue Research*, 306: 449-458.
25. Dias JCP. 1992. Epidemiology of Chagas disease. En: Wendel S, Brener Z, Camargo ME, Rassi A (ed.), *Chagas Disease (American Trypanosomiasis): its impact on transfusion and clinical medicine*. ISTB Brazil'92. Sao Paulo. 250 pp.
26. Díaz Garrido EP. 2013. Tesis de Licenciatura. Caracterización de péptidos <20 kDa presentes en la hemolinfa de *Triatoma pallidipennis*. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México.
27. Dujardin JP, Schofield J, Panzera F, Matias A, & De La Riva J. 2002. Los vectores de la enfermedad de Chagas. *Academie Royale des Sciences d'Outre-Mer*. Bélgica. 500pp.
28. Dunkov BC, Zhang D, Choumarov K, Winzerling JJ & Law JH. 1995. Isolation and characterization of mosquito ferritin and cloning of a cDNA that encodes one subunit. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 29: 293-307.
29. Erra-Balsells R. 2004. Del vuelo de las proteínas y de cómo lograrlo: Espectrometría de masa ESI. *Química Viva*, 3:96-121.
30. Espinosa De Aquino W. 2010. Tesis de Licenciatura. Perfil proteico de la hemolinfa de *Triatoma pallidipennis* infectado con *T. cruzi*. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México.
31. Espinosa De Aquino W. 2012. Tesis de Maestría. Estudio de las moléculas de sistema immune de *Triatoma pallidipennis* infectado con *T. cruzi*. Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México.
32. Garcia ES & Azambuja P 1991. Development and interactions of *Trypanosoma cruzi* within the insect vector. *Parasitology Today*, 8: 240-244.
33. Garcia ES, Gonzalez MS, Azambuja P. 1999. Biological factors involving *Trypanosoma cruzi* life cycle in the invertebrate vector, *Rhodnius prolixus*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 94: 213-216.
34. Gómez-Marín, JE. 2010. *Protozoología Médica, protozoos parásitos en el contexto latinoamericano*. Ed. El Manual. 1er ed. Bogotá, Colombia. 288 pp.

35. Gondim KC, Pennington JE, Mendes-Fernandes JR, Alves-Bezerra M, Wells MA. 2013. Effects of starvation in lipophorine density in fifth instar larval *Manduca sexta*. Archives of Insect Biochemistry and Physiology, 84: 145–156.
36. Gorman MJ & Paskewitz SM. 2001. Serine protease as mediators of mosquito immune responses. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 31:257-262.
37. Graca-Souza AV, Maya-Monteiro C, Paiva-Silva GO, Braz GRC, Paes MC, Sorgine M, Oliveira MF & Oliveira PL. 2006. Adaptations against heme toxicity in blood-feeding arthropods. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 36: 322-335.
38. Grillo LAM, Pontess KC & Gondim J. 2003. Lipophorin interaction with midgut of *Rhodnius prolixus*: characterization and changes in binding capacity. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 33: 429-438.
39. 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.
40. Haunerland HN. 1996. Insect storage proteins: Gene families and receptors. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 26: 755-765.
41. Hoare CA, Wallace FG. 1966. Developmental stages of trypanosomatid flagellates: A new terminology. Nature, 212: 1385-1386.
42. Hoffmann JA. 2003. The immune response of *Drosophila melanogaster*. Nature, 426: 33-38.
43. Hypsa V, Zrzavý J, Rego ROM, Galvao C, Jurberg J. 2001. 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.
44. Isawa H, Yuda M, Orito Y, Chinzei Y. 2002. A mosquito salivary protein inhibits activation of the plasma contact system by binding to factor XII and high molecular weight kininogen. Journal of Biological Chemistry, 277: 27651-27658.
45. Isola ELD, Lammel EM, Gonzalez Cappa SM. 1986. *Trypanosoma cruzi*: Differentiation after interaction of epimastigotes and *Triatoma infestans* intestinal homogenate. Experimental Parasitology, 62: 329-335.
46. 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.
47. Kafatos FC. 2002. Man “bytes” mosquitos. EMBL Research Reports, 2002:184-189.
48. Kanost MR, Jiang H, Wang Y, Ma CC, Zhu Y. 2001. Hemolymph proteinases in immune responses of *Manduca sexta*. Phylogenetic Perspectives on the Vertebrate Immune System, 484: 319-329.
49. Kanost MR, Jiang H, Yu XQ. 2004. Innate immune responses of a lepidopteran insect *Manduca sexta*. Immunology Review, 198: 97-105.
50. Kanost MR, Kawooya JK, Law JH, Ryan RO, Heusden MCV & Ziegler R. 1990. Insect hemolymph proteins. Advances in Insect Physiology, 22: 299-396.
51. Kawabata T, Yashuhara Y, Ochiai M, Matsuura S, Ashida M. 1995. Molecular cloning of insect prophenoloxidase: a Cooper containing protein homologous to arthropod hemocyanin. Proceedings of the National Academy of Sciences, 92: 7774-7778.
52. Kollien AH & Schaub GA. 2000. The development of *Trypanosoma cruzi* in Triatominae. Parasitology Today, 16: 381-386.

53. Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.
54. Lagueux M, Perrodou E, Levashina E A, Capovilla M, & Hoffmann JA. 2000. Constitutive expression of a complement-like protein in toll and JAK gain-of-function mutants of *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97: 11427-11432.
55. Lavine MD & Strand MR. 2003. Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 32:1295-1309.
56. Lehane MJ. 2005. *The biology of blood-sucking in insects*. Cambridge University Press, 2a ed. EUA. 200 pp.
57. Lent H & Wygodzinsky P. 1979. Revision of the Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) and their significance as vectors of Chagas' Disease. *Bulletin of the American Museum of Natural History* 163: 125-520.
58. Levashina EA, Moita LF, Blandin S, Vriend G, Lagueux M, Kafatos FC. 2001. Conserved role of a complement-like protein in phagocytosis revealed by dsRNA knockout in cultured cells of the mosquito, *Anopheles gambiae*. *Cell*, 9:709-18.
59. Levine ND, Corliss JO, Cox PEG. 1980. A newly revised classification of the protozoa. *Journal of Protozoology*, 27: 37-58.
60. Levy F, Bulet P, Ehret-Sabatier L, 2004. Proteomic analysis of the systemic immune response of *Drosophila*. *Molecular & Proteomics*, 3: 156-166.
61. 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.
62. Magallón-Gastélum E, Lozano-Kasten F, Soto Gutierrez M, Flores-Pérez A, Sánchez B, Espinoza B, Bosseno MF, Brenière SF. 2006. Epidemiological risk for *Trypanosoma cruzi* transmission by species of Phyllosoma complex in the occidental part of Mexico. *Acta Tropica*, 97: 331-338.
63. Majerowicz D, Cezimbra MP, Alves-Bezerra M, Entringer PF, Atella GC, Sola-Penna M, Meyer-Fernandes JR, Gondim KC. 2013. *Rhodnius prolixus* lipophorin: lipid composition and effect of high temperature on physiological role. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 82: 129-140.
64. Martínez HF, Villalobos GC, Ceballos AM, De la Torre O, Laclette JP, Alejandr -Aguilar R, Espinoza B. 2006. Taxonomic study of the Phyllosoma complex and other triatómino (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.
65. Martínez-Hernández F, Martínez-Ibarra JA, Catal  S, Villalobos G, De la Torre P, Laclette JP, Alejandr -Aguilar R, Espinoza B. 2010. Natural crossbreeding between sympatric species of the Phyllosoma complex (insecta: Hemiptera: Reduviidae) indicate the existence of the only one species with morphologic and genetic variations. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 82: 74-82.
66. Martínez-Velasco ML. 2004. Tesis de Licenciatura. Estudio del Proteoma de *Trypanosoma cruzi*. Identificaci n de moléculas de importancia biol gica. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. Universidad Nacional Autónoma de México.

67. Mejia JS, Bishop JV, & Titus RG. 2006. Is it possible to develop pan-arthropod vaccines? *Trends in parasitology*, 22: 367-370.
68. Mello CB, Azambuja P, Garcia ES, Ratcliffe NA. 1996. Differential in vitro and in vivo behavior of three strains of *Trypanosoma cruzi* in the gut and hemolymph of *Rhodnius prolixus*. *Experimental Parasitology*, 82:112-121.
69. Mello CB, Garcia ES, Ratcliffe NA, Azambuja P. 1995. *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*: Interplay with hemolymph components of *Rhodnius prolixus*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 65: 261-268.
70. Mohamed HA, Ingram GA, Molyneux DH. 1992. Carbohydrate-binding specificities of anti-erythrocyte lectins (hemagglutinins) in *Anopheles gambiae* gut extracts and haemolymph. *Medical Veterinary and Entomology*, 6: 217-224.
71. Moreira CJC, Waniek PJ, Valente RH, Carvalho PC, Perales J, Feder D, Geraldo B & Mello CB. 2014. Isolation and molecular characterization of a major hemolymph serpin from the triatomine, *Panstrongylus megistus*. *Parasites and Vectors*, 7: 1-16.
72. Mullen L & Goldsworthy G. 2003. Changes in the lipophorins are related to the activation of phenoloxidase in the hemolymph of *Locusta migratoria* in response to injection of immunogens. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 33: 661-670.
73. Niere M, Dettloff M, Maier T, Ziegler M, Wiesner A. 2001. Insect immune activation by apolipophorin III is correlated with the lipid-binding properties of this protein. *Biochemistry*, 40: 11502-11508.
74. Noireau F. 2009. Wild *Triatoma infestans*, a potential threat that needs to be monitored. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104: 60-64.
75. Paiva-Silva GO, Sorgine M HF, Benedetti CE, Meneghini R, Almeida IC, Machado, EA & Masuda H. 2002. On the biosynthesis of *Rhodnius prolixus* heme-binding protein. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 32: 1533-1541.
76. Paskewitz SM & Shi L. 2005. The hemolymph proteome of *Anopheles gambiae*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 35:815-824.
77. Paskewitz SM, & Christensen BM. 1996. Immune responses of vectors. *The biology of disease vectors*. Boulder, Colorado: University Press of Colorado, 371-392.
78. Patnaik BB, Saha AK, Bindroo BB & Han YS. 2012. Lectins as possible candidates towards anti-microbial defense in silkworm, *Bombyx mori* L. *African Journal of Biotechnology*, 11: 11045-11052.
79. Perez-Molares D. 2007. Tesis de Maestría. Estrés Calórico en *Trypanosoma cruzi*: análisis proteómico y caracterización del gen SHSP16. Facultad de Química. Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas. Universidad Nacional Autónoma de México.
80. Pham DQD & Winzerling JJ. 2010. Insect ferritins: Typical or atypical? *Biochimica et Biophysica Acta*, 1800: 824–833.
81. Rassi Jr A, Rassi A & Marin-Neto JA. 2010. Chagas disease. *The Lancet*, 375: 1388-1402.
82. Rassi Jr A, Rassi A, & Marcondes de Rezende J. 2012. American trypanosomiasis (Chagas disease). *Infectious Disease Clinics of North America*, 26: 275-291.
83. Rojas-Wastavino G, Cabrera-Bravo M, García De la Torre G, Vences-Blanco M, Ruiz Hernández A, Bucio Torres M, Guevara Gómez Y, Escobar Mesa A, Salazar Schettino PM. 2004. Insecticide and community interventions to control *Triatoma dimidiata* in localities of the State of Veracruz, Mexico. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 99: 433-437.

84. Romaña C. 1935. Acerca de un síntoma inicial de valor para el diagnóstico de la forma aguda de la enfermedad de Chagas. La conjuntivitis schizotripanosómica unilateral (hipótesis sobre la puerta de entrada conjuntival de la enfermedad). *MEPRA*, 22: 16-25.
85. Sánchez B, Monteón V, Reyes PA, Espinoza B. 2001. Standardization of Micro-Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) and Western Blot for Detection of *Trypanosoma cruzi* Antibodies Using Extracts from Mexican Strains as Antigens. *Archives of Medical Research* 32: 382–388.
86. Chamber-Reis, BLF, Nardelli S, Régis-Silva CG, Campos PC, Cerqueira PG, Lima SA & Machado CR. 2012. DNA polymerase beta from *Trypanosoma cruzi* is involved in kinetoplast DNA replication and repair of oxidative lesions. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 183: 122-131.
87. Schaub, G. A. 2009. Interactions of trypanosomatids and triatomines. *Advances in Insect Physiology*, 37: 177-242.
88. Tay J, Salazar Schettino PM, Bucio M, Zarate L. 1980. La enfermedad de Chagas en la República Mexicana. *Salud Pública México*, 22: 409-450.
89. Tsakas S, Marmakas VJ. 2010. Insect immunity and its signalling: an overview. *Invertebrate Survival Journal*, 7: 228-238.
90. Tufail M & Takeda M (Eds.). 2012. Hemolymph proteins and functional peptides: recent advances in insects and others arthropods. Vol.1 Bentham Science Publishers. EUA. 197 pp.
91. Ursic-Bedoya RJ, Nazzari, Cooper D, Triana O, Wolff M & Lowenberg C. 2008. Identification and characterization of two novel lysozymes from *Rhodnius prolixus*, a vector of Chagas disease. *Journal of Insect Physiology*, 54: 593-603.
92. Vierstraete E, Verleyen P, Baggerman G, D'Hertog W, Van den Bergh G, Arckens L & Schoofs, L. 2004. A proteomic approach for the analysis of instantly released wound and immune proteins in *Drosophila melanogaster* hemolymph. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101: 470-475.
93. Whitten MM, Tew IF, Lee BL & Ratcliffe NA. 2004. A novel role for an insect apolipoprotein (apolipoprotein III) in β -1, 3-glucan pattern recognition and cellular encapsulation reactions. *The Journal of Immunology*, 172: 2177-2185.
94. WHO. 2010. Chagas disease (American trypanosomiasis) fact sheet. *Weekly Epidemiology Report*, 85: 334–336.
95. Wojasek H & Leal W. 1999. Conformational change in the pheromone-binding protein of *Bombyx mori* induced by pH and interaction with membranes. *Journal of Biology and Chemistry*, 274: 30950-30956.
96. Yergey AL, Coorsen JR, Backlund PS Jr, Blank PS, Humphrey GA, Zimmerman J, Campbell JM, Vestal ML. 2002. De novo sequencing of peptides using MALDI-TOF/TOF. *Journal of American Society of Mass Spectrometry*, 13: 784-791.
97. Yu SJ. 1996. Insect Glutathione S-Transferases. *Zoological Studies*, 35: 9-19.
98. Zasloff, M. 2002. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*, 415: 389-395.
99. Zhang X, Zheng Y, Jagadeeswaran G, Ren R, Sunkar R & Jiang H. 2014. Identification of conserved and novel microRNAs in *Maduca sexta* and their possible roles in the expression and regulation of immunity-related genes. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 47: 12-22.
100. Zingales B, Andrade SG, Briones MRS, Campbell DA, Chairi E, Fernandes O, Guhl F, Lages-

Silva E, Macedo AM, Machado CR, Miles MA, Romanha AJ, Sturm NR, Tibayrenc M, Schijman AG. 2009. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*; 104: 1051-1054.

XII. ANEXO

Soluciones generales

Amortiguador de fosfato de sodio (PBS) 10x

Reactivo	Distribuidor	Cantidad
Cloruro de Sodio (NaCl)	Sigma	80 g
Cloruro de Potasio (KCl)	Baker	2 g
Fosfato de sodio dibásico (Na ₂ HPO ₄)	Baker	14.4 g
Fosfato de potasio dihidratado (KH ₂ PO ₄)	Baker	2.4 g
H ₂ O	Bidestilada	Aforar a 1L

Amortiguador de transferencia

Reactivo	Distribuidor	Cantidad
Tris Base	Sigma	3.03 g
Glicina	Bio-rad	14.4 g
Metanol	Baker	200 mL
H ₂ O	milli Q	Aforar a 1 L

Soluciones SDS-PAGE

Acrilamida/Bisacrilamida (30%/0.8%)

Reactivo	Distribuidor	Cantidad
Acrilamida	Bio-rad	30 g
N, N-metilen-bisacrilamida	Bio-rad	0.8 g
H ₂ O	milli Q	Aforar a 100 mL

Nota. Filtrar por una membrana de 0.22 μ m. Guardar en oscuridad a 4° C.

4X Tris.HCl/SDS pH 6.8

Reactivo	Distribuidor	Cantidad
Tris base	Sigma	6.05 g
SDS	Bio-rad	0.4 g
H ₂ O	milli Q	Aforar a 100 mL

Nota 1. pH 6.8 Nota 2. Filtrar por una membrana de 0.22 μ m. Guardar en oscuridad a 4° C.

4X Tris-HCl/SDS pH 8.8

Reactivo	Distribuidor	Cantidad
Tris base	Sigma	91 g
SDS	Bio-rad	2 g
H ₂ O	milli Q	Aforar a 500 mL

Nota 1. pH 8.8 Nota 2. Filtrar por una membrana de 0.22 μ m. Guardar en oscuridad a 4° C.

Persulfato de amonio (APS) al 15%

Reactivo	Distribuidor	Cantidad
Persulfato de amonio	Bio-rad	0.15 g
H ₂ O	milli Q	Aforar a 1 mL

Nota. Guardar en oscuridad a 4° C.

Amortiguador de electroforesis 5X

Reactivo	Distribuidor	Cantidad
Tris base	Sigma	15.1 g
Glicina	Bio-rad	72 g
SDS	Bio-rad	5 g
H ₂ O	milli Q	Aforar a 1 L

Solución de agarosa al 0.5%

Reactivo	Distribuidor	Cantidad
Agarosa	Gibco	0.5 g
Azul de bromofenol	Bio-rad	Trazas
Amortiguador de electroforesis 1X		Aforar a 100 mL

Azul de Coomassie

Reactivo	Distribuidor	Cantidad
Azul de Coomassie R-250	Bio-rad	0.25 g
Metanol	Baker	250 mL
Ácido acético	Baker	50 mL
H ₂ O	Bidestilada	Aforar a 500 mL

Nota. Filtrar con papel filtro de poro mediano. Proteger de la luz.

Desteñidor de Coomassie

Reactivo	Distribuidor	Cantidad
Metanol	Baker	200 mL
Ácido acético	Baker	70 mL
H ₂ O	Bidestilada	Aforar a 1L

Volúmenes requeridos para preparar un gel de poliacrilamida al 12% de 5 x 8 cm, grosor 0.75 mm

Reactivo	Volumen Gel concentrador (4%)	Volumen Gel separador (12%)
Acrilamida 30%	0.21 mL	2 mL
4X Tris-HCl/SDS pH 8.8	-----	1.25 mL
4X Tris-HCl/SDS pH 6.8	0.417 mL	-----
Agua milli Q	1.017 mL	1.75 mL
APS 15%	8.5 µL	16 µL
TEMED	1.6 µL	3.3 µL

Volúmenes requeridos para preparar un gel de poliacrilamida al 15 % de 5 x 8 cm, grosor 0.75 mm

Reactivo	Volumen Gel concentrador (4 %)	Volumen Gel separador (15%)
Acrilamida 30%	0.21 mL	2.5 mL
4X Tris-HCl/SDS pH 8.8	-----	1.25 mL
4X Tris-HCl/SDS pH 6.8	0.417 mL	-----
Agua milli Q	1.017 mL	1.25 mL
APS 15%	8.5 µL	16 µL
TEMED	1.6 µL	3.3 µL

XIII. ANEXO II

Fisiología de proteínas de hemolinfa

Los lípidos de la dieta son digeridos, absorbidos y utilizados por las células epiteliales para la síntesis de lípidos más complejos, principalmente TAGs (triacilgliceroles), DAGs (diacilgliceroles) y Lps (fosfolípidos). Los lípidos son transferidos desde el cuerpo graso a Lp (la lipoproteína más importante en insectos) para ser transportados a otros órganos. Los Lps son clasificados de acuerdo a su densidad, en fosfolípidos de muy alta densidad (VHDLp), fosfolípidos de alta densidad (HDLp) y fosfolípidos de baja densidad (LDLp). Durante el vuelo en algunos insectos, como *Maduca sexta* y *Locusta migratoria*, los HDLp circulantes toman una mayor cantidad de lípidos del cuerpo graso y se convierte en LDLp. Este incremento en la movilización de lípidos es mediada por las hormonas adenocinéticas (AKHs), una familia de hormonas peptídicas de 8-10 aminoácidos que son sintetizados y secretados por la corpora cardiaca. En *M. sexta*, durante los períodos de inanición en larvas se presenta un incremento en cantidad de lípidos asociados con Lp sin la formación de LDLp (Gondim *et al.*, 2013). Los mecanismos de movilización pueden variar entre especies y /o de acuerdo del órgano y la situación fisiológica. En *L. migratoria*, Lp puede ser tomada por endocitosis y subsecuentemente reciclada, junto con su receptor y ser de nuevo secretada, como un complejo que no se desintegra bajo condiciones endosomales. En especies donde las Lp no son internalizadas, las partículas de Lp sirven como transportadores reversibles de lípidos. En *Rhodnius prolixus*, después de la ingesta, las Lp toman los lípidos preferentemente del intestino o del cuerpo graso dependiendo del día post-ingesta y lo transportan a los ovarios donde son reincorporados para el desarrollo de oocitos, sin la acumulación de apoproteínas. Este transporte de lípidos está mediado vía receptores específicos de membrana (Majerowicz *et al.*, 2013).

El término de proteínas de almacenamiento implica la recepción de materia prima en la hemolinfa y el almacenaje de ésta en el cuerpo graso. Las proteínas de almacenamiento sirven como reserva de aminoácidos que servirán posteriormente en el desarrollo, y sin importar la función de la proteína y constitución de aminoácidos, serán captadas en el cuerpo graso. La mayoría de estas proteínas han sido estudiadas en Diptera y Lepidoptera, pero recientemente se ha ampliado el estudio a otros órdenes. Todas las

especies de dípteros poseen una proteína de almacenamiento rica en aminoácidos aromáticos (>15%) y metionina (>4%). Mientras que diversos nombres se les ha dado a esta proteína (califorina, o proteína de suero de larva, LSP-1) en la actualidad se conoce como Arilforina, describiendo su notable función como acarreador de aminoácidos aromáticos. Otra proteína hexamérica, que tiene un mayor contenido de aminoácidos aromáticos y metionina, es la LSP-2 encontrada en *Drosophila melanogaster*. Dos proteínas de almacenamiento encontradas en Lepidoptera, en contraste, son ricas en aminoácidos aromáticos o metionina, pero no en ambos. El nombre de arilforina se refiere a proteínas con un contenido mayor del 15% de tirosina y fenilalanina, mientras que el segundo tipo se denominan como proteínas de almacenamiento ricas en metionina. Gracias a las proteínas que actualmente han sido secuenciadas, se puede encontrar una clara homología con las hemocianinas de otros artrópodos. Las hemocianinas son proteínas que unen oxígeno, encontradas en quelicerados y crustáceos. Basándose en que los insectos con tráqueas generalmente no necesitan proteínas transportadoras de oxígeno, la función de unión de oxígeno pudo haberse perdido y asumir diferentes funciones en los insectos (Hauerland, 1996).

Una parte esencial en el mecanismo de almacenamiento de estas proteínas es el reconocimiento en el cuerpo graso. Desde el descubrimiento de estas proteínas ha surgido la duda de porque las proteínas de almacenamiento son liberadas en la hemolinfa después de ser sintetizadas en el cuerpo graso, para ser tomada de nuevo por el cuerpo graso días después. Podría ser una consecuencia evolutiva a la disponibilidad de proteínas solubles en agua (hemocianinas) en la hemolinfa. Además el almacenamiento en el cuerpo graso requiere la evolución de un mecanismo eficiente, la endocitosis mediada por receptores (Hauerland, 1996).

El hierro juega un papel muy importante en la viabilidad celular como co-factor en varios procesos como la síntesis de nucleótidos, metabolismo del oxígeno, ciclo del ácido tricarbóxico, producción de esteroides y aminoácidos. Desde que Fe⁺³ puede catalizar el daño oxidativo a biomoléculas, todos los organismos vivos tienen proteínas que unen, transportan y secuestran hierro. En los mamíferos, el hierro extracelular es transportado por la transferrina mientras que el hierro celular es almacenado por la ferritina. La ferritina citoplasmática es una proteína ubiquitina de almacenaje de hierro con un peso molecular

de aproximadamente 440 kDa. Es un heterodímero constituido de 24 subunidades, que forman la cadena ligera (L) y la cadena pesada (H). La proporción de H y L varía de acuerdo de la necesidad de hierro. La cadena H está caracterizada por residuos de aminoácidos que forman el “centro ferroxidativo” responsable de la oxidación de Fe⁺² a Fe⁺³, y residuos de tirosina responsables de la rápida biomineralización del hierro, mientras que la cadena L posee residuos de aminoácidos que inducen la nucleación del hierro. La ferritina influye la disponibilidad de hierro y la respuesta al estrés oxidativo y la pérdida de la expresión de esta proteína está asociada al incremento de la susceptibilidad al exceso de hierro, toxicidad dependiente de hierro y estrés oxidativo.

Las ferritinas de insectos también están compuestas de dos subunidades, aunque de mayor masa (400-600 kDa) y subunidades más pesadas (21-36 kDa). Las subunidades están frecuentemente glicosiladas y son encontradas en el retículo endoplásmico en las células de insectos así como en la hemolinfa. Estas proteínas son sintetizadas con una señal peptídica que la dirige a la vía secretora (Pham & Winzerling, 2010). En adición a su función en el metabolismo de hierro, también pueden tener un papel importante en la respuesta inmune, ya que la ferritina es inducida en varios estudios proteómicos bajo distintos retos patogénicos (Paskewitz & Shi, 2009). Sin embargo, donde la ferretina ensambla y carga el hierro sigue siendo un misterio, trabajo previo con microscopia de electrones indica la presencia de ferretina cargada de hierro en el aparato de Golgi y en el retículo endoplásmico (Pham & Winzerling, 2010).