



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

Comparación del perfil de glicoproteínas presentes en el intestino medio y posterior de *Meccus pallidipennis* y *Triatoma barberi*

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

PRESENTA

ELIZABETH JAQUELINE RIVAS MEDINA



MÉXICO, D.F.

2014



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: Abel Gutiérrez Ramos

VOCAL: Profesor: Euclides Avila Chávez

SECRETARIO: Profesor: Paz María Silvia Salazar Schettino

1er. SUPLENTE: Profesor: Beatriz Ruiz Villalfán

2° SUPLENTE: Profesor: José Cordero Hernández

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Medicina, Departamento de Microbiología y Parasitología, Laboratorio de Biología de Parásitos, Ciudad Universitaria, México D.F.

ASESOR DEL TEMA:

Dra. Paz María Silvia Salazar Schettino

SUSTENTANTE:

Elizabeth Jaqueline Rivas Medina

Este trabajo fue realizado con el apoyo financiero de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico bajo su Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica en el proyecto “Estudio clínico y cardiológico en niños seropositivos a *Trypanosoma cruzi* en dos poblaciones de zonas endémicas de México” con clave IN211613.

Lista de abreviaturas

- dpa. Días postalimentación.
- Fuc. Fucosa.
- GalNAc. N-acetilgalactosamina.
- GlcNAc. N-acetilglucosamina.
- Gp: Glicoproteína.
- H. Hembra.
- IM. intestino medio.
- IP. intestino posterior.
- M. Macho.
- MAA. Lectina de *Mackia amurensis*.
- MPM. Membrana perimicrovellosa.
- NeuAc. Ácido N-acetilneuramínico
- pm. Peso molecular.
- PNA. Lectina de *Arachis hypogoea*.
- WGA. Lectina de *Triticum vulgare*.

Índice

1	Resumen.	1
2	Introducción.	2
3	Antecedentes.	4
3.1	Enfermedad de Chagas.	4
3.2	<i>Trypanosoma cruzi</i>.	10
3.3	Vectores.	15
3.3.1	Intestino de los triatomíneos.	19
3.3.2	Digestión.	21
3.4	<i>Trypanosoma cruzi</i> en el transmisor.	22
3.5	Glicoproteínas.	24
3.5.1	Glicoproteínas en los insectos vectores.	25
4	Justificación.	26
5	Hipótesis y Objetivos.	27
5.1	Hipótesis.	27
5.2	Objetivo general.	27
5.3	Objetivos específicos.	27
6	Metodología.	28
6.1	Insectos.	28
6.2	Alimentación.	28
6.3	Extracción del intestino.	31
6.4	Preparación histológica de las muestras.	31
6.5	Estudio histológico.	31
6.6	Descripción de morfología histológica.	31
6.7	Preparación de muestras para determinación de proteínas y glicoproteínas.	32

6.8	Extracción de proteínas.....	32
6.9	Cuantificación de proteínas.	32
6.10	Determinación del patrón electroforético.	33
6.11	Identificación de glicoproteínas.....	34
7	Resultados.....	36
7.1	Características histológicas del intestino medio y posterior en diferentes condiciones de alimentación.	36
7.1.1	<i>Meccus pallidipennis</i> , macho en ayuno y 10 días postalimentación.	36
7.1.2	<i>Meccus pallidipennis</i> , hembra en ayuno y 10 días postalimentación.	38
7.1.3	<i>Triatoma barberi</i> , macho en ayuno y 10 días postalimentación..	40
7.1.4	<i>Triatoma barberi</i> , hembra en ayuno y 10 días postalimentación.	43
7.2	Determinación del perfil electroforético.....	46
7.3	Identificación de glicoproteínas.....	54
7.3.1	Reconocimiento de residuos de N-acetilglucosamina con la lectina WGA en Western-blot en intestino medio y posterior de machos y hembras de <i>Meccus pallidipennis</i> y <i>Triatoma barberi</i> en diferentes condiciones de alimentación.....	54
7.3.2	Reconocimiento de residuos de N-acetilgalactosamina con la lectina PNA en Western-blot en intestino medio y posterior de machos y hembras de <i>Meccus pallidipennis</i> y <i>Triatoma barberi</i> en diferentes condiciones de alimentación.....	63
7.3.3	Reconocimiento de residuos de α -2,3-ácido siálico con la lectina MAA en Western-blot en intestino medio y posterior de machos y hembras de <i>Meccus pallidipennis</i> y <i>Triatoma barberi</i> en diferentes condiciones de alimentación.....	70
8	Discusión de resultados.....	71

8.1	Características histológicas del intestino medio y posterior en diferentes condiciones de alimentación.	71
8.2	Determinación del perfil electroforético.	73
8.3	Identificación de glicoproteínas.	75
9	Conclusiones.	78
10	Perspectivas.	79
11	Referencias bibliográficas.....	80

1 Resumen.

El parásito flagelado *Trypanosoma cruzi* realiza procesos de multiplicación y diferenciación en las diferentes porciones del tracto digestivo de los triatomíneos transmisores. En estos procesos existen interacciones entre el intestino del vector y el parásito que pueden estar influenciadas por la morfología del intestino del insecto o bien por la presencia de moléculas de adhesión, como las proteínas y glicoproteínas. En México existe una amplia variedad de especies y distribución de transmisores de *T. cruzi* y se ha observado que la virulencia de los aislados del parásito está relacionada con la especie de vector; por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue comparar la morfología y el perfil de proteínas y glicoproteínas del intestino medio y posterior de machos y hembras de dos especies de vectores de *T. cruzi*, de importancia en el país, *Meccus pallidipennis* y *Triatoma barberi*. El análisis histológico de cortes de los intestinos teñidos con PAS se realizó por microscopía de luz; y se observó el patrón electroforético por electroforesis desnaturizante en geles de poliacrilamida y afinidad a lectinas por Western blot para reconocimiento de residuos de N-acetil-D-glucosamina, N-acetil-D-galactosamina y α -2,3-ácido siálico. Se observaron diferencias morfológicas entre intestino medio y posterior en todas las condiciones experimentales, siendo más relevante la presencia de gránulos intracelulares y secreción PAS positiva en el epitelio del intestino de las hembras de *Triatoma barberi* en ayuno; se identificaron componentes de 61 y 64 kDa en el patrón electroforético que presentaron residuos de N-acetil-D-glucosamina, los cuales en trabajos previos han sido relacionados con el proceso de digestión del insecto. Por otra parte, se identificaron componentes de 46 y 45 kDa con residuos de N-acetil-D-galactosamina, que previamente ha sido demostrado están involucrados en el proceso de reconocimiento parásito-intestino del vector. Las diferencias observadas en la morfología, en el patrón electroforético y de glicoproteínas en el intestino de adultos de *M. pallidipennis* y *T. barberi*, podrían influir en el desarrollo de *Trypanosoma cruzi* en el tracto intestinal del insecto.

2 Introducción.

La enfermedad de Chagas es una enfermedad causada por el parásito flagelado *Trypanosoma cruzi*, transmitido por hemípteros hematófagos de la familia *Reduviidae*. Esta enfermedad es endémica en Latinoamérica, se estima que a nivel mundial existen aproximadamente 10 millones de personas infectadas y más de 25 millones están en riesgo de adquirir la infección (OMS, 2013).

Trypanosoma cruzi es un parásito que pertenece al orden *Kinetoplastida* y a la familia *Trypanosomatidae*, presenta diferentes fases en su desarrollo; epimastigote, tripomastigote (metacíclico y sanguíneo) y amastigote. El parásito infecta 150 especies de animales domésticos y silvestres (Levine et al., 1980); OMS, 2007).

En México, se han reportado 32 especies de vectores de *T. cruzi*. Dos de las especies transmisoras de importancia para el humano en el país, son *Meccus pallidipennis* [Stal, 1872] y *Triatoma barberi* [Usinger, 1939]; el primero se encuentra distribuido en 13 estados, es una especie con predominio en el peridomicilio y se ha descrito como “vector visitante”, ya que entra en las viviendas para alimentarse. *Triatoma barberi* se encuentra distribuida en 12 estados y habita principalmente dentro del domicilio además, del peridomicilio; los aislados de *T. cruzi* obtenidos de este vector son altamente virulentos, esto demostrado por la patología en modelo murino y en humanos (Salazar et al., 2010).

En 1939, Mazzotti encontró que las cepas de *Trypanosoma cruzi* aisladas de *Triatoma barberi* eran más virulentas que las cepas de otras especies de triatomíneos del país. Tay en 1969 realizó estudios para explicar esta modificación en la virulencia, sin embargo, no se concluyó si ésta era dada por el vector o el hospedero (Mazzotti, 1939; Tay et al., 1969).

Dentro del intestino del vector, los epimastigotes de *T. cruzi* se diferencian en tripomastigotes metacíclicos. Perlowagora en 1994, monitoreó la metaciclogénesis de *T. cruzi* en nueve especies de triatomíneos y observó que fue vector dependiente. En un estudio con tres especies de transmisores en México, *Triatoma barberi*

presentó el mayor índice de metaciclologenia en comparación con *Meccus pallidipennis* y *Triatoma dimidiata*. En otro estudio se demostró que *T. cruzi* en el vector *Triatoma dimidiata* afecta el comportamiento de diferentes cepas del parásito, modificando la parasitemia, los nidos de amastigotes y la mortalidad en ratones (Salazar et al.; Guzman et al., 2012).

En otra parasitosis, se ha relacionado la presencia de glicoproteínas intestinales con la metaciclologénesis. En *Rhodnius prolixus*, se ha observado la importancia de la interacción entre glicoproteínas y carbohidratos del parásito y el intestino del insecto ya que al incubar a los parásitos con carbohidratos se logró inhibir su unión a la membrana perimicrovellosa del intestino de *R. prolixus*. Dinglasan en 2005, propuso el uso de anticuerpos monoclonales para bloquear residuos de carbohidratos del intestino de los vectores y modificar el desarrollo de los parásitos (Wilkins & Billingsley, 2001; Dinglasan et al., 2005; Alves et al., 2007).

3 Antecedentes.

3.1 Enfermedad de Chagas.

La enfermedad de Chagas fue descrita por el Dr. Carlos Ribeiro Justiniano Chagas en 1909 en Brasil e identificó como agente causal al parásito *Trypanosoma cruzi* y al insecto transmisor. Aun cuando la Tripanosomiasis es endémica de América Latina, ha cobrado importancia en Estados Unidos de Norteamérica, Canadá Australia, Japón y 17 países europeos debido a la presencia de casos como resultado de la migración (Figura 1)(Chagas, 1909; OMS, 2013).

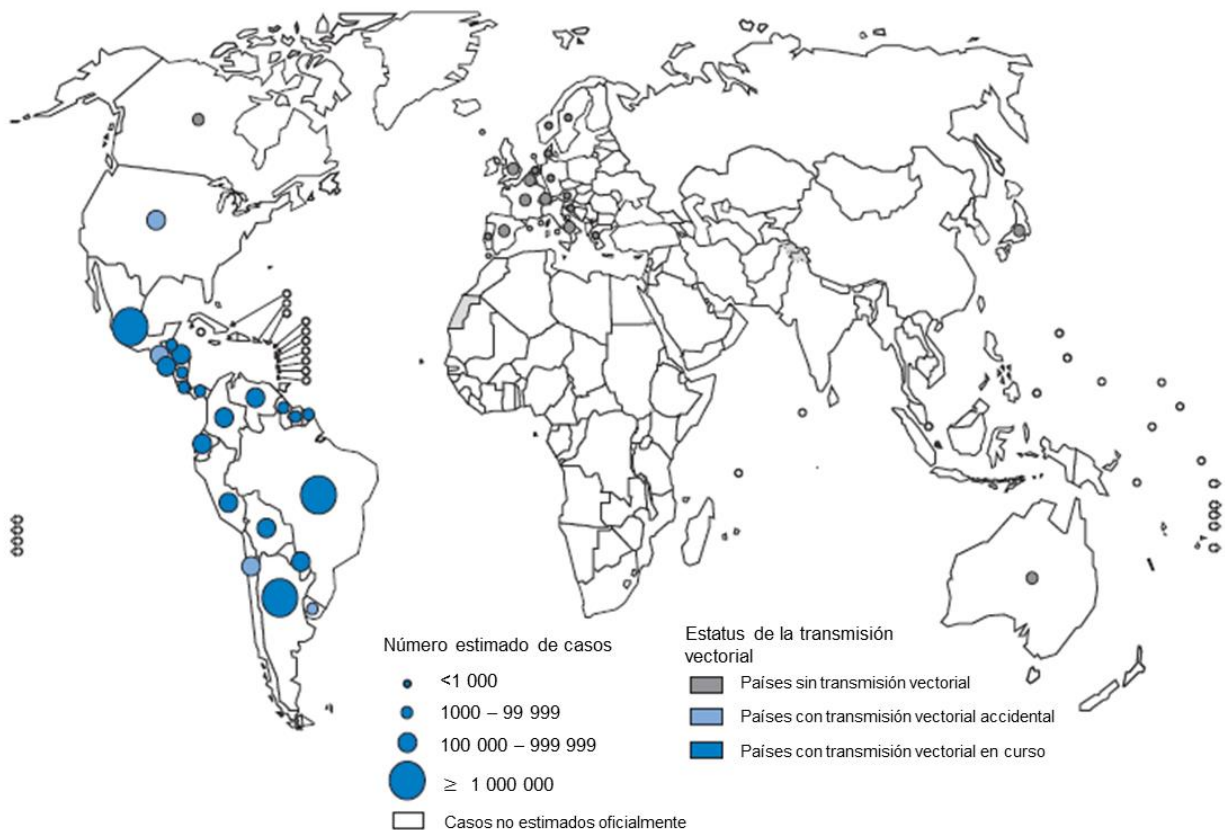


Figura 1. Distribución mundial de casos de infección por *Trypanosoma cruzi* 2006-2009 (Modificado de (WHO, 2010)).

Según la OMS, se calcula que a nivel mundial existen alrededor de 10 millones de personas infectadas, más de 25 millones de personas están en riesgo de adquirir la

enfermedad y en el 2008 esta enfermedad causó la muerte a más de 10 000 personas (OMS, 2013).

La tasa de prevalencia más alta se encuentra en Bolivia (6.75%), seguida por Argentina (4.13%), El Salvador (3.37%), Honduras (3.05%), Paraguay (2.54%); mientras en Brasil y México la prevalencia es de 1% aproximadamente (Kirchhoff, 2011).

La enfermedad es propia de países en desarrollo y está asociada a factores sociales y ambientales tales como viviendas construidas con materiales de riesgo (muros de adobe, madera y piedra; techos de palma, tejas o lamina; o pisos de tierra), residir en áreas de pobreza, altas tasas de migración, además de pertenecer a grupos vinculados con el trabajo agrícola en zafras y cosechas (Salazar et al., 2010; OMS, 2013).

En la cadena de transmisión del parásito son importantes los reservorios, tanto silvestres como domésticos. En 2007, la OMS refiere 150 especies de animales, entre los que se han identificado perro, gato, vaca, cerdo, burro, armadillo, tlacuache, ardilla, ratón de campo, murciélago frutícola y marta. Los anfibios y aves son refractarios a la infección, están involucrados por ser fuentes alimentarias de los transmisores (Salazar et al., 1997; Jurberg & Galvao, 2006; Rassi et al, 2012).

La forma de transmisión natural del parásito ocurre cuando las heces de un triatomino infectado con *Trypanosoma cruzi* entran en contacto con mucosas, conjuntiva o una lesión en la piel. La forma de transmisión por transfusión sanguínea es la segunda en frecuencia, ya que se ha observado en diversos estudios con porcentajes significativos de donantes seropositivos a *T. cruzi*; el riesgo de infección por este mecanismo aumenta cuando se trata de transfusión de plaquetas ya que durante la centrifugación de la sangre los parásitos quedan concentrados en la fase leucoplaquetaria (Kirchhoff, 2011).

Otras formas de transmisión son vertical o connatal, por trasplante de órganos, accidentes de laboratorio y oral (Kirchhoff, 2011).

En México, existen las condiciones climatológicas, orográficas y socioeconómicas para la presencia de los vectores, la transmisión del parásito y la enfermedad (Cruz & Pickering, 2006).

En la Encuesta Nacional de Seroepidemiología realizada en 1987, se observó que los estados del sur y sureste del país, con bajo desarrollo económico, bajos niveles de escolaridad y en zonas rurales, presentaron seroprevalencia elevada (Velasco et al., 1992).

En bancos de sangre del país, se observó un porcentaje de seropositividad a *T. cruzi* en sangre de donadores desde 0.3% en la Ciudad de México hasta 17.5% en Puebla. En un estudio realizado en 1999 a donadores de sangre del Instituto Nacional de Cardiología se obtuvo un 0.3% de seroprevalencia a *Trypanosoma cruzi*, este porcentaje fue incluso más alto que el de VIH, VDRL, VHB y HCV. Novelo en 2010, realizó un tamizaje en 71 bancos de sangre del IMSS y encontró una seroprevalencia nacional de 0.406%, la más baja con 0.013% en Aguascalientes y la más alta 3.11% en Poza Rica, Veracruz. Se ha estimado que el riesgo de adquisición de la enfermedad después de una unidad de sangre transfundida es del 20% aproximadamente (Dumonteil, 1999; Monteón et al., 1999; Cabrera et al., 2004; Novelo et al., 2010; Rassi & Marin, 2010).

La transmisión vertical o connatal es un mecanismo importante en los países endémicos, se estima que aproximadamente entre el 1-10% de los infantes nacidos de madres con enfermedad crónica de Chagas, están infectados. En Bolivia, se ha estimado el 6% de seroprevalencia en niños por transmisión materno fetal (Brutus et al., 2007; Salas et al., 2007; Torrico et al., 2004; Kirchhoff, 2011).

La transmisión también puede ser resultado del trasplante de órganos que contengan células con amastigotes que al convertirse en tripomastigotes sanguíneos después del trasplante e infectar órganos adyacentes y causar una infección sistémica. Estos casos han sido observados en América latina, Estados Unidos y Canadá (CDC, 2006; Rassi & Marin, 2010; Kirchhoff, 2011).

En 1940, Mazzotti reporta en México, los dos primeros casos humanos y los dos primeros vertebrados infectados con el parásito y a partir de los 50's, Biagi, Tay en los 60's y Salazar en los 70's, realizan encuestas epidemiológicas en diversas regiones del país, con el informe de 2 miocarditis chagásicas *post-mortem* y en 1979, reporta el tercer caso de miocardiopatía chagásica comprobado parasitológicamente en un paciente vivo. En 1984 se reportó el primer caso de megaesófago y en 1986 el primero de megacolon. A la fecha, se han incrementado los estudios en diversas regiones del país encaminados a identificar diversos aspectos de la enfermedad; en los estados de Veracruz, Oaxaca, Morelos, Yucatán, Guerrero y Jalisco se han realizado un número considerable de encuestas epidemiológicas con reportes de casos humanos. Hasta 2004 el número de casos de enfermedad de Chagas registrados en el país fue de 16,979; solo se habían realizado estudios en 12 estados de la República en los que se analizaron 117,733 sueros, de los cuales 2,388 resultaron positivos (Mazzotti, 1940; Salazar et al., 1979 y 1984; Tay et al., 1986; Cruz & Pickering, 2006).

La enfermedad consta de las fases clínicas: aguda, crónica asintomática (indeterminada) y crónica. Durante la fase aguda, se presenta una alta parasitemia, puede ser asintomática o indetectable por los signos y síntomas. Menos del 5% de las personas presentan síntomas como fiebre aguda, cefalea, adenitis y linfagitis, además puede observarse una lesión en el lugar de entrada del parásito al organismo, cuando se presenta en piel se llama Chagoma de inoculación y se caracteriza por una lesión cutánea con edema; si la inoculación se da cerca del ojo, puede presentarse un edema perioftálmico unilateral con conjuntivitis llamado Signo de Romaña. Estos síntomas suelen aparecer alrededor de 8-10 días después de la infección natural o hasta 40 días después de la infección por transfusión sanguínea y puede durar hasta 4-8 semanas. También pueden existir casos con miocardiopatía aguda o meningoencefalitis en niños o adultos inmunocomprometidos (UNAM & OPS, 2006; Cook & Zumla, 2009; Rassi & Marin, 2010; WHO, 2010; Rassi et al., 2012).

En la fase aguda todas las células nucleadas son blanco de infección, cuando la respuesta inmune aumenta se reduce la parasitemia, así como el número de parásitos en los tejidos, señalando el final de esta fase (Rassi & Marin, 2010).

La fase crónica asintomática o indeterminada, tiene una duración aproximada de entre 10-20 años. Durante esta fase el sistema inmune ha logrado reducir el número de parásitos en la circulación sanguínea y no se presentan signos y síntomas, pero se caracteriza por seropositividad contra antígenos de *T. cruzi* (Dumonteil, 1999; UNAM & OPS, 2006; Rassi et al., 2012).

La fase crónica sintomática se caracteriza por la presencia de problemas cardiacos o digestivos (miocardiopatía, megaesófago o megacolon). Se calcula que un 30% de los pacientes presentan problemas cardiacos y un 10% presentan problemas digestivos (Rassi & Marin, 2010; OMS, 2013).

La destrucción de las células infectadas por *Trypanosoma cruzi* es considerado como el principal mecanismo de daño al hospedero, sin embargo existen mecanismos indirectos que contribuyen a la patogenia característica de esta enfermedad. Se ha propuesto que en el progreso de la enfermedad están involucradas reacciones de autoinmunidad debido a la reacción cruzada entre antígenos de *T. cruzi* con tejidos del corazón además de la participación de citocinas y células inflamatorias que afectan la integridad de los tejidos. La infección puede desencadenar en muerte súbita o insuficiencia cardiaca debido a la destrucción progresiva del músculo cardiaco (Kierszenbaum, 2007; Marin et al., 2007; OMS, 2013).

El diagnóstico de laboratorio de la infección por *T. cruzi* puede realizarse por métodos parasitológicos e inmunológicos, el método de elección depende de la fase clínica de la enfermedad en la que se encuentre el individuo. Los métodos parasitológicos son de elección en la fase aguda ya que su propósito es demostrar la presencia del parásito en la sangre. Entre esos métodos se encuentran examen directo, gota gruesa y frotis sanguíneo y para aumentar su sensibilidad pueden

usarse métodos de concentración como Strout y microhematocrito (UNAM & OPS, 2006; BID et al., 2010).

Las pruebas serológicas son usadas en las fases indeterminada (crónica asintomática) y crónica de la enfermedad con la finalidad de encontrar anticuerpos específicos contra *Trypanosoma cruzi*. Los métodos serológicos recomendados por la OMS son ELISA, inmunofluorescencia y hemaglutinación indirectas; deben realizarse al menos dos de esas técnicas serológicas para la confirmación de un diagnóstico (UNAM & OPS, 2006; BID et al., 2010).

Actualmente para el tratamiento de la enfermedad se dispone de Benznidazol y Nifurtimox que son más efectivos si se administran en individuos en la fase aguda; de igual forma es necesario el tratamiento oportuno de las afecciones cardíacas o digestivas. Se ha observado en estudios clínicos un mayor perfil de seguridad y eficacia con el tratamiento de Benznidazol, convirtiéndolo en el tratamiento de elección (Rassi et al., 2012; OMS, 2013).

3.2 *Trypanosoma cruzi*.

Trypanosoma cruzi es un protozoo flagelado que pertenece al orden *Kinetoplastida* y a la familia *Trypanosomatidae* (Figura 2).

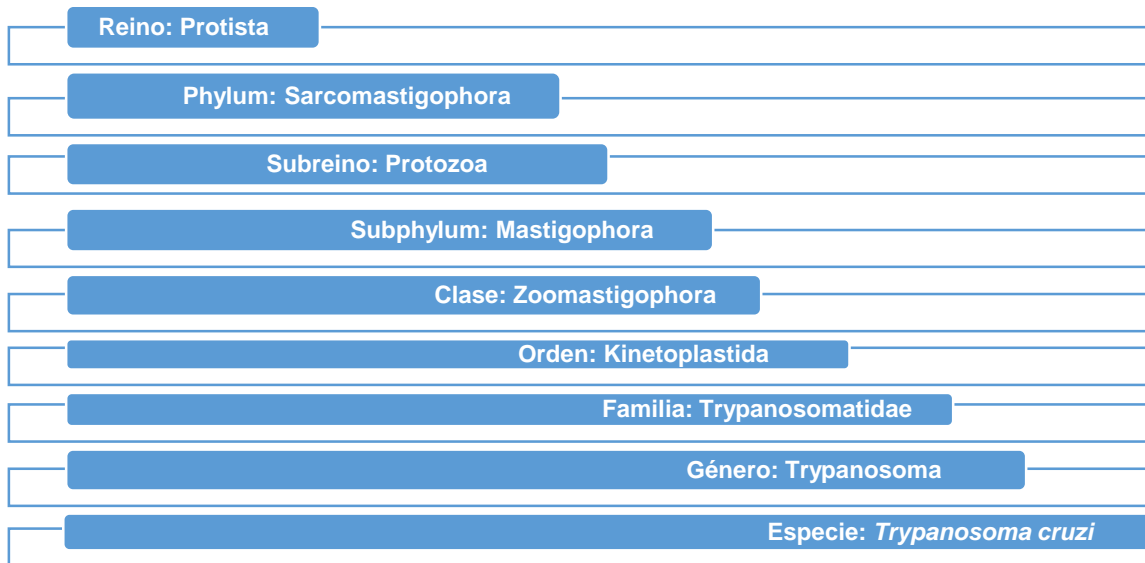


Figura 2. Clasificación taxonómica de *Trypanosoma cruzi* (Levine, 1980).

El parásito presenta 3 principales fases en su desarrollo: tripomastigote (sanguíneo cuando se encuentra dentro del hospedero mamífero en la circulación sanguínea y metacíclico en las heces del transmisor), epimastigote en el intestino del triatomino y medios de cultivo, y amastigote cuando se encuentra dentro de las células del hospedero mamífero. La fase de tripomastigote es de cuerpo alargado de 10-20 μm , con un núcleo vesiculoso, citoplasma poco granuloso y un cinetoplasto terminal con cromatina dispersa del cual emerge la membrana (Figura 3A). El epimastigote es fusiforme y puede medir hasta 30 μm , tiene el cinetoplasto con cromatina organizada de forma compacta en la porción anterior cerca del núcleo, un flagelo y membrana ondulante (Figura 3B). El amastigote no presenta flagelo, se observa el núcleo y el cinetoplasto, miden entre 3-5 μm de diámetro y es una forma de multiplicación o división dentro de las células del hospedero (Figura 3C) (de Souza, 1999; Tyler & Engman, 2001; UNAM & OPS, 2006; Kowalska et al., 2011).

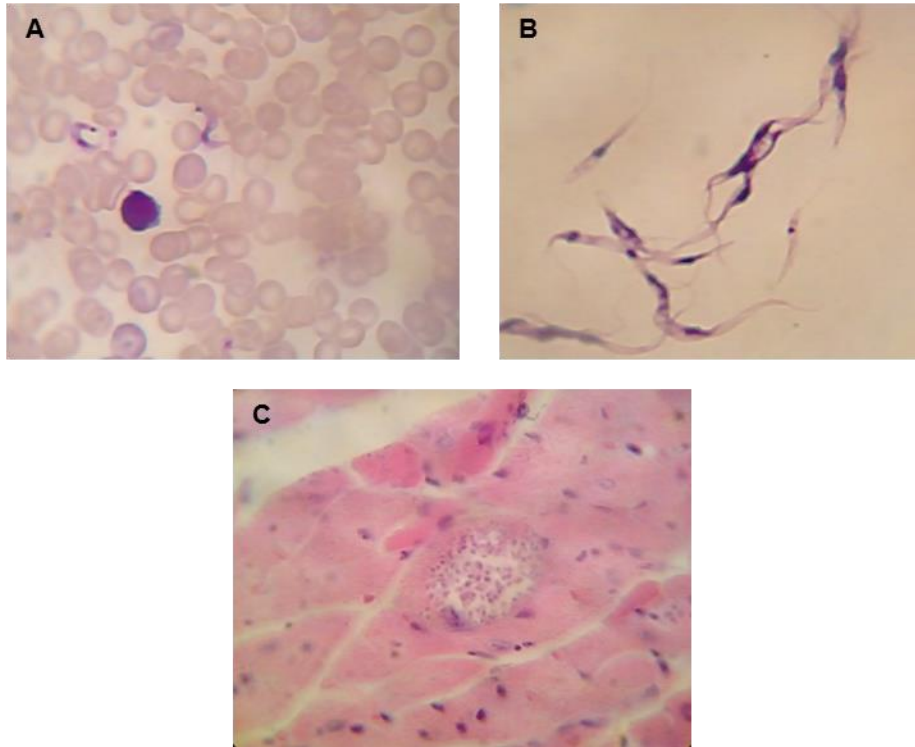


Figura 3. Principales fases del ciclo biológico de *Trypanosoma cruzi* (40x) **A)** Tripomastigotes sanguíneos, **B)** epimastigotes (40x) y **C)** nido de amastigotes en músculo cardíaco murino (40x). Cortesía del Laboratorio de Biología de Parásitos, UNAM.

El ciclo de vida del parásito inicia cuando el vector ingiere tripomastigotes sanguíneos en la sangre de un hospedero infectado (Figura 4), posteriormente en el tracto digestivo del insecto, *T. cruzi* lleva a cabo la multiplicación en fase de epimastigotes y la diferenciación a tripomastigotes metacíclicos que son la forma infectante y salen junto con las heces del triatomino (Rassi et al., 2012).

Cuando un triatomino infectado ingiere sangre de un mamífero deposita sus heces sobre éste. Los tripomastigotes metacíclicos penetran las mucosas, la conjuntiva y la piel, por medio de una lesión previa o la misma causada por la picadura del insecto. Aun cuando los parásitos pueden ser destruidos por el sistema inmune, la mayoría de estos penetran las células del tejido adyacente (Teixeira et al., 2006).

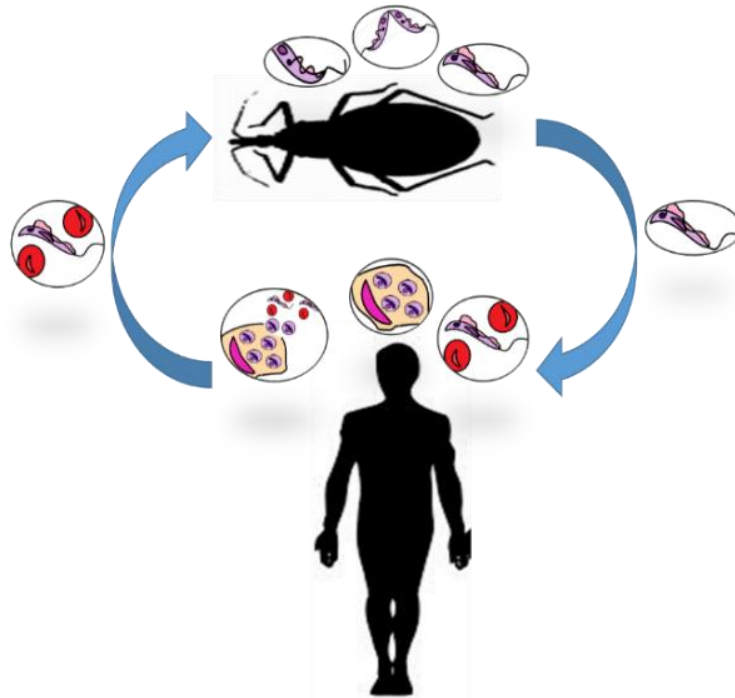


Figura 4. Ciclo biológico natural de *Trypanosoma cruzi*. Cuando un vector ingiere sangre de un hospedero infectado con *Trypanosoma cruzi*, los tripomastigotes sanguíneos se diferencian en epimastigotes en el intestino y comienzan su división por fisión binaria y su diferenciación en tripomastigotes metacíclicos que son liberados en las deyecciones. Cuando las heces del triatmino infectado entran en contacto con mucosas o alguna lesión en el hospedero mamífero, los tripomastigotes metacíclicos invaden las células y se convierten en amastigotes, se dividen por fisión binaria y lisan la célula que los contiene liberándose al torrente sanguíneo como tripomastigotes sanguíneos, los que pueden continuar en circulación o bien invadir otras células.

Con base en estudios moleculares se han determinado polimorfismos genéticos en las diferentes poblaciones de *Trypanosoma cruzi*, actualmente *T. cruzi*, se clasifica en seis unidades discretas de tipificación clasificadas como Tc I al Tc VI. Las unidades discretas de tipificación de *T. cruzi*, Tc I se ha encontrado desde Argentina hasta los Estados Unidos, mientras que Tc II al VI se encuentran distribuidas desde la Cuenca Amazónica hasta el sur de Argentina; sin embargo, es posible encontrar regiones donde todas las unidades discretas de tipificación están presentes, como es el caso de Colombia, en donde Tc I se ha reportado de forma predominante y en una baja proporción, a Tc II, Tc III, Tc IV y Tc VI (Brisse et al., 1998; Zingales et al., 2009; J. M. Burgos et al., 2010).

Trypanosoma cruzi, cuenta con una gran cantidad de moléculas de superficie que le permiten entrar en contacto con las células del mamífero y llevar a cabo el proceso

de infección. Las moléculas de la membrana son las que inician los eventos de señalización entre el parásito y el hospedero, entre ellos las balsas lipídicas en la membrana del parásito que regulan la fluidez de la membrana favoreciendo la invasión de las células del mamífero (Teixeira et al., 2011).

Las transialidasas de *T. cruzi* son moléculas importantes en su desarrollo, pues pueden estar relacionadas con los procesos de invasión de las células del hospedero protegiendo al parásito de la respuesta inmune de éste; estas enzimas están ancladas a su membrana plasmática y transfieren sialoglucoconjugados del hospedero a los glicoconjugados β -galactosa terminales del parásito (Frasch, 2000).

Por otro lado, las mucinas son un grupo de glicoproteínas de superficie de *T. cruzi*, los residuos de azúcar de dichas moléculas interactúan con las células de los mamíferos y del vector, cuya función puede ser brindar protección al parásito contra los mecanismos de defensa del vector o del hospedero o bien, asegurar la invasión de células o tejidos específicos (de Souza et al., 2010; Osorio et al., 2012).

Las glicoproteínas gp82, gp35 y gp50 son moléculas que se expresan en la superficie de los tripomastigotes metacíclicos y están relacionadas en la invasión del parásito por medio de la inducción del aumento de calcio intracelular tanto en el parásito como en el hospedero. Se ha determinado que gp82 está relacionada principalmente en el mecanismo de invasión de células en aislados altamente invasivos de *T. cruzi*, mientras gp35 y gp50 son responsables de dicha invasión en aislados de baja invasión (Yoshida, 2006; Maeda et al., 2012).

La Gp90 es una glicoproteína de superficie que está presente en los tripomastigotes metacíclicos de *T. cruzi* y actúa como regulador negativo de la invasión celular ya que no desencadena la señalización de calcio, aunque se sabe que puede presentar actividad glicosidasa y antifagocítica (Yoshida, 2006; de Souza et al., 2010).

Algunas otras proteínas implicadas en la interacción del parásito a las células de mamífero son gp83 que se ha visto relacionada con la activación de la proteína cinasa C (PKC) de los macrófagos; penetrina, que es una molécula con afinidad a la matriz celular y promueve la adhesión de fibroblastos y penetración del parásito;

cruzipaina, una endoproteasa presente en los 4 principales estadios del parásito que participa en el proceso de invasión de las células del mamífero, en el escape del sistema inmune del hospedero y está relacionada con el proceso de nutrición del parásito durante su diferenciación en el intestino del vector; oligopeptidasa B, una serin-endoproteasa que participa en el aumento del tránsito de calcio en las células del hospedero y Tc80, una colagenasa que está relacionada con la degradación de la matriz extracelular del tejido del hospedero, facilitando su invasión (Ortega & Pereira, 1991; Yoshida, 2006; Caradonna & Burleigh, 2011; Alvarez et al., 2012).

3.3 Vectores.

Los vectores de *Trypanosoma cruzi*, son insectos hematófagos que pertenecen al phylum Arthropoda, subphylum Hexapoda, orden Hemiptera, familia Reduviidae y subfamilia Triatominae (Figura 5). Tienen adaptaciones morfológicas asociadas a la búsqueda de huéspedes y alimentación de sangre tales como piezas bucales adaptadas para perforar o lacerar tejidos (Schofield, 2009; Rassi A Jr, 2012) .

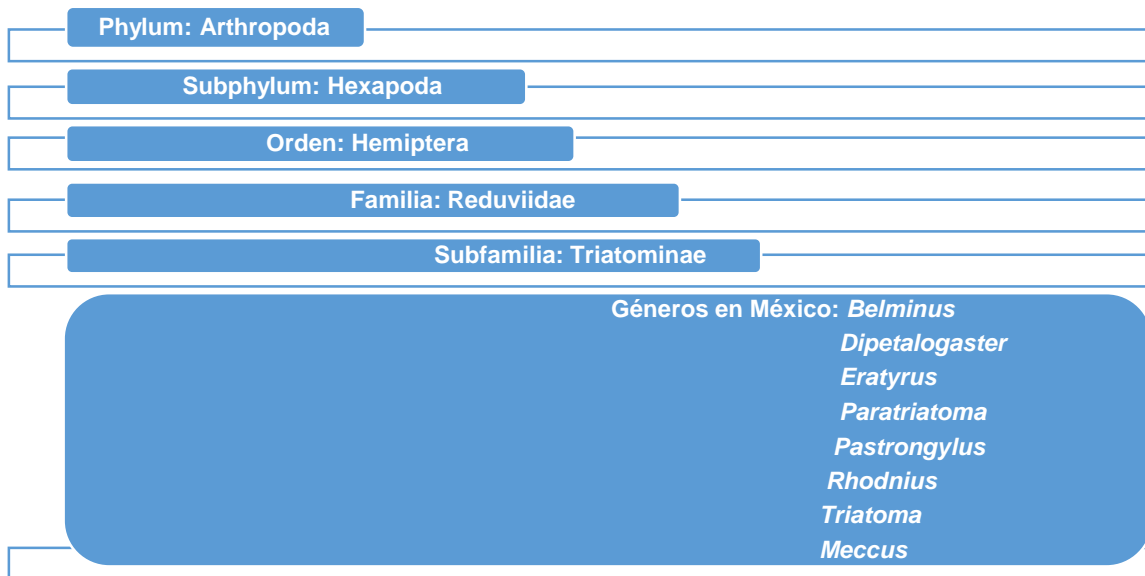


Figura 5. Clasificación taxonómica de los vectores de *Trypanosoma cruzi* (Rassi et al., 2012).

La subfamilia *Triatominae* está integrada por 5 tribus y 15 géneros; se conocen 140 especies y todas son capaces de transmitir *T. cruzi*, sin embargo debido a sus hábitos alimenticios, distribución geográfica y hábitat, pocas tienen importancia en la transmisión a humanos. Aproximadamente 125 especies de esta familia se encuentran únicamente en América entre 42° de latitud al norte de Estados Unidos y 42° al sur de Argentina, además logran sobrevivir en condiciones de humedad entre 30-60% y temperaturas entre 24-28°C (Lehane, 2005; Jurberg & Galvao, 2006; Teixeira et al., 2006; Schofield & Galvao, 2009).

Los triatominos tienen una cabeza alargada con dos ojos prominentes y un par de antenas segmentadas además de una probóscide tri-segmentada debajo de la cabeza y un pronoto con forma triangular. La parte proximal de las alas anteriores

es relativamente dura y rígida, se conduce a la parte distal membranosa. Son insectos hemimetábolos con 5 estadios ninfales y un estadio adulto y todos son capaces de transmitir *T. cruzi* (Lehane, 2005; Castillo & Wolff, 2000; Rassi & Marin, 2010).

Los adultos se diferencian de las ninfas por la presencia de ocelos y el desarrollo completo de los genitales externos y las alas. Las hembras tienen un ápice abdominal truncado y los machos tienen el ápice abdominal redondeado, además, las hembras tienden a ser más grandes que los machos (Jurberg & Galvao, 2006).

La cantidad de sangre que ingieren está relacionada con el estadio de desarrollo y se sabe que las ninfas de 4^o y 5^o estadio son las que se alimentan más. Estos insectos se alimentan principalmente durante la noche y pueden ingerir hasta 10 veces su propio peso en sangre, realizan una transferencia rápida de agua aumentando la secreción de líquidos a nivel intestinal, lo que incrementa su capacidad para transmitir a *T. cruzi* al defecar sobre el hospedero, volviendo más eficaces a los que defecan mientras se alimentan (Castillo & Wolff, 2000; Jurberg & Galvao, 2006).

En México existen 32 diferentes especies de vectores de *T. cruzi*, 19 pertenecen al género *Triatoma*, 6 al género *Meccus*, 2 al género *Panstrongylus* y 1 especie a los géneros: *Belminus*, *Dipetalogaster*, *Eratyrus*, *Paratiratoma* y *Rhodnius* (Galvão, 2003; Salazar et al., 2010).

En 1937, el Dr. Luis Mazzotti identificó a *Triatoma phyllosoma* como el primer vector infectado con *T. cruzi*. A lo largo del país se les conoce con diversos nombres coloquiales como chinche besucona, ahorcadoras, de árbol, de campo, de compostela, trompuda, voladora, de piedra, hociconas, palomitas, pulgones, entre otros (Salazar et al., 2005).

Los vectores de *T. cruzi* se dividen en intradomiciliados, peridomiciliados y silvestres; los dos primeros se consideran los de mayor importancia en la transmisión del parásito debido a su relación con las viviendas de los humanos. En México, de acuerdo a los reportes existen 13 especies de mayor importancia en la transmisión de *T. cruzi*, de las cuales dos especies son intradomiciliadas *Triatoma barberi* y *Triatoma dimidiata* y 11 especies peridomiciliadas. Dos especies ampliamente distribuidas en el país son *Meccus pallidipennis* (Figura 6A) y *Triatoma barberi* (Figura 6B) (Salazar et al., 2010).



Figura 6. Ejemplares adultos macho de **A)** *Meccus pallidipennis* y **B)** *Triatoma barberi*. Cortesía del Laboratorio de Biología de Parásitos, UNAM.

Meccus pallidipennis es una especie peridomiciliada, exclusiva de México, la cual fue clasificada como *Meccus pallidipennis* en 1872 por Stal. Los machos tienen dimensiones de 31-34 mm y las hembras de 32-35 mm y se encuentra entre 200 y 1,580 msn con mayor predominio en alturas entre 1500 y 1800 msn, se ha reportado en los estados de Colima, Estado de México, Guanajuato, Guerrero, Jalisco, Michoacán, Morelos, Nayarit, Oaxaca, Puebla, Querétaro, Veracruz y Zacatecas (Figura 7); es un vector que puede encontrarse durante la luz del día. Bajo condiciones de laboratorio se ha determinado que defecan después de 10-15 minutos de la ingestión de sangre (Lent & Wygodzinsky, 1979; Zarate & Zarate, 1985; Martínez & Novelo, 2004; Ramsey et al., 2005; Salazar et al., 2005 & 2010).

Triatoma barberi es una especie exclusiva de México, fue reportada en 1939 por Mazzotti como *Triatoma sp* y posteriormente se le nombró *Triatoma barberi* en el mismo año por Usinger. Las hembras miden aproximadamente 18.5 a 20 mm, mientras que los machos miden de 16 a 18 mm. Se encuentra a 2,400 metros sobre

el nivel del mar (msn) y se distribuye en México en Colima, Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Michoacán, Morelos, Oaxaca, Puebla, Querétaro, Tlaxcala, Veracruz (Figura 8). Es importante en la transmisión de *Trypanosoma cruzi* debido a su amplia distribución, ser una especie intradomiciliada con hábitos nocturnos, preferencia alimentaria de sangre de mamíferos y por defecar durante la ingestión de sangre. Se ha encontrado en fisuras de los muros al nivel de las camas, son atraídos por la luz artificial y tienen hábitos principalmente nocturnos. Se ha reportado que el índice de infección natural con *T. cruzi* de esta especie es de aproximadamente 70% (Lent & Wygodzinsky, 1979; Zarate & Zarate, 1985; Salazar et al., 2005 & 2010).

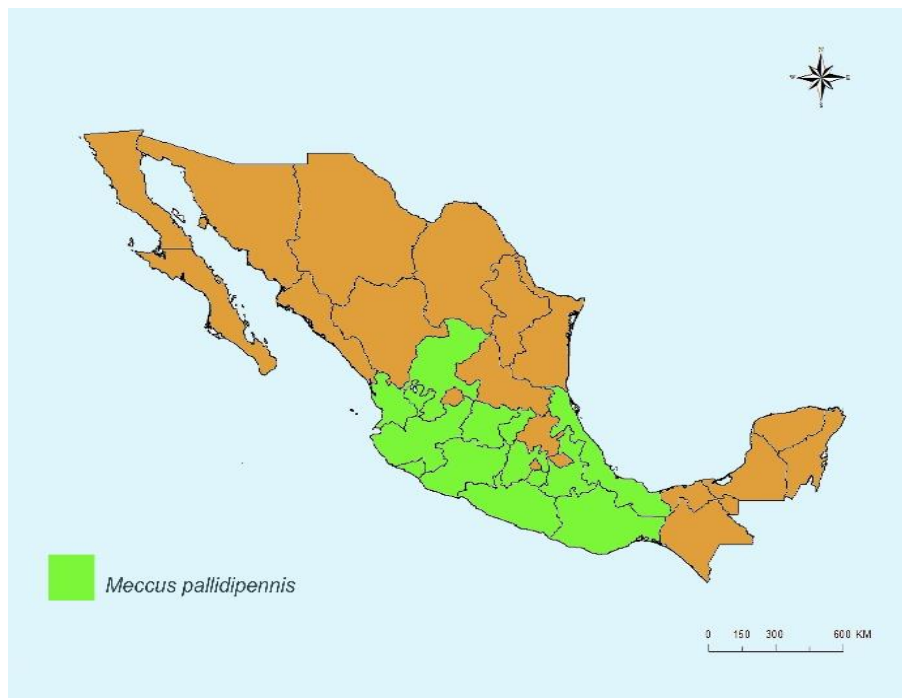


Figura 7. Distribución geográfica de *Meccus pallidipennis* en México. Esta especie de triatomino se encuentra distribuida en los estados de Colima, Guerrero, Jalisco, Estado de México, Michoacán, Morelos, Nayarit, Oaxaca, Puebla, Querétaro, Veracruz y Zacatecas. (Zarate & Zarate, 1985; Vidal & Ibáñez, 2000; Salazar et al., 2005 & 2010).

Noguera en 2000, comparó los patrones de defecación de diferentes especies de vectores de *T. cruzi* y concluyó que *Triatoma barberi* es un vector altamente eficiente en comparación con *M. pallidipennis*, debido a que presentó un menor tiempo de

latencia de defecación en comparación con este último. *Triatoma barberi* presenta mayores índices de infección que *Meccus pallidipennis* y los aislados de *T. cruzi* obtenidos de *T. barberi* presentan una virulencia elevada, esto último demostrado por la patología en modelo murino y en humanos (Tay et al., 1969; Noguera et al., 2000; Salazar et al., 2010).



Figura 8. Distribución geográfica de *Triatoma barberi* en México. Esta especie se encuentra distribuida en los estados de Colima, Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Michoacán, Morelos, Oaxaca, Puebla, Querétaro, Tlaxcala y Veracruz (Zarate & Zarate, 1985; Salazar et al., 2010).

3.3.1 Intestino de los triatominos.

El tracto digestivo de los triatominos está conformado por el intestino anterior (cardias, esófago) e intestino medio, que a su vez se constituye por el intestino medio anterior (estómago), el intestino medio posterior (intestino delgado) y recto (Figura 9) (Schaub et al., 2011).

El intestino está conformado por células epiteliales columnares en su porción anterior, y epiteliales cúbicas en la posterior, y células endocrinas localizadas en el intestino posterior. El intestino medio presenta microvellosidades apicales que están

cubiertas de membrana perimicrovellosa (MPM), mientras que las células del recto están cubiertas por una capa extracelular (Billingsley, 1990; Rocha et al, 2010; Schaub et al., 2011).

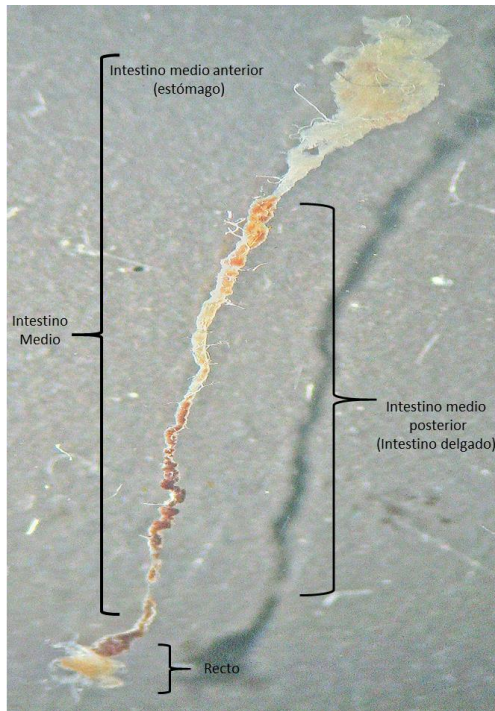


Figura 9. Tracto digestivo de *Triatoma barberi*.

El intestino de los insectos del orden *Hemiptera* posee una superficie celular apical de dos membranas trilaminares: membrana apical (interna) y membrana apical luminal (externa), separadas por una capa de alta densidad electrónica. La membrana apical luminal no está presente en insectos durante el ayuno, pero persiste por largos periodos después de la alimentación. Aún no se conoce el origen de estas membranas, pero se ha observado la presencia de lisosomas en las células del intestino de *Rhodnius prolixus* después de 2 horas de haber sido alimentado. Por otro lado, se ha identificado la presencia de gránulos PAS positivos en el epitelio intestinal de *Triatoma vitticeps* en diferentes condiciones de alimentación (Billingsley, 1988; Billingsley, 1990; Rocha et al., 2010).

Se ha descrito la presencia de la MPM que separa el lumen del intestino de las microvellosidades. Su origen preciso se desconoce, pero se ha propuesto que ésta

se origina en un sistema interno de vesículas de doble membrana. A pesar de que su composición exacta no se conoce, se ha observado en *R. prolixus* presencia de galactosa determinada con lectinas (Schaub et al., 1999; Silva et al., 2004).

3.3.2 Digestión.

El proceso de digestión se lleva a cabo a lo largo de todo el tracto intestinal. En la porción anterior del intestino de *Rhodnius prolixus* se ha descrito la presencia de un factor hemolítico y enzimas salivales que facilitan la digestión de la sangre ingerida por el insecto (Azambuja et al., 1983; Kollien & Schaub, 2000).

Al intestino medio se le atribuye una baja actividad de absorción y almacenamiento de nutrimentos debido a la ausencia de espacios extracelulares entre las membranas basales y por la baja presencia de vesículas de almacenamiento y gránulos de glucógeno. En esta porción se lleva a cabo la secreción de enzimas (proteasas digestivas) para la digestión (Billingsley, 1990; Rocha et al., 2010).

En el estómago la sangre se almacena y es ligeramente procesada por digestión de carbohidratos, procesamiento de lípidos y hemólisis, además se llevan a cabo los procesos de diuresis y transporte de iones. En el intestino medio anterior están presentes algunas enzimas como glucosidasas, lisozimas, fosfatasas ácidas y alcalinas, sialidasas y lipasas (Billingsley, 1990; Amino et al., 1995; Kollien et al., 1998; Canavoso et al., 2004; Schaub et al., 2011).

En el intestino medio posterior, se lleva a cabo la digestión, absorción y almacenamiento de nutrimentos, donde existe un mayor número de células endocrinas, que tienen vesículas secretorias en la región basal y liberan su contenido a la hemolinfa. En esta porción del intestino se ha descrito la presencia de glucosidasas, lisozimas, fosfatasas ácidas y alcalinas, catepsina B, L y D, aminopeptidasas, carboxipeptidasas y lipasas (Billingsley, 1990; Rocha, et al., 2010; Schaub et al., 2011).

En los triatomínos se han descrito microorganismos simbióticos en el lumen del intestino medio anterior, los que pueden proporcionar nutrimentos adicionales y que favorecen el desarrollo de las ninfas al estadio adulto (Lehane, 2005).

3.4 *Trypanosoma cruzi* en el transmisor.

Cuando el vector ingiere la sangre de un hospedero infectado, la almacena en el estómago, donde comienza a digerirse inmediatamente, algunos tripomastigotes sanguíneos son lisados y otros comienzan a diferenciarse en epimastigotes. Posteriormente, pasan a los túbulos de Malpighi e intestino medio posterior donde los epimastigotes se unen a la MPM por formación de glicoconjugados y se dividen por fisión binaria longitudinal (de Souza et al., 2010; Schaub et al., 2011).

Se ha descrito que alrededor de 1-2 semanas después, los epimastigotes en la superficie del epitelio rectal se diferencian en tripomastigotes metacíclicos, que son la forma infectante y son eliminados en las heces (Figura 10) (Schaub et al., 2011).

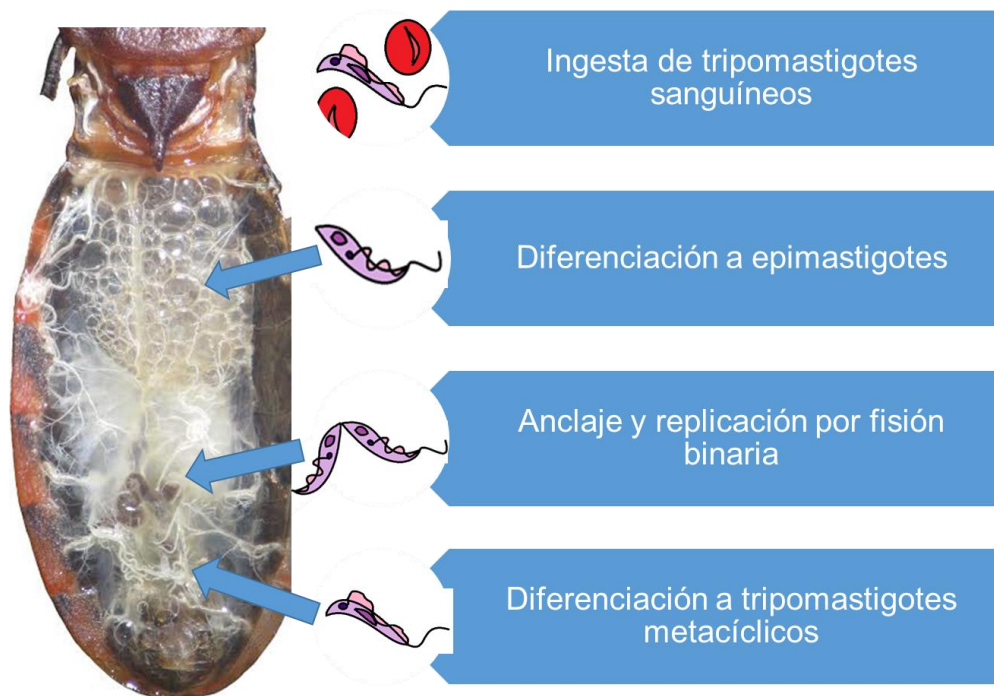


Figura 10. Desarrollo de *Trypanosoma cruzi* en el intestino del vector.

La forma de asociación del parásito al epitelio del tracto digestivo difiere en el intestino medio y posterior del transmisor. En el intestino medio posterior los epimastigotes están en contacto con la MPM y en el recto por interacciones hidrofóbicas o con lectinas (Kollien et al., 1998; Schaub et al., 2011).

En 1985, los resultados obtenidos por Lammel al pasar tres cepas de origen humano por *Triatoma infestans*, muestran que la virulencia es independiente del número de parásitos. Se ha observado que la virulencia de algunas cepas de *T. cruzi* se ve afectada cuando pasan por el intestino de diferentes vectores. Magalhães en 1996, observó que al infectar *Triatoma infestans* y *Panstrongylus megistus* con tres cepas de *T. cruzi* de origen humano, la virulencia del parásito se incrementó (Lammel et al., 1985; Perlowagora & Moreira, 1994; Magalhães et al., 1996).

García en 1984 reportó que las enzimas intestinales que favorecen la digestión en el insecto pueden afectar el desarrollo de *Trypanosoma cruzi*, el cual podría modificar sus características; por otro lado el parásito requiere de proteínas y metabolitos productos de la digestión para su desarrollo, lo que implica competencia entre el insecto vector y *T. cruzi* (García et al., 1984; Schaub et al., 2011).

3.5 Glicoproteínas.

Las glicoproteínas son el resultado de la unión covalente de grupos de carbohidratos a una cadena polipeptídica por medio de una modificación postraduccional en eucariontes llamada glicosilación. Dicho proceso generalmente se lleva a cabo en el Aparato de Golgi (AG) y en el retículo endoplásmico (RE), aunque algunas proteínas son glicosiladas en el citoplasma. La N-glicosilación se lleva a cabo en el RE y continúa en el AG, mientras que la O-glicosilación es exclusiva del AG. Las unidades de carbohidratos que se unen a las proteínas son llamados glicanos y generalmente son oligosacáridos en especial hexosas (manosa, galactosa, ácido siálico y L-fucosa) (Cole, 1989; Varki, 2009).

Los tipos de enlace entre la proteína y el glicano pueden ser del tipo N- u O-glicosídicos. Cuando un oligosacárido se une al nitrógeno de un residuo de Asparagina (Asn) se forma la N-glicosilación (Figura 11A) y por otra parte, la O-glicosilación se lleva a cabo cuando un oligosacárido se une al OH de un residuo de Serina (Ser) o Treonina (Thr) (Figura 11B) (Varki et al., 2009).

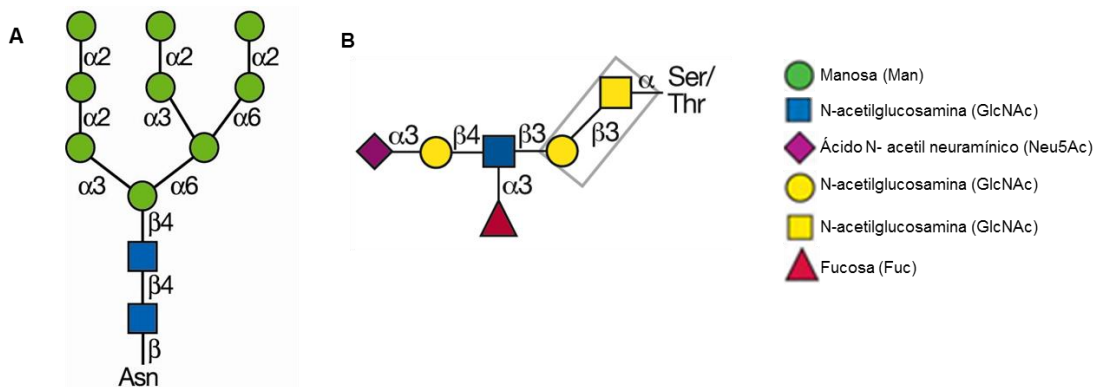


Figura 11. Ejemplos de glicoproteínas. **A)** N-glicano. **B)** O-glicano (Modificado de Varki et al., 2009).

Las funciones que pueden tener las glicoproteínas en los organismos son diversas en los eventos específicos de reconocimiento (protección contra proteasas, mantenimiento de la solubilidad, conformación de proteínas, funciones hormonales y de barrera) dando como resultado la modulación de procesos biológicos; como cuando la glicosilación de algunos receptores cambian su afinidad a los ligandos y

la glicosilación de algunos ligandos cambia su afinidad al receptor (Varki, 1993; Rehm, 2006).

3.5.1 Glicoproteínas en los insectos vectores.

Se ha determinado que los artrópodos tienen N-glicanos del tipo alto en manosa y O-glicanos en proteínas de superficie, intracelulares y de secreción (Varki et al., 2009).

Con anterioridad se ha propuesto la unión de *Trypanosoma cruzi* a glicoproteínas del intestino de los vectores para iniciar la diferenciación en tripomastigotes metacíclicos; en estudios realizados en *Rhodnius prolixus* han determinado la presencia de residuos de N-acetilglucosamina, N-acetilgalactosamina en componentes de la MPM y la presencia de N-acetilglucosamina en el intestino del mismo vector por medio de histoquímica (Alves et al., 2007; Albuquerque et al., 2009).

En otros transmisores de enfermedades como *Anopheles stephensi* transmisor de *Plasmodium* sp., se ha observado la presencia de glicoproteínas en el intestino que pueden participar como receptores para la unión del oocineto de *Plasmodium* sp. al intestino del mosquito. En *Aedes aegypti* se observó la presencia de N-acetilgalactosamina mediante histoquímica de lectinas, en condiciones de laboratorio (Zieler et al., 2000; Wilkins & Billingsley, 2001).

Dinglasan en 2005, con el uso del anticuerpo monoclonal MG96 bloqueó residuos de α -D-manosa en el intestino de diferentes especies de vectores, entre ellos *M. pallidipennis*, que presentó reconocimiento de diferentes glicoproteínas. Por otro lado, Gonzalez en 2006, realizó un estudio con suero anti MPM y anti tejido intestinal de *Rhodnius prolixus* demostrando la disminución del índice de infección por *Trypanosoma cruzi* en insectos adultos y de 5º estadio (Dinglasan et al., 2005; Gonzalez et al., 2006).

4 Justificación.

En México existe una amplia variedad de especies de transmisores de *Trypanosoma cruzi* distribuidos a lo largo del territorio nacional. *Meccus pallidipennis* y *Triatoma barberi*, son dos especies que representan un riesgo para la población debido a su contacto cercano con los seres humanos. En las cepas de *Trypanosoma cruzi* aisladas de *M. pallidipennis* y *T. barberi* se han presentado diferencias en la virulencia y patogenia.

Una parte importante del ciclo biológico de *T. cruzi* ocurre dentro del tracto digestivo de los triatominos, pasando de la forma de tripomastigote sanguíneo a la forma replicativa (epimastigote) y posteriormente a la forma infectante (tripomastigote metacíclico). Este proceso de replicación y diferenciación se lleva a cabo en diferentes porciones del tracto digestivo del insecto e implica interacciones en las que pueden estar involucradas las estructuras histológicas y moléculas del tracto digestivo.

Las principales moléculas de superficie y de secreción presentes en el tracto digestivo de los triatominos son glicoproteínas que participan en eventos de reconocimiento (celular y molecular), y por lo tanto pueden afectar o modular procesos biológicos que influyen en la replicación y diferenciación de *T. cruzi*.

El propósito de este estudio es describir y comparar las características histológicas, y perfiles de proteínas y glicoproteínas del intestino medio y posterior de *M. pallidipennis* y *Triatoma barberi* para conocer las estructuras y moléculas que podrían estar implicadas en el desarrollo de la virulencia de las cepas de *T. cruzi* en transmisores infectados y que serían candidatas para estudios futuros.

5 Hipótesis y Objetivos.

5.1 Hipótesis.

Se han observado diferencias en la virulencia de cepas de *T. cruzi* aisladas de diferentes transmisores, y si la multiplicación y diferenciación del parásito ocurre en el intestino del vector, entonces existen diferencias en la morfología, proteínas y glicoproteínas del intestino de *M. pallidipennis* y *T. barberi*.

5.2 Objetivo general.

Comparar la morfología, proteínas y glicoproteínas del intestino medio y posterior de hembras y machos de *Meccus pallidipennis* y *Triatoma barberi*, en ayuno y 10 días postalimentación.

5.3 Objetivos específicos.

- Observar diferencias macroscópicas y microscópicas de las porciones del intestino con microscopia de luz.
- Conocer el patrón proteico del intestino mediante SDS-PAGE.
- Observar la afinidad de las lectinas WGA, PNA y, MAA en el patrón proteico mediante Western blot.

6 Metodología.

Los experimentos se realizaron en dos etapas:

Primera etapa. Características histológicas del intestino medio y posterior en diferentes periodos de alimentación (Figura 12), se utilizaron 8 ejemplares adultos (2 hembras y 2 machos por especie), se realizó el análisis histológico de los intestinos de ambas especies en ayuno de 7 días después de la muda a adulto y a 10 días postalimentación (dpa).

Segunda etapa. Determinación de proteínas y glicoproteínas (Figura 13) se realizaron pruebas (por triplicado) para determinar la concentración de proteínas totales, patrón electroforético e identificación de glicoproteínas en el intestino medio y posterior de machos y hembras de *M. pallidipennis* y *T. barberi*.

6.1 Insectos.

Se utilizaron triatominos de las especies *Meccus pallidipennis* y *Triatoma barberi* provenientes de las colonias del laboratorio de Biología de Parásitos del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina de la UNAM. Se seleccionaron ninfas de 5^o estadio y se mantuvieron en observación hasta la realización de la muda al estadio adulto, se separaron lotes para llevar a cabo condiciones de alimentación planteadas en el estudio.

6.2 Alimentación.

Los ejemplares fueron separados en dos lotes; un lote de insectos se mantuvo en ayuno de 7 días después de la muda al estadio de adulto, el otro lote se alimentó sobre ratones CD-1 hembras de 35-40 gramos durante 30 minutos en oscuridad para evitar estímulos externos que exciten a los ratones y a los insectos. Los ratones utilizados para la alimentación fueron manejados de acuerdo a la NOM-062-ZOO-1999.

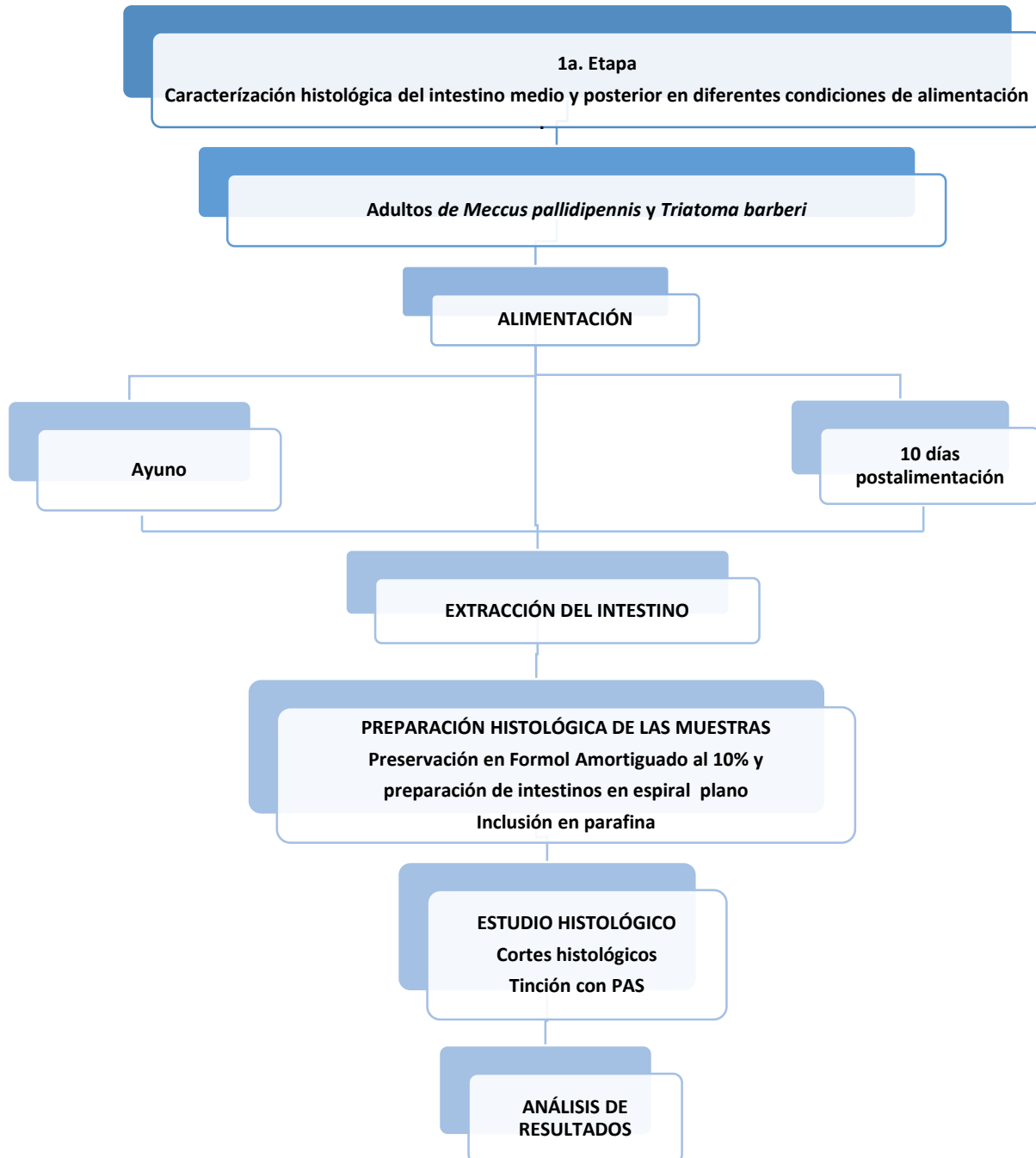


Figura 12. Caracterización histológica del intestino medio y posterior en diferentes condiciones de alimentación.

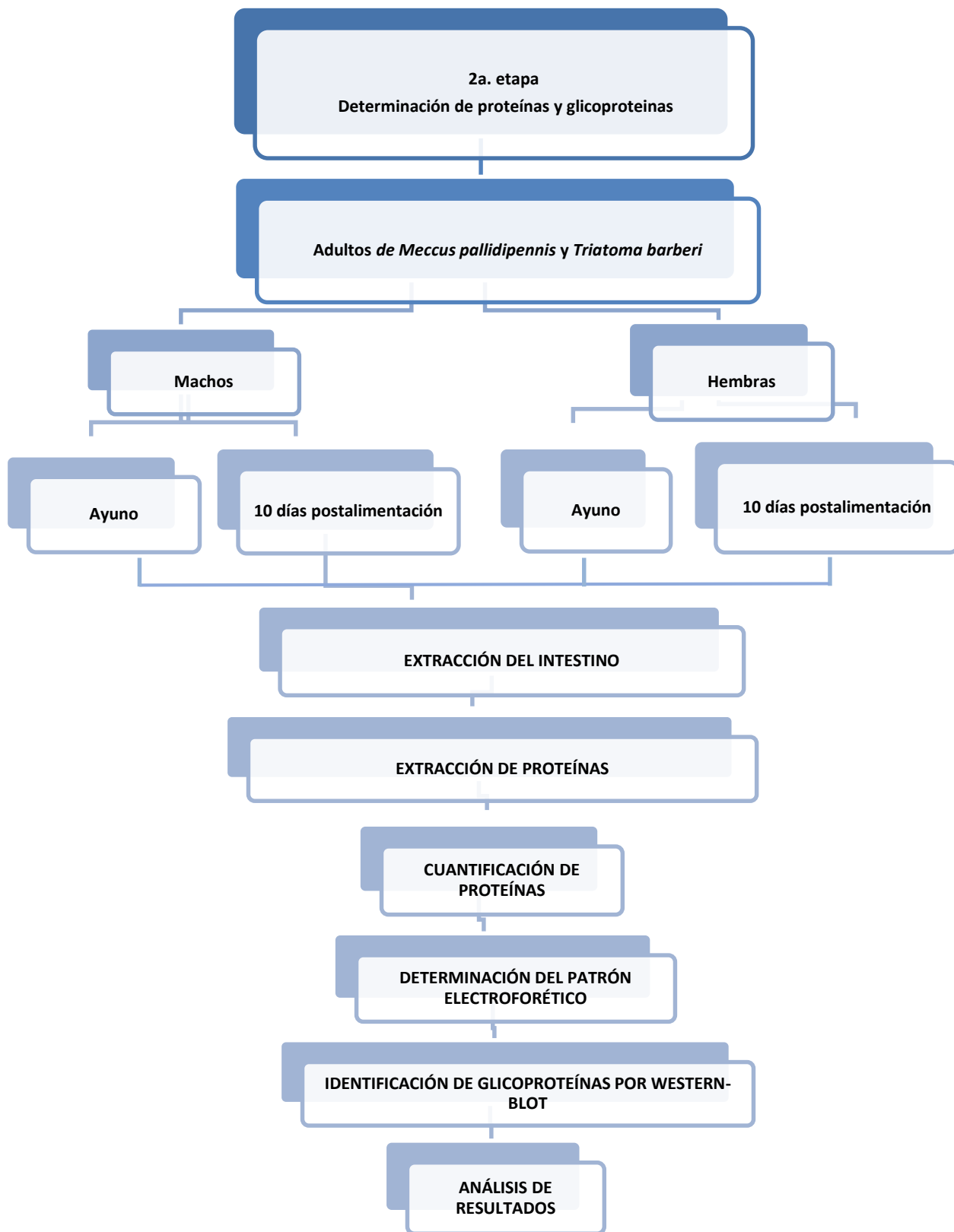


Figura 13. Segunda etapa. Determinación de proteínas y glicoproteínas.

6.3 Extracción del intestino.

Se fijó el ejemplar y se abrió el conxivo del insecto para exponer la cavidad abdominal (Figura 14). Observando al microscopio estereoscópico y en baño frío, se retiró el tejido conectivo, túbulos de Malpighi y gónadas; se extrajo el intestino y se colocó en una caja Petri con PBS IX pH 7.2.

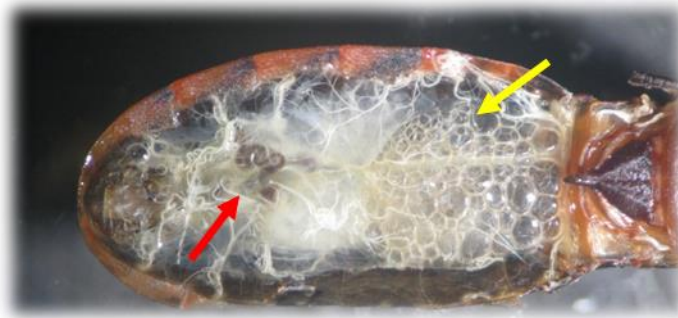


Figura 14. *Triatoma barberi* hembra con 10 dpa. Flecha amarilla: Intestino medio. Flecha roja: Intestino posterior.

6.4 Preparación histológica de las muestras.

Para el estudio histológico se utilizaron los intestinos de 4 ejemplares adultos por especie (2 hembras y 2 machos). El intestino extraído se colocó en formol amortiguado (100 ml de formol al 40%, 900 ml de agua destilada, 4 g de fosfato de sodio monobásico monohidratado, 6.5 g de fosfato de sodio dibásico anhidro) y con ayuda de un hisopo se enrolló formando un espiral plano para que al centro de éste se ubicara el estómago y en la parte externa el intestino posterior. Los intestinos así enrollados se incluyeron en parafina (Ross, 2008).

6.5 Estudio histológico.

Se realizaron los cortes histológicos en micrótopo Leica^{RM} 2025. Las preparaciones se tiñeron con Ácido Peryódico de Schiff (PAS) (Ross, 2008).

6.6 Descripción de morfología histológica.

La observación y registro fotográfico de las imágenes se realizaron en microscopio Leica DM2000 LED. Para el análisis de las microfotografías, el intestino se dividió con base a su anatomía en intestino medio (anterior y posterior) e intestino posterior.

6.7 Preparación de muestras para determinación de proteínas y glicoproteínas.

Mediante la técnica previamente descrita se extrajeron los intestinos de 8 ejemplares adultos de *Meccus pallidipennis* 4 en ayuno y 4 con 10 días postalimentación (2 machos y 2 hembras por cada condición de alimentación) y 12 ejemplares adultos de *Triatoma barberi* 6 en ayuno y 6 con 10 días postalimentación (3 machos y 3 hembras por cada condición de alimentación), se realizó disección para separar el intestino medio y el intestino posterior; se formaron dos grupos:

Grupo 1: mezcla de porciones del intestino medio, de la misma especie, sexo y condiciones de alimentación.

Grupo 2: mezcla de porciones del intestino posterior, de la misma especie, sexo y condiciones de alimentación.

Cada mezcla se colocó en un tubo Eppendorf, ambos con PBS pH 7.2 e inhibidores de proteasas (Complete mini Roche ®) en concentración 50µl/ml y se mantuvieron en baño frío. Se realizaron 3 lavados de la muestra a 4°C en centrifuga refrigerada (BECKMAN COULTER Allegra™ 64R) a 14,000 rpm durante 30 segundos. Este ensayo se realizó por triplicado.

6.8 Extracción de proteínas.

Las muestras sonicaron con un procesador ultrasónico (Vibra Cell VC50); se aplicaron 5 pulsos de 1 segundo a 60 W/25 KHz en baño frío (hielo/etanol). Se centrifugó a 14, 000 rpm por 10 min a 4°C en centrifuga refrigerada (BECKMAN COULTER Allegra™ 64R), al finalizar se separó el sobrenadante y se conservó en tubos de 1.5 ml a -40°C hasta su empleo.

6.9 Cuantificación de proteínas.

La cuantificación de proteínas totales se realizó por el método del ácido bicinonínico con un reactivo comercial (Pierce ® BCA Protein Assay Kit, Thermo Scientific). Las reacciones se realizaron en placas de poliestireno de 96 pozos con fondo plano (Costar). Para las determinaciones, se construyó una curva patrón con

albúmina sérica bovina con rango entre 25 y 1000 $\mu\text{g/ml}$; las muestras se midieron concentradas y en diluciones 1:2 y 1:3 (PBS IX pH 7.2), se determinó la densidad óptica (DO) en un espectrofotómetro para microplacas con filtro de 580 nm (Microplate reader Bio Rad * modelo 550). Se graficaron los resultados (DO) de la curva patrón, se obtuvo la regresión lineal y se calculó la concentración de la muestra con la ecuación de la recta ($y=mx+b$).

6.10 Determinación del patrón electroforético.

El patrón electroforético y el peso molecular de los componentes de los extractos de intestino medio y posterior se realizó en condiciones reductoras por electroforesis en geles discontinuos de poli(acrilamida), en presencia de dodecil-sulfato de sodio (SDS-10%). Se prepararon los geles separadores con acrilamida / bisacrilamida (30% / 0.8%) en concentración de 12.5%, amortiguador Tris 1.5 M (Tris [hidroximetil] aminometano) (Bio-Rad) pH 8.8, H₂O destilada, SDS (Sigma) al 10%, persulfato de amonio (Bio-Rad) al 10% y como catalizador Tetrametilendiamina TEMED (Bio-Rad). Para la preparación de la muestra se utilizó el amortiguador de muestra con β -mercaptoetanol en una relación 4:1 sometiéndose a ebullición en baño maría durante 10 min. El marcador de peso molecular empleado, consistió de 10 proteínas con pesos entre 10 y 250 kDa (Precision Plus Protein, Bio-Rad). Se colocaron la cantidad de muestra necesaria para tener 12 μg de proteína en cada pozo y se utilizó un amortiguador de corrida constituido por Trizma base 0.025 M (Bio-Rad), glicina 0.192 M (Sigma) y SDS al 0.1%, pH 8.3. La electroforesis se llevó a cabo con una diferencia de potencial constante de 120V/ \approx 1.5 h en un equipo Mini-Protean II Electrophoresis Cell (Bio-Rad). Al finalizar, los geles fueron fijados en una solución de metanol, agua, ácido acético en proporción de 5:4:1, y se tiñeron con azul de Coomassie G-250 (Bio-Rad) para la determinación de los pesos moleculares de los componentes

Debido a que el laboratorio no cuenta con un equipo fotodocumentador de geles, para el análisis de resultados se utilizó una escala de color que permitió comparar la intensidad de tinción de los componentes en el gel y así evaluar la relevancia de estos (Tabla 1).

Tabla 1. Escala de colores para la intensidad de señal en SDS-PAGE.

Escala	Intensidad del componente
	+
	++
	+++
	++++

6.11 Identificación de glicoproteínas.

Para identificar las glicoproteínas presentes en el intestino de ambas especies mediante Western-blot, se utilizaron lectinas conjugadas con peroxidasa (Sigma-Aldrich) de unión específica a distintos residuos de carbohidratos (*WGA-Triticum vulgare*, *PNA-Arachis hypogaea* y *MAA-Mackia amurensis*)(Tabla 2).

Después de transferir los geles a membranas de nitrocelulosa (Amersham™ Hybond ECL) a 15 Volts durante 30 minutos en el equipo Trans Blot Turbo de Bio Rad; las membranas se bloquearon con PBS 1X pH 7.2 -Tween 20 al 0.05% durante 1 hora a temperatura ambiente bajo agitación orbital. Se incubaron por 1 hora a 37°C con lectinas marcadas con peroxidasa a una concentración de 2.5 µg/ml en PBS 1X pH 7.2 -Tween 20 al 0.05% con CaCl₂, MgCl₂, MnCl₂ 1 mM. Se lavaron durante 10 minutos con 5 cambios de solución de bloqueo. Se revelaron con 3'3'-diaminobencidina (DAB) en PBS 1X pH 7.2 (1:2) y peróxido de hidrógeno al 30% (1:2) para la determinación de los pesos moleculares de los componentes. Para el análisis de resultados se utilizó una escala de color que permitió comparar la intensidad de tinción de los componentes en la membrana y así evaluar su relevancia (Tabla 3).

Tabla 2. Lectinas utilizadas para el reconocimiento de carbohidratos.

Lectina	Carbohidrato que reconoce
WGA (Aglutinina de germen de trigo)	α -D-GlcNAc N,N',N''-triacetilquitotriosa
PNA (Aglutinina de cacahuate)	β -gal(1-3)-GalNAc
MAA (Aglutinina de Maackia Amurensis)	NeuAc- α -2,3

Tabla 3. Escala de color para indicar la intensidad de los componentes reconocidos por lectinas en Western blot.

Escala	Intensidad del componente
	+
	++
	+++
	++++

7 Resultados.

7.1 Características histológicas del intestino medio y posterior en diferentes condiciones de alimentación.

7.1.1 *Meccus pallidipennis*, macho en ayuno y 10 días postalimentación.

En el ejemplar sin alimentar, el intestino medio anterior presentó un epitelio cilíndrico pseudoestratificado de 80 μm de alto con invaginaciones en diferentes profundidades, que pueden alcanzar a las células basales. Las células presentaron granulación gruesa PAS positiva principalmente en el extremo apical globoso. Fue notable la presencia de un material PAS positivo que correspondería a la MPM, cubriendo las microvellosidades (Figura 15A). A los 10 dpa el intestino medio anterior presentó epitelio cilíndrico pseudoestratificado de aproximadamente 85 μm de altura con gránulos PAS positivos en todo el citoplasma y algunos de coloración azul pero más finos. La secreción PAS positiva, se observó más abundante que en la muestra en ayuno (Figura 15B).

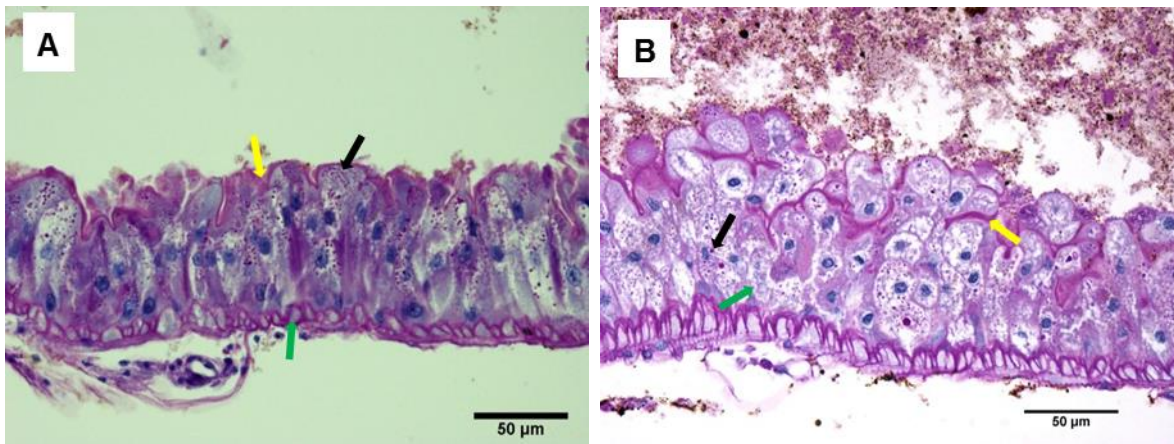


Figura 15. Fotomicrografías del intestino medio anterior de *Meccus pallidipennis* macho. **A)** Epitelio intestinal de ejemplar en ayuno (40x). Flecha amarilla: gránulos PAS positivos; flecha negra: secreción PAS positiva; flecha verde: células mioepiteliales. **B)** Epitelio intestinal de ejemplar a los 10 días postalimentación (40x). Flecha negra: granulación PAS positiva; flecha amarilla: secreción PAS positiva; flecha verde: granulación fina de coloración azul.

En el intestino medio posterior del ejemplar sin alimentar, el epitelio es cilíndrico pseudoestratificado de aproximadamente 50 μm de alto. A diferencia del intestino

anterior, el epitelio no cuenta con gránulos citoplasmáticos PAS positivos, las invaginaciones y la MPM son escasas (Figura 16A). Por otra parte, a 10 dpa el epitelio del intestino medio posterior es cilíndrico pseudoestratificado de aproximadamente 77 μm de altura con liberación de citoplasma al lumen (secreción apocrina) e invaginaciones menos marcadas que en el intestino medio anterior. El citoplasma presentó gránulos de tamaño heterogéneo principalmente PAS positivos aunque se observan algunos de coloración azul. Las microvellosidades están cubiertas por una secreción PAS positiva abundante (Figura 16B).

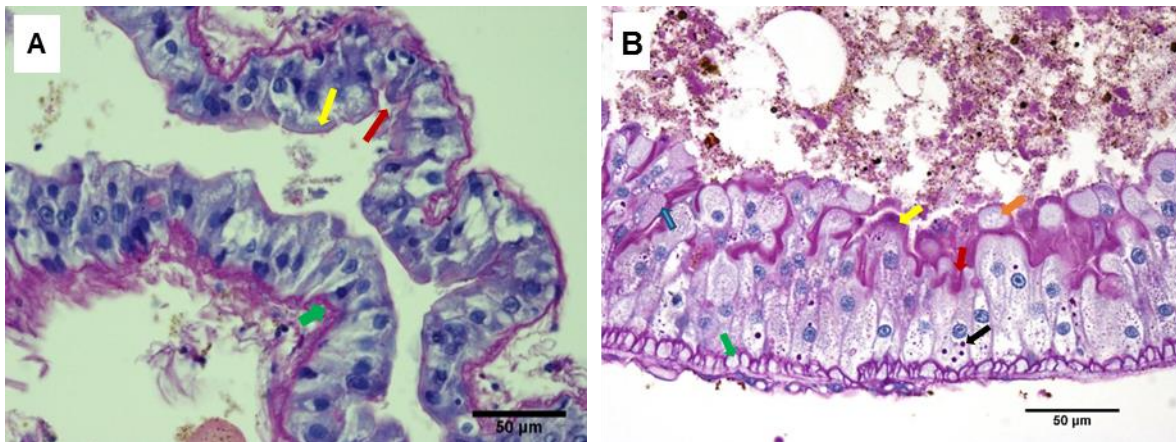


Figura 16. Fotomicrografías del intestino medio posterior de *Meccus pallidipennis* macho. **A)** Epitelio intestinal de ejemplar en ayuno (40x). Flecha amarilla: microvellosidades; flecha roja: invaginaciones epiteliales; flecha verde: células mioepiteliales. **B)** Epitelio intestinal de ejemplar a los 10 días postalimentación (40x). Flecha anaranjada: liberación de citoplasma; flecha amarilla: microvellosidades y MPM PAS positivas; flecha roja: invaginaciones epiteliales; flecha negra: gránulos PAS positivos; flecha azul: gránulos de coloración azul; flecha verde: células mioepiteliales.

En el ejemplar en ayuno, el epitelio del intestino posterior es cúbico de altura heterogénea (25 μm en promedio), pseudoestratificado con muy escasas invaginaciones en comparación con las dos secciones del intestino medio. Al igual que el intestino medio posterior, no se presentan gránulos PAS positivos y el glicocálix y la MPM PAS positivos son muy delgados. Hay presencia de resto celular en el lumen intestinal (Figura 17A). A los 10 dpa el intestino posterior posee epitelio plano simple, con células grandes y 25 μm de altura. Al contrario del ejemplar en ayuno, las células no tienen citoplasma claro pero tampoco poseen gránulos y hay escasa secreción PAS positiva. (Figura 17B).

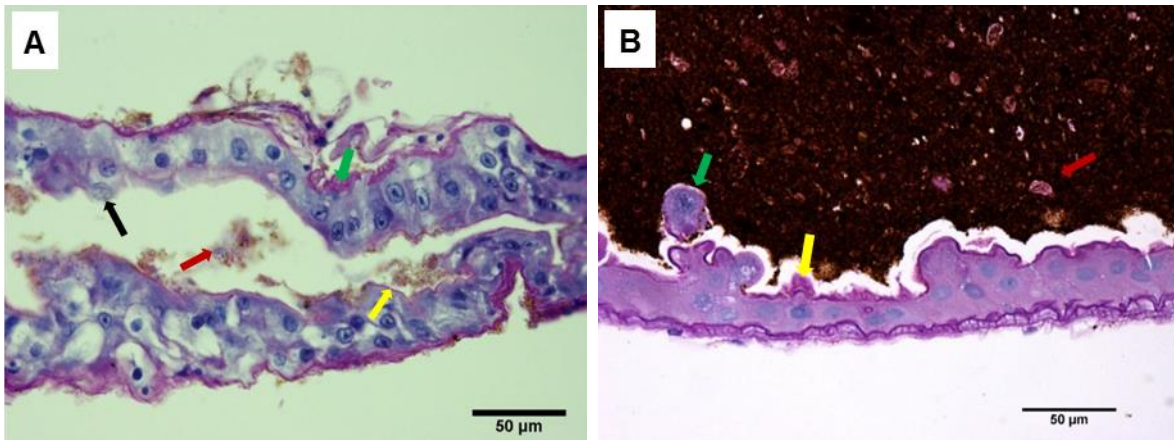


Figura 17. Fotomicrográficas del intestino posterior de *Meccus pallidipennis* macho. **A)** Epitelio intestinal de ejemplar en ayuno (40x). Flecha negra: descamación celular; flecha amarilla: MPM y glicocálix PAS positivos y delgados; flecha roja: resto celular; flecha verde: células mioepiteliales. **B)** Epitelio intestinal de ejemplar a los 10 días postalimentación (40x). Flecha verde: descamación celular; flecha roja: alimento en el lumen; flecha amarilla: secreción PAS positiva.

7.1.2 *Meccus pallidipennis*, hembra en ayuno y 10 días postalimentación.

El intestino medio anterior del ejemplar en ayuno presentó epitelio cilíndrico pseudoestratificado de 50 µm de altura, en una porción gástrica se observó diferente epitelio en las dos paredes. Una de las paredes presentó células delgadas y largas con cúmulos de granos finos principalmente en la parte apical adosados a la membrana citoplasmática, además la superficie presenta invaginaciones profundas con abundante cantidad de MPM PAS positiva. La pared intestinal del lado opuesto presentó un epitelio con células más anchas y con menor cantidad de gránulos citoplasmáticos PAS positivos. En esta porción del intestino se encontraron células fusiformes PAS positivas (Figura 18A). A los 10 días postalimentación el intestino medio anterior presenta epitelio cilíndrico pseudoestratificado de aproximadamente 115 µm de grosor con invaginaciones de diferente profundidad. Hay presencia de gránulos PAS positivos de tamaño heterogéneo, de los cuales, los más gruesos aparentemente se secretan hacia las invaginaciones que están cubiertas por MPM PAS positiva. En la superficie del epitelio casi no se observaron microvellosidades (Figuras 18B).

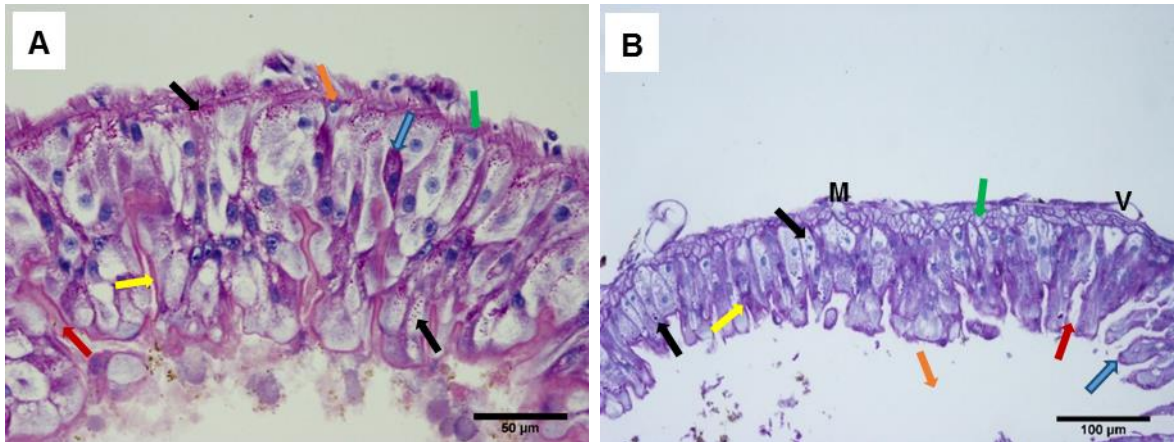


Figura 18. Fotomicrografías del intestino medio anterior de *Meccus pallidipennis* hembra. **A)** Epitelio intestinal de ejemplar en ayuno (40x). Flecha negra: granulación PAS positiva; flecha roja: invaginaciones del epitelio; flecha amarilla: microvellosidades y MPM PAS positivas; flecha verde: células mioepiteliales; flecha anaranjada: células basales; flecha azul: células fusiformes. **B)** Epitelio intestinal de ejemplar a los 10 días postalimentación (10x). Flecha roja: invaginaciones del epitelio; flecha negra: granulación PAS positiva; flecha amarilla: glicocálix y MPM PAS positivos; flecha anaranjada: descamación celular; flecha azul: extremo apical débilmente PAS positivo; flecha verde: células mioepiteliales; M: fibras musculares; V: vasos hemolinfáticos.

En ayuno, el epitelio del intestino medio posterior tiene un grosor de 100 μm aproximadamente, con invaginaciones de diferente profundidad. Se observan abundantes gránulos finos PAS positivos en el extremo apical de las células, y se observan las microvellosidades y MPM con intensa tinción PAS positiva. En el extremo basal se pueden observar algunos pliegues PAS positivos (Figura 19A). A los 10 dpa el epitelio del intestino medio posterior es cilíndrico pseudoestratificado de 75 μm de altura con invaginaciones de diferente profundidad. En la superficie adluminal las células poseen MPM PAS positiva, principalmente en las invaginaciones del epitelio. Las células presentan gránulos citoplasmáticos PAS positivos supranucleares de tamaño homogéneo (Figura 19B).

Con respecto al intestino posterior de la hembra en ayuno de *M. pallidipennis* debido a dificultades técnicas (enrollamiento inadecuado del intestino) no se observó esta porción del intestino.

El intestino posterior a los 10 dpa, está conformado por células cúbicas y cilíndricas de aproximadamente 50 μm de altura con invaginaciones poco profundas; algunas células presentan granulación ligera PAS positiva supranuclear. La MPM aumenta

en la superficie de las invaginaciones y es menos evidente que en las dos porciones del intestino medio (Figura 20).

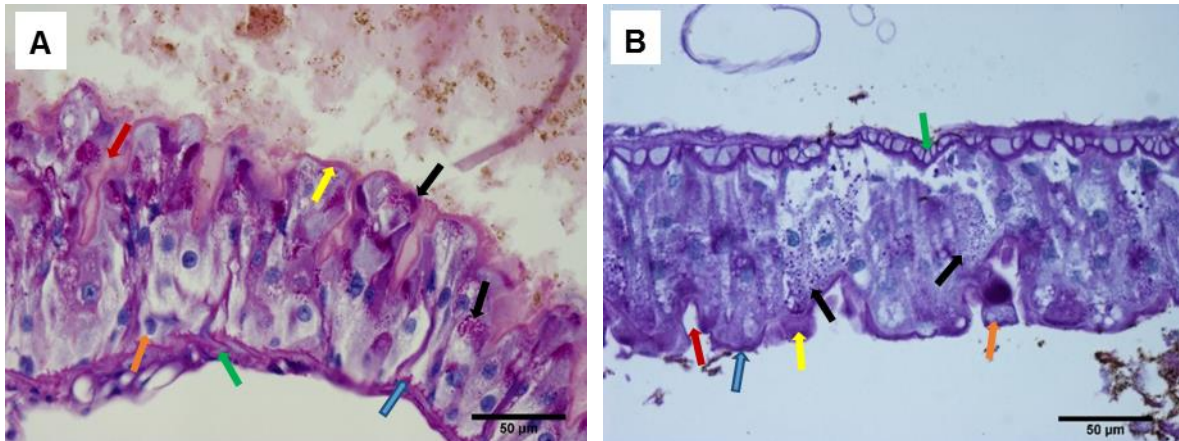


Figura 19. Fotomicrografías del intestino medio posterior de *Meccus pallidipennis* hembra. **A)** Epitelio intestinal de ejemplar en ayuno (40x). Flecha roja: invaginaciones del epitelio; flecha amarilla: MPM y microvellosidades PAS positivas; flecha negra: granulación fina PAS positiva; flecha azul: pliegues del epitelio basal PAS positivos; flecha anaranjada: células basales; flecha verde: células mioepiteliales. **B)** Epitelio intestinal de ejemplar a los 10 días postalimentación (40x). Flecha roja: invaginaciones del epitelio; flecha azul: microvellosidades PAS positivas; flecha amarilla: MPM PAS positiva; flecha negra: granulación PAS positiva; flecha anaranjada: descamación celular; flecha verde: células mioepiteliales.

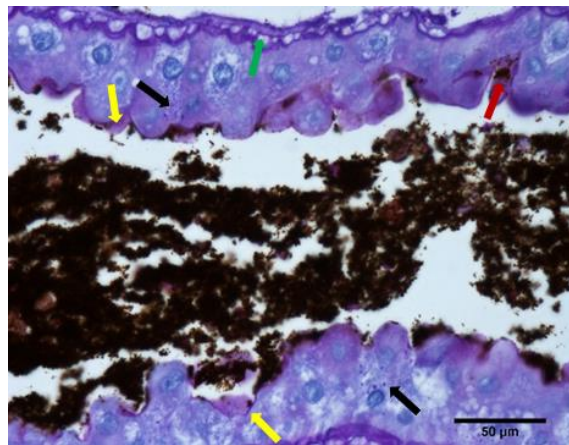


Figura 20. Fotomicrografía del intestino posterior de *Meccus pallidipennis* hembra a los 10 días postalimentación (40x). Flecha roja: invaginaciones del epitelio; flecha amarilla: MPM PAS positiva; flecha negra: granulación PAS positiva; flecha verde: células mioepiteliales.

7.1.3 *Triatoma barberi*, macho en ayuno y 10 días postalimentación.

En el ejemplar sin alimentar, el epitelio del intestino medio anterior mide 100 µm de grosor aproximadamente, es cilíndrico con ligera pseudoestratificación. La superficie está cubierta por el glicocáliz y escasa MPM, pero aumenta en las zonas donde presenta invaginaciones. Las células presentan granulación citoplasmática

PAS positiva de tamaño heterogéneo, los gránulos más gruesos se encuentran principalmente en la parte supranuclear y adosados a la membrana (Figura 21A). A los 10 días postalimentación, el epitelio del intestino medio anterior fue cilíndrico pseudoestratificado, de 120 μm de grosor, con invaginaciones de diferente profundidad. No se observaron gránulos citoplasmáticos PAS positivos y la MPM fue muy escasa (Figura 21B).

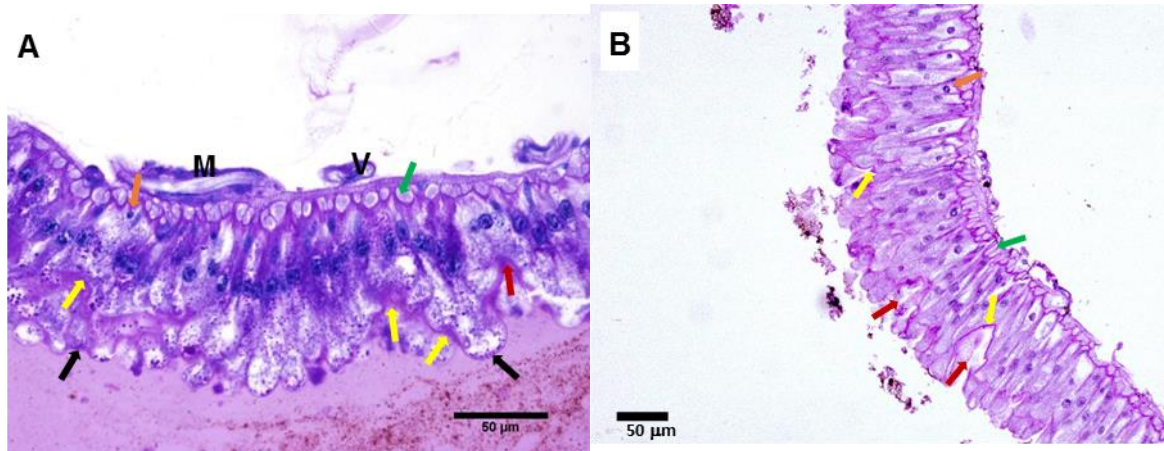


Figura 21. Fotomicrografías del intestino medio anterior de *Triatoma barberi* macho. **A)** Epitelio intestinal de ejemplar en ayuno (40x). Flecha roja: invaginaciones del epitelio; flecha negra: granulación PAS positiva; flecha amarilla: MPM PAS positiva; flecha anaranjada: células basales; flecha verde: células mioepiteliales; M: células musculares en disposición helicoidal; V: vasos hemolinfáticos. **B)** Epitelio intestinal de ejemplar a los 10 días postalimentación (40x). Flecha roja: invaginaciones del epitelio; flecha amarilla: secreción extracelular PAS positiva; flecha verde: células mioepiteliales; flecha anaranjada: células basales.

En el ejemplar en ayuno, el epitelio del intestino medio posterior es cilíndrico simple con un grosor 70 μm , presenta escasas invaginaciones que están cubiertas por la MPM. Distribuidos en todo el citoplasma se observan gránulos PAS positivos. (Figura 22A). A los 10 dpa el epitelio del intestino medio posterior es cilíndrico pseudoestratificado de aproximadamente 75 μm de altura con invaginaciones de diferente profundidad. No se observaron gránulos citoplasmáticos, la superficie adluminal está cubierta de una secreción PAS positiva (Figura 22B).

El epitelio del intestino posterior en ayuno, es simple con células cúbicas y planas, y mide aproximadamente 25 μm de alto. En esta porción del intestino es muy notable la presencia de una secreción PAS positiva cubriendo la superficie, que puede

corresponder a la MPM, además, en esta porción intestinal destaca la ausencia de gránulos citoplasmáticos PAS positivos (Figura 23).

Con respecto al intestino posterior del macho a los 10 dpa de *T. barberi* debido a dificultades técnicas (enrollamiento inadecuado del intestino) no se observó esta porción del intestino.

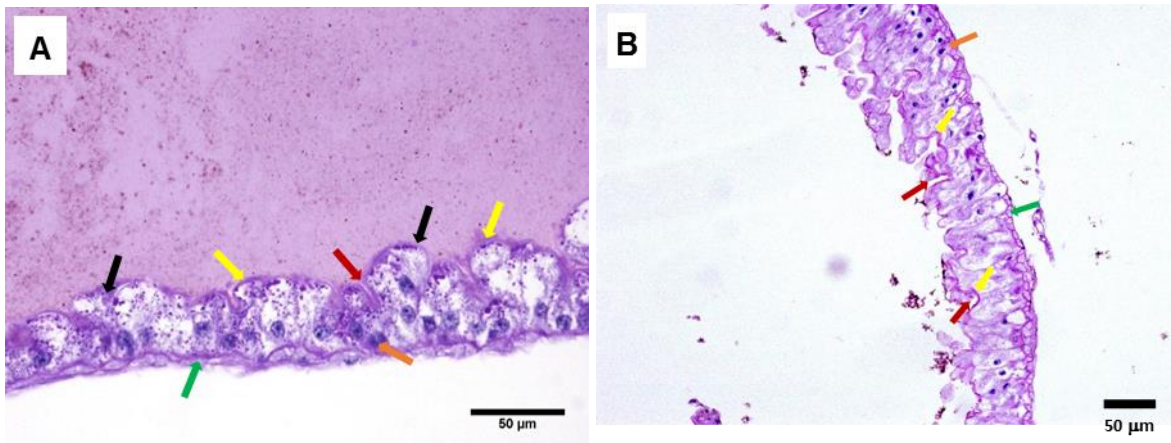


Figura 22. Fotomicrografías del intestino medio posterior de *Triatoma barberi* macho. **A)** Epitelio intestinal de ejemplar en ayuno (40x). Flecha roja: invaginaciones del epitelio; flecha amarilla: MPM PAS positiva; flecha negra: granulación PAS positiva; flecha verde: célula mioepiteliales; flecha anaranjada: células basales. **B)** Epitelio intestinal de ejemplar a los 10 días postalimentación (40x). Flecha roja: invaginaciones del epitelio; flecha amarilla: glicocálix con secreción PAS positiva; flecha anaranjada: células basales; flecha verde: células mioepiteliales.

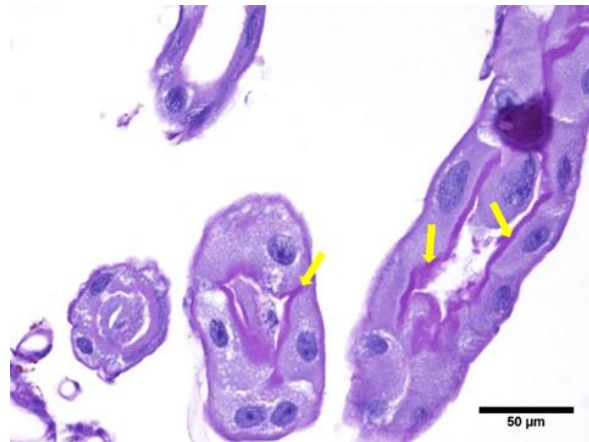


Figura 23. Fotomicrografía del intestino posterior de *Triatoma barberi* macho en ayuno (40x). Flecha amarilla: secreción abundante PAS positiva.

7.1.4 *Triatoma barberi*, hembra en ayuno y 10 días postalimentación.

El epitelio del intestino medio anterior del ejemplar en ayuno es cilíndrico simple pseudoestratificado de 100 μm de altura, con núcleos en la parte media de las células y algunos en la parte basal. Se observa granulación fina basófila y PAS positiva supranuclear apical. Las células son largas y delgadas, con glicocálix y secreción PAS positivas abundantes (Figura 24A). A los 10 días postalimentación el epitelio del intestino medio anterior muestra epitelio cilíndrico simple de 50-100 μm de altura, con gránulos de tamaño heterogéneo PAS positivos. Presenta invaginaciones en la superficie y secreción PAS positiva muy abundante (Figura 24B).

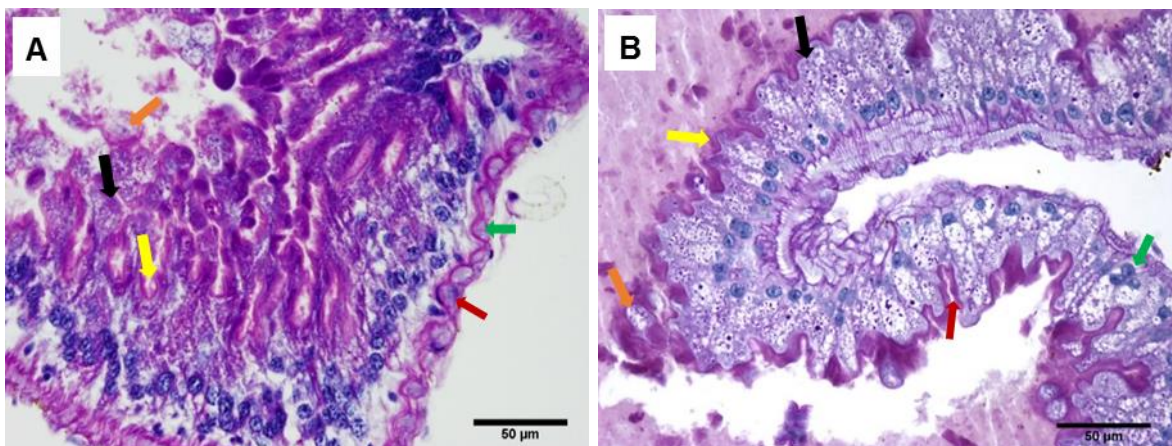


Figura 24. Fotomicrografías del intestino medio anterior de *Triatoma barberi* hembra. **A)** Epitelio intestinal de ejemplar en ayuno (40x). Flecha roja: células basales; flecha negra: gránulos PAS positivos; flecha amarilla: glicocálix y secreción PAS positivos; flecha verde: células mioepiteliales; flecha anaranjada: restos celulares en el lumen. **B)** Epitelio intestinal de ejemplar a los 10 días postalimentación (40x). Flecha roja: invaginaciones del epitelio; flecha amarilla: secreción PAS positiva; flecha verde: célula binucleada; flecha anaranjada: descamación celular; flecha negra: granulación PAS positiva.

En ayuno, el intestino medio posterior presenta epitelio similar al del intestino medio anterior con granulación y secreción PAS positivos, con altura de 70 μm (Figura 25A). Esta porción de intestino a los 10 dpa está conformado por epitelio cilíndrico simple de 50 μm de altura que presenta invaginaciones, el lumen presenta resto celular. El epitelio no presenta granulación PAS positiva (Figura 25B).

Por otra parte, el intestino posterior presentó epitelio simple plano y cúbico de 25 μm de altura, con gránulos de tinción heterogénea, la mayoría de éstos ubicados en la parte apical y PAS positivos. Abundante cantidad de glicocálix y secreción PAS positivos cubriendo las microvellosidades (Figura 26A). A los 10 dpa, la porción posterior del intestino posee epitelio plano y cúbico simple de 25 μm de altura, las células están cubiertas por una capa abundante y gruesa PAS positiva (Figura 26B).

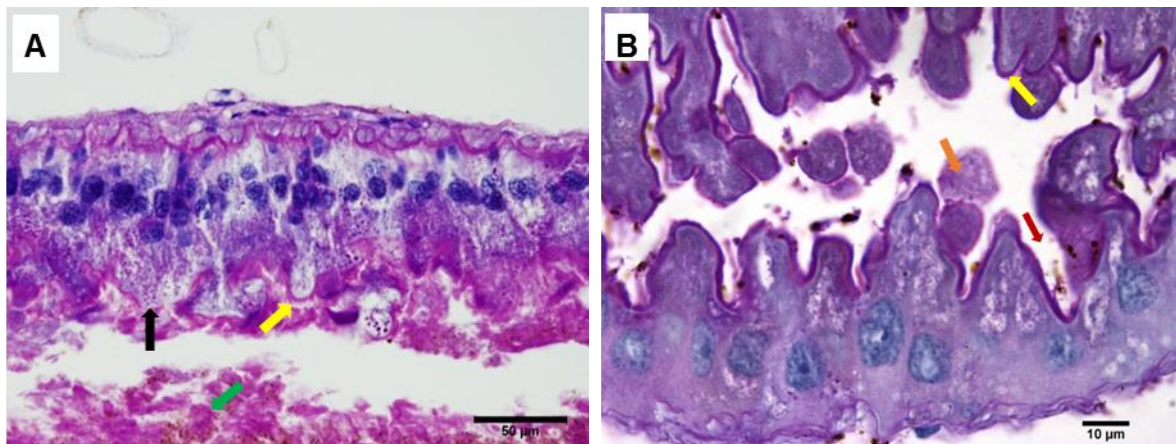


Figura 25. Fotomicrografías del intestino medio posterior de *Triatoma barberi* hembra. **A)** Epitelio intestinal de ejemplar en ayuno (40x). Flecha negra: gránulos PAS positivos; flecha amarilla: secreción y glicocálix PAS positivos; flecha verde: descamación celular. **B)** Epitelio intestinal de ejemplar a los 10 días postalimentación (100x). Flecha amarilla: borde adluminal PAS positivo; flecha roja: invaginaciones del epitelio; flecha anaranjada: masas de citoplasma en la luz intestinal.

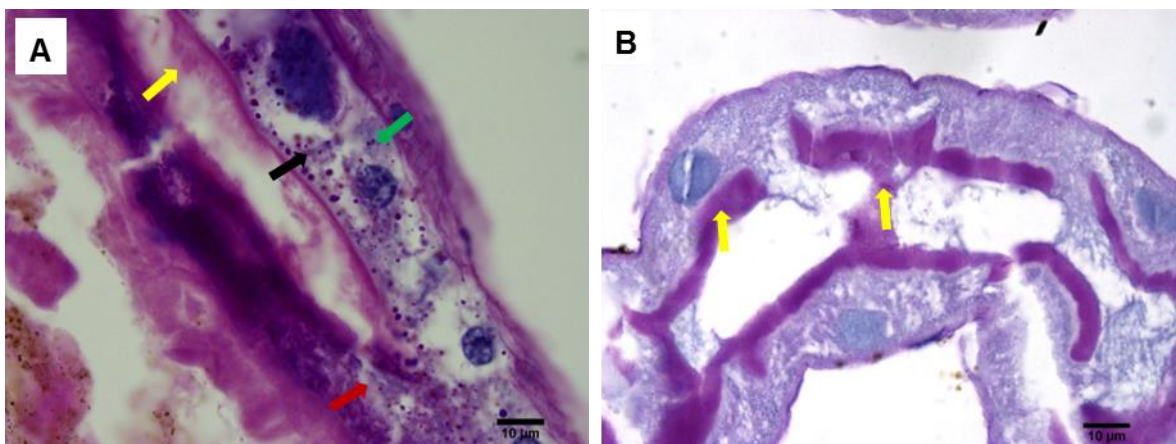


Figura 26. Fotomicrografías del intestino posterior de *Triatoma barberi* hembra. **A)** Epitelio intestinal de ejemplar en ayuno (100x). Flecha negra: gránulos PAS positivos; flecha verde: gránulos de coloración azul; flecha amarilla: glicocálix y secreción PAS positivos; flecha roja: descamación celular. **B)** Epitelio intestinal de ejemplar a los 10 días postalimentación (100x). Flecha amarilla: secreción gruesa PAS positiva.

En la tabla 4 se resumen las características observadas en los cortes histológicos de ambas especies, sexos y condiciones de alimentación.

Tabla 4. Características de los cortes histológicos de intestino medio anterior, medio posterior y posterior de hembras y machos de *Meccus pallidipennis* y *Triatoma barberi* en ambas condiciones de alimentación

Especie	Sexo	Sección	Alimentación	Tamaño (µm)	Gránulos PAS positivos	Secreción PAS positiva
<i>Meccus pallidipennis</i>	Machos	IMant	Ayuno	80	+++	++++
			10 dpa	85	++++	+++
		IMpost	Ayuno	50	-	-
			10 dpa	77	+	++++
		IP	Ayuno	25	-	+
			10 dpa	25	-	+
	Hembras	IMant	Ayuno	50	++	++
			10 dpa	115	+++	+++
		IMpost	Ayuno	100	+++	+++
			10 dpa	75	++++	+++
IP	10 dpa	50	-	++		
<i>Triatoma barberi</i>	Machos	IMant	Ayuno	100	-	++
			10 dpa	120	-	+
		IMpost	Ayuno	70	+++	++
			10 dpa	75	-	+
	IP	Ayuno	25	-	++++	
	Hembras	IMant	Ayuno	100	++++	++++
			10 dpa	100	++++	++++
		IMpost	Ayuno	70	++++	++++
			10 dpa	50	+++	++++
		IP	Ayuno	25	++++	++++
10 dpa			25	-	++++	

IMant: intestino medio anterior. IMpost: intestino medio posterior. IP: intestino posterior. dpa: días postalimentación. ++++:Muy abundantes. +++: abundantes. ++ poco abundantes. +: escasos, -:ausentes.

7.2 Determinación del perfil electroforético.

Como se mencionó en la metodología, debido a la falta de un equipo documentador de geles, para el análisis del perfil electroforético se utilizó una escala de color para compararla con los componentes observados en el gel (Tabla 1).

En las tablas 5 y 6 se muestran los componentes observados en la electroforesis para cada una de las muestras de intestino medio y posterior de machos (Tabla 5) y hembras (tabla 6) de *Meccus pallidipennis*, en ambas condiciones de alimentación.

Tabla 5. Peso molecular de componentes observados en el gel SDS-PAGE de las muestras de intestino medio y posterior de machos de *Meccus pallidipennis*. Resultados por triplicado.

<i>Meccus pallidipennis</i>											
Macho											
Ayuno						10 dpa					
IM			IP			IM			IP		
PM (kDa)			PM(kDa)			PM (kDa)			PM (kDa)		
96	77	98	52	52	61	111	111	90	50	50	54
61	70	61	40	46	57	85	85	72	43	43	43
52	60	54	37	26	54	61	61	54	39		40
44	56	52	33	17	49	50	50	43	35		26
38	52	49		15	47	43	43	39	21		
29	49	47			41	39	39	32			
27	46	41			38	35	35	26			
26	41	38			35	28	28	24			
24	38	34			25	26	26	22			
22	34	29			23	24	24	20			
19	31	27			21	21	21				
17	29	24				17	17				
	27	22				15	14				
	24	21				14					
	22	17									
	18	15									
	17	14									
	15										

dpa: días postalimentación. PM: peso molecular. IM: intestino medio. IP: intestino posterior.

Tabla 6. Peso molecular de componentes observados en el gel SDS-PAGE de las muestras de intestino medio y posterior de hembras de *Meccus pallidipennis*. Resultados por triplicado.

<i>Meccus pallidipennis</i>											
Hembra											
Ayuno						10 dpa					
IM			IP			IM			IP		
PM (kDa)			PM(kDa)			PM (kDa)			PM (kDa)		
84	80	84	38	42	56	61	85	85	56	50	50
61	61	61	18	38	42	54	61	61	56	43	43
54	56	47	15	34	34	50	50	50	43		
47	47	43		28	28	45	43	43			
40	38	38		26	26	41	39	39			
36	36	34		23	23	39	35	35			
34	31	26		20	21	35	28	28			
26	30	22		18	20	33	26	26			
22	24	21		15	18	28	21	24			
21	19	18		14	15	26	18	21			
18	18	17				26	17	17			
17	17	15				18	16	16			
16	16	14					15	15			
15	15						14	14			
14	14										

dpa: días postalimentación. PM: peso molecular. IM: intestino medio. IP: intestino posterior.

A partir de los resultados obtenidos se observó que los intestinos medios de machos en ayuno de *Meccus pallidipennis* presentaron 25 componentes entre 96 y 14 kDa, los de mayor relevancia entre 52 y 22 kDa (52, 38, 29, 27, 24 y 22) (Figura 27A); en los intestinos posteriores se observaron 14 componentes entre 61 y 15 kDa con mayor relevancia en el de 52 kDa (Figura 27A). A los 10 días postalimentación en los intestinos medios, los componentes presentes fueron 18 entre 111 y 14 kDa, con mayor relevancia entre 54 y 14 kDa (54, 50, 43, 39, 28, 26, 17 y 14) (Figura 27B). En el intestino posterior se identificaron 8 componentes entre 54 y 21 kDa con mayor relevancia los de 54 y 43 (Figura 27B).

Por otra parte, los intestinos medios de hembras de *Meccus pallidipennis* en ayuno presentaron 22 componentes entre 84 y 14 kDa, los de mayor relevancia entre 54 y

14 kDa (54, 47, 40, 38 y 34) (Figura 27C); en los intestinos posteriores se identificaron 12 componentes entre 56 y 14 kDa, con mayor relevancia el de 38 kDa (Figura 27C). A los 10 días postalimentación en el intestino medio se identificaron 19 componentes entre 85 y 14 kDa y los de mayor relevancia entre 54 y 39 kDa (54, 50, 43 y 39) (Figura 27D); en el intestino posterior se presentaron 3 componentes de 56, 50 y 43 kDa, no se identificó mayor relevancia en alguno de ellos (Figura 27D).

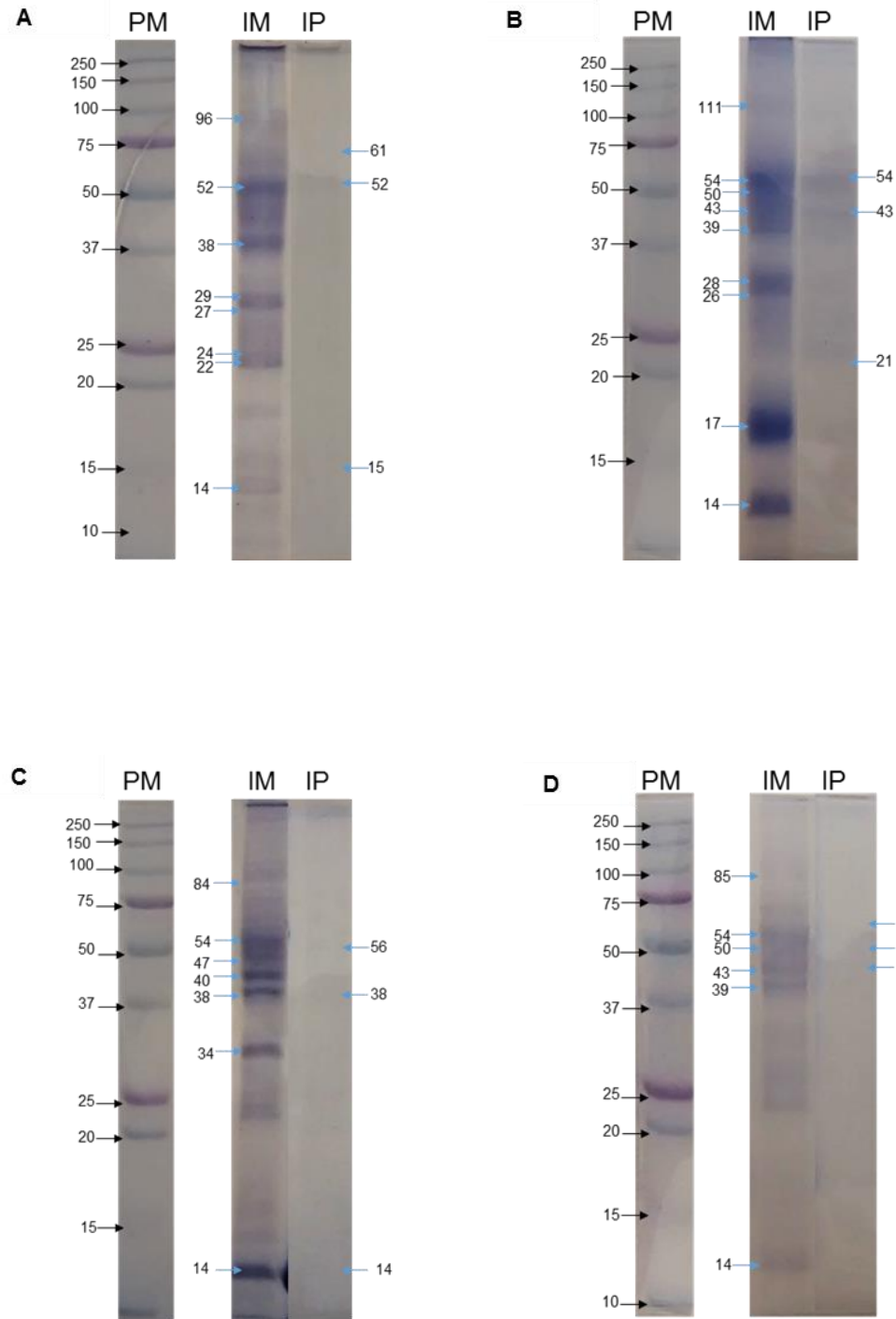


Figura 27. Componentes de mayor relevancia en SDS PAGE 12.5% de intestino medio y posterior de machos y hembras de *Meccus pallidipennis* en diferentes condiciones de alimentación. Cada pozo contiene 12 μ g de proteína. **A)** Machos en ayuno, **B)** Machos con 10 dpa, **C)** Hembras en ayuno, **D)** Hembras con 10 dpa. dpa: días postalimentación. PM: peso molecular. IM: intestino medio. IP: intestino posterior.

Respecto a las muestras de *Triatoma barberi*, en las tablas 7 y 8 se muestran los componentes observados en la electroforesis para cada una de las muestras de intestino medio y posterior de machos (Tabla 7) y hembras (Tabla 8) de esta especie, en ambas condiciones de alimentación.

Tabla 7. Peso molecular de componentes observados en el gel SDS-PAGE de las muestras de Intestino medio y posterior de machos de *Triatoma barberi*. Resultados por triplicado.

<i>Triatoma barberi</i>											
Macho											
Ayuno						10 dpa					
IM			IP			IM			IP		
PM (kDa)			PM(kDa)			PM (kDa)			PM (kDa)		
95	74	95	95	95	95	150	65	102	180	182	52
74	61	74	61	61	61	64	57	73	40	40	
61	43	61		14		51	51	54	25	25	
43	15	43				40	40	51			
37	14	37				36	36	40			
23		29				25	25	36			
20		27				23	23	33			
19		23				20	20	25			
15		15						23			
14		14									

dpa: días postalimentación. PM: peso molecular. IM: intestino medio. IP: intestino posterior.

Tabla 8. Peso molecular de componentes observados en el gel SDS-PAGE de las muestras de Intestino medio y posterior de hembras de *Triatoma barberi*. Resultados por triplicado.

<i>Triatoma barberi</i>											
Hembra											
Ayuno						10 dpa					
IM			IP			IM			IP		
PM (kDa)			PM (kDa)			PM (kDa)			PM (kDa)		
95	95	92	79	79	75	64	102	102	182	52	52
74	74	80	63	63	67	40	73	73	40		
61	61	71	27		54	35	54	54	25		
43	43	61			46	22	52	52			
37	37	54			40	20	40	40			
22	34	48			37		35	35			
20	25	43			30		33	27			
15	24	39			25		25	25			
14	19	37			23		22	22			
	18	32			21						
		31			19						
		29			18						
		26									
		25									
		24									
		20									
		19									
		18									

dpa: días postalimentación. PM: peso molecular. IM: intestino medio. IP: intestino posterior.

Con base en los resultados obtenidos se observó que los intestinos medios de machos en ayuno de *Triatoma barberi* presentaron 10 componentes entre 95 y 14 kDa los de mayor relevancia de 61 y 14 kDa (Figura 28A); en el intestino posterior se identificaron 3 componentes de 95, 61, y 14 kDa, con mayor relevancia el de 61 kDa (Figura 28A). A los 10 días postalimentación, el intestino medio presentó 13 componentes entre 150 y 22 kDa y los de mayor relevancia fueron de 54, 40 y 36 kDa (Figura 28B); en el intestino posterior se presentaron componentes de 182, 52, 40 y 25 kDa, el de mayor relevancia fue de 40 kDa (Figura 28B).

Las muestras de intestino de las hembras de *Triatoma barberi* en ayuno mostraron 22 componentes entre 95 y 14 kDa, los de mayor relevancia de 61, 54 y 43 kDa (Figura 28C); en el intestino posterior se presentaron 15 componentes entre 79 y 18 kDa y el de mayor relevancia fue el de 54 kDa (Figura 28C). A los 10 días postalimentación en el intestino medio se identificaron 12 componentes entre 102 y 20 kDa, con mayor relevancia fueron 54, 35 y 25 kDa (Figura 28D); en el intestino posterior se identificaron componentes de 180, 52, 40 y 25 kDa, sin diferencias en la relevancia (Figura 28D).

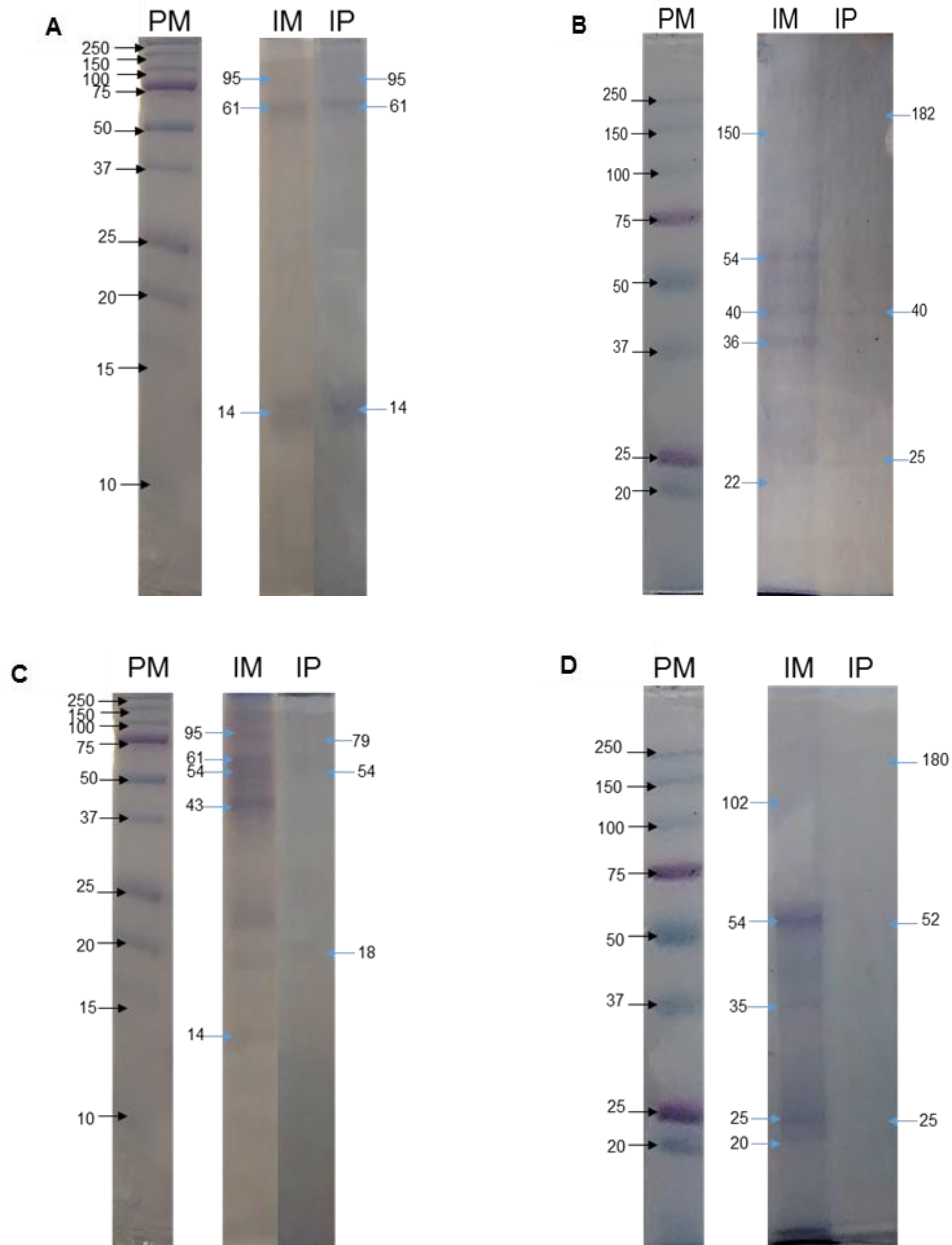


Figura 28. Componentes de mayor relevancia en SDS PAGE 12.5% de intestino medio y posterior de machos y hembras de *Triatoma barberi* en diferentes condiciones de alimentación. Cada pozo contiene 12 μ g de proteína. **A)** Machos en ayuno, **B)** Machos con 10 dpa, **C)** Hembras en ayuno, **D)** Hembras con 10 dpa. dpa: días postalimentación. PM: peso molecular. IM: intestino medio. IP: intestino posterior.

7.3 Identificación de glicoproteínas.

7.3.1 Reconocimiento de residuos de N-acetilglucosamina con la lectina WGA en Western-blot en intestino medio y posterior de machos y hembras de *Meccus pallidipennis* y *Triatoma barberi* en diferentes condiciones de alimentación.

Como se mencionó en la metodología, para el análisis del perfil de glicoproteínas se utilizó una escala de color para compararla con los componentes observados en la membrana de nitrocelulosa (Tabla 3).

En las tablas 9 y 10 se muestran los componentes reconocidos por WGA en Western blot para cada una de las muestras de intestino medio y posterior de machos (Tabla 9) y hembras (Tabla 10) de *Meccus pallidipennis*, en ambas condiciones de alimentación.

Tabla 9. Peso molecular de componentes con residuos de N-acetilglucosamina reconocidos por la lectina WGA mediante Western-blot en Intestino medio y posterior de machos de *Meccus pallidipennis*. Resultados por triplicado.

<i>Meccus pallidipennis</i>											
Macho											
Ayuno						10dpa					
IM			IP			IM			IP		
PM (kDa)			PM (kDa)			PM (kDa)			PM (kDa)		
232	121	131	121	121	77	172	172	108	138	231	108
104	91	112	91	91	69	114	114	58	114	114	84
91	72	97	72	72	59	68	52	54	68	98	52
65	59	86	59	41	53	52	48	52	48	76	37
59	50	69	50	36	46	48	37	18	42	61	32
50	41	64	38	32	34	37	34		37	52	27
47	36	59	36		32	34	29		34	45	24
36	34	50	34		31	29	26		29	42	19
34		43			29	26			27	40	
32		36							26	37	
		34								29	
		32								28	
		27								27	
		24									
		20									
		18									
		17									

dpa: días postalimentación. PM: peso molecular. IM: intestino medio. IP: intestino posterior.

Tabla 10. Peso molecular de componentes con residuos de N-acetilglucosamina reconocidos por la lectina WGA mediante Western-blot en Intestino medio y posterior de hembras de *Meccus pallidipennis*. Resultados por triplicado.

<i>Meccus pallidipennis</i>											
Hembra											
Ayuno						10 dpa					
IM			IP			IM			IP		
PM (kDa)			PM(kDa)			PM (kDa)			PM (kDa)		
197	197		95	155	155	157	76	172	157	76	76
128	95	155	75	95	83	88	68	114	95	68	61
83	75	83	57	75	68	61	52	76	68	52	52
68	57	68	40	57		31	45	68	61	45	38
52	40	57		49		30	37	52	38	38	31
49	36	52		40		25	34	40	34	34	28
43	34	43		34		16	31	37	25	27	
38	31	34		31		15	27	34	23		
34		31		30		13		31			
31								27			
28											
16											

dpa: días postalimentación. PM: peso molecular. IM: intestino medio. IP: intestino posterior.

Al observar los resultados obtenidos, se identificó que los intestinos medios de machos de *M. pallidipennis* en ayuno mostraron 25 componentes entre 232 y 17 kDa con mayor relevancia en los componentes de 86 y 36 kDa, (Figura 29A); el intestino posterior presentó 15 componentes entre 121 y 29 kDa, con mayor relevancia en los componentes de 121 y 91 kDa (Figura 29A). A los 10 días postalimentación, el intestino medio de machos presentó 12 componentes entre 172 y 18 kDa con mayor relevancia en el de 29 kDa (Figura 29B) en el intestino posterior se encontraron 20 componentes entre 231 y 19 kDa con mayor relevancia en los de 76, 52, 29 y 27 kDa (Figura 29B).

En el intestino medio de hembras de *M. pallidipennis* en ayuno se presentaron 18 componentes entre 197 y 16 kDa, con mayor relevancia en componentes de 83, 49, 43 y 31 kDa (Figura 29C); el intestino posterior presentó 11 componentes entre 155

y 30 kDa con mayor relevancia en componentes de 95 y 75 kDa. (Figura 29C). En el intestino medio de hembras con 10 días post alimentación se identificaron 19 componentes entre 172 y 13 kDa, con mayor relevancia en los componentes de 68, 37 y 34 kDa (Figura 29D); el intestino posterior mostró componentes entre 157 y 23 kDa, con mayor relevancia en componentes de 95 y 68 kDa (Figura 29.D).

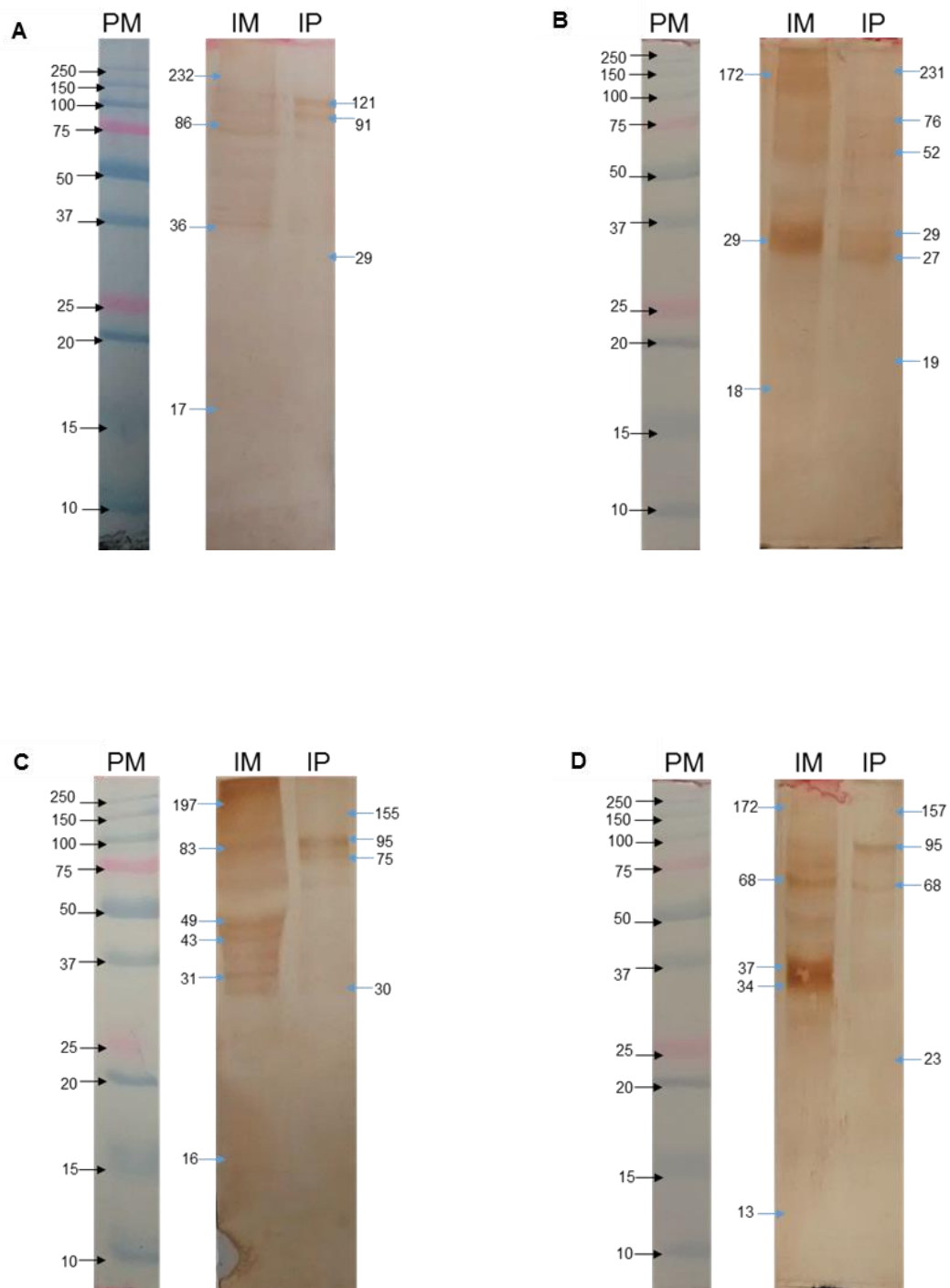


Figura 29. Componentes de mayor relevancia con residuos de N-acetilglucosamina (WGA) en Western-blot de intestino medio y posterior de machos y hembras de *Meccus pallidipennis* en diferentes condiciones de alimentación. Cada pozo contiene 12 μ g de proteína. **A)** Machos en ayuno, **B)** Machos con 10 dpa, **C)** Hembras en ayuno, **D)** Hembras con 10 dpa. dpa: días postalimentación. PM: peso molecular. IM: intestino medio. IP: intestino posterior.

Por otra parte, en las tablas 13 y 14 se presentan los componentes reconocidos por WGA en Western blot para cada una de las muestras de intestino medio y posterior de machos (Tabla 11) y hembras (Tabla 12) de esta especie, en ambas condiciones de alimentación.

Tabla 11. Peso molecular de componentes con residuos de N-acetilglucosamina reconocidos por la lectina WGA mediante Western-blot en intestino medio y posterior de machos de *Triatoma barberi*. Resultados por triplicado.

<i>Triatoma barberi</i>											
Macho											
Ayuno						10 dpa					
IM			IP			IM			IP		
PM (kDa)			PM(kDa)			PM (kDa)			PM (kDa)		
129	70	189	161	161	179	165	223	165	190	165	74
	64	152	97	97	140	132	190	129	116	104	64
	60	109	69	69	97	80	95	87	74	69	61
		85		32		69	80	74	64	64	53
		77				64	69	64	37	56	41
		70				56	64	61	33	47	33
		64				47	61	53	30	43	30
		55				33	56	47		31	
		43				31	53	43		30	
		39				29	50	39		23	
							47	33		20	
							43	29			
							39	24			
							35				
							33				
							29				
							24				
							21				
							20				

dpa: días postalimentación. PM: peso molecular. IM: intestino medio. IP: intestino posterior.

Tabla 12. Peso molecular de componentes con residuos de N-acetilglucosamina reconocidos por la lectina WGA mediante Western-blot en intestino medio y posterior de hembras de *Triatoma barberi*. Resultados por triplicado.

<i>Triatoma barberi</i>											
Hembra											
Ayuno						10 dpa					
IM			IP			IM			IP		
PM (kDa)			PM(kDa)			PM (kDa)			PM (kDa)		
89	89	204	149	86	161	165	165	223	80	165	223
64	64	98	89	80	86	95	129	165	69	129	190
42	42	86		75	56	64	104	129	64	76	129
38	38	70		56	35	61	74	115	50	64	104
31	33	54			28	56	64	87	45	50	76
23	23	47			23	47	56	74	33	35	31
22	22	38			22	45	50	69	31	31	29
		33			20	43	34	61	29	29	
		31			14	41	31	37	20		
		28			13	39	29	34			
		26				34	25	31			
		24				33	22	30			
		23				31					
		20				30					
		14				22					
		13				20					

dpa: días postalimentación. PM: peso molecular. IM: intestino medio. IP: intestino posterior.

Los intestinos medios de machos de *T. barberi* en ayuno mostraron 12 componentes entre 189 y 39 kDa y los de mayor relevancia fueron de 60 y 70 kDa (Figura 30A); en el intestino posterior se presentaron 6 componentes entre 179 y 32 kDa, sin diferencias en la relevancia (Figura 30A). A los 10 días postalimentación, el intestino medio presentó 24 componentes entre 223 y 20 kDa con mayor relevancia en 74, 56 y 29 kDa (Figura 30B); el intestino posterior presentó 16 componentes entre 190 y 20 kDa, con mayor relevancia del componente de 74 kDa (Figura 30B).

Los intestinos medios de hembras de *T. barberi* en ayuno presentaron 19 componentes entre 204 y 13 kDa y los de mayor relevancia fueron de 38 y 42 kDa

(Figura 30C); en el intestino posterior se identificaron 15 componentes entre 161 y 13 kDa y con mayor relevancia el de 56 kDa (Figura 30C). A los 10 días postalimentación, el intestino medio posterior presentó 26 componentes entre 223 y 20 kDa 6 componentes de mayor relevancia en los de 76, 64, 56,34 kDa (Figura 30D); el intestino posterior presentó 16 componentes entre 223 y 20 kDa y con mayor relevancia el de 76 kDa (Figura 30D).

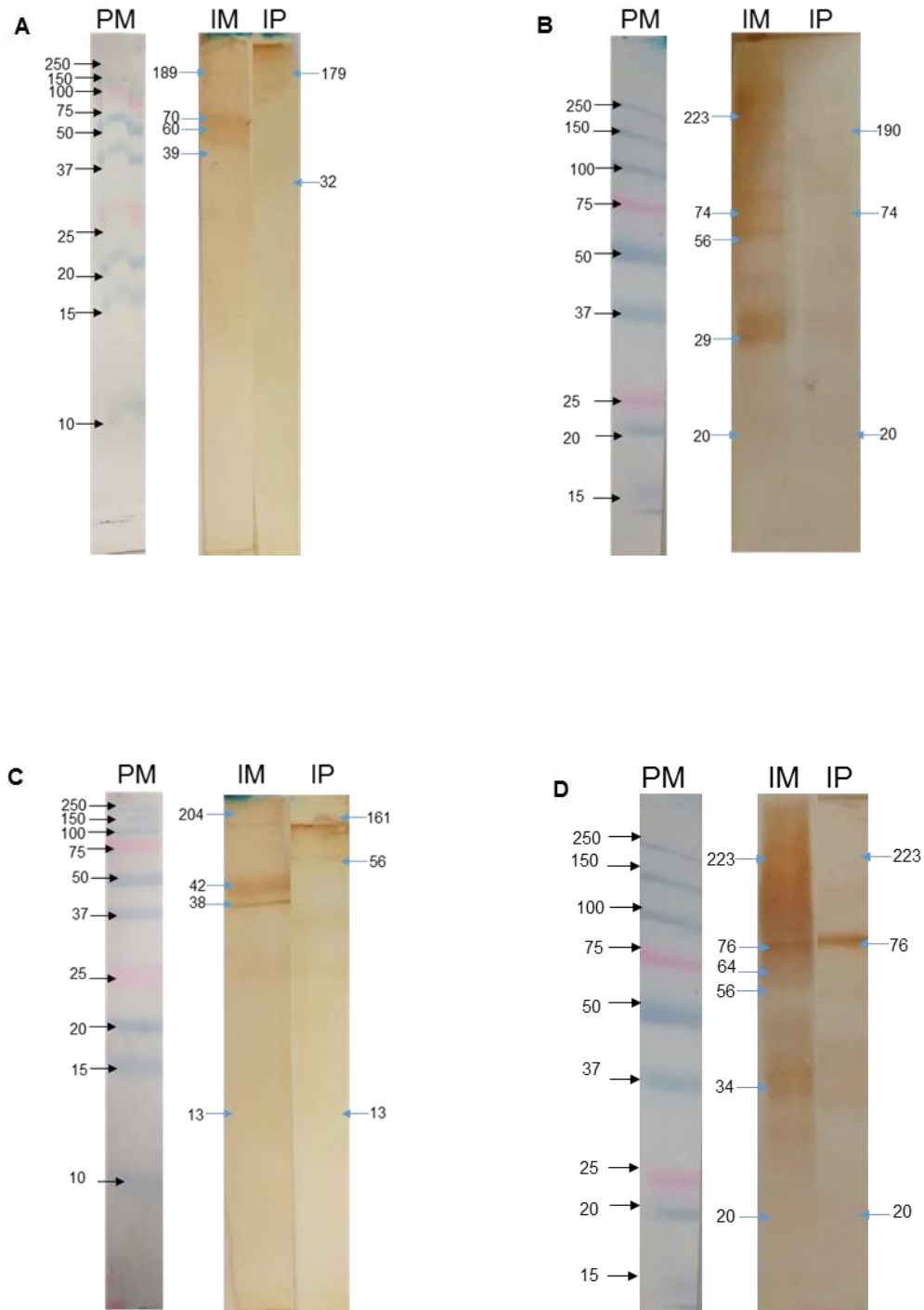


Figura 30. Componentes de mayor relevancia con residuos de N-acetilglucosamina (WGA) en Western-blot de intestino medio y posterior de machos y hembras de *Triatoma barberi* en diferentes condiciones de alimentación. Cada pozo contiene 12 μ g de proteína. **A)** Machos en ayuno, **B)** Machos con 10 dpa, **C)** Hembras en ayuno, **D)** Hembras con 10 dpa. dpa: días postalimentación. PM: peso molecular. IM: intestino medio. IP: intestino posterior.

7.3.2 Reconocimiento de residuos de N-acetilgalactosamina con la lectina PNA en Western-blot en intestino medio y posterior de machos y hembras de *Meccus pallidipennis* y *Triatoma barberi* en diferentes condiciones de alimentación.

El análisis de la relevancia de los componentes reconocidos por PNA en Western blot se realizó basándose en la misma escala de colores utilizada para los componentes reconocidos por WGA (Tabla 3). En las tablas 15 se enlistan los componentes reconocidos por PNA para cada una de las muestras de intestino medio y posterior de machos (Tabla 13) y hembras (Tabla 14) de *Meccus pallidipennis*, en ambas condiciones de alimentación.

Tabla 13. Peso molecular de componentes con residuos de N-acetilgalactosamina reconocidos por la lectina PNA mediante Western-blot en intestino medio y posterior de machos de *Meccus pallidipennis*. Resultados por triplicado.

<i>Meccus pallidipennis</i>											
Macho											
Ayuno						10 dpa					
IM			IP			IM			IP		
PM (kDa)			PM(kDa)			PM (kDa)			PM (kDa)		
120	68	131	68	120	86	212	212	190	129	93	190
68	46	97	56		77	102	93	93	85	78	117
		86	46		63	85	78	66	72	47	66
		63	40		53	78	85	44	47	39	62
		53			46	59	72	35	31		49
		46			40	52	59	33			44
		40			38	49	49	31			31
		38			34	39	33				29
		34				35	28				20
		24				28	25				
		20				25					
		15				24					
		11				23					

dpa: días postalimentación. PM: peso molecular. IM: intestino medio. IP: intestino posterior.

Tabla 14. Peso molecular de componentes con residuos de N-acetilgalactosamina reconocidos por la lectina PNA mediante Western-blot en Intestino medio y posterior de hembras de *Meccus pallidipennis*. Resultados por triplicado.

<i>Meccus pallidipennis</i>											
Hembra											
Ayuno						10 dpa					
IM			IP			IM			IP		
PM (kDa)			PM(kDa)			PM (kDa)			PM (kDa)		
78	134	225	78	85	72	161	102	149	59	114	129
67	117	155	67	67	62	52	78	102	52	45	93
20	78	94	58	58	58	35	67	85	35	27	78
19	67	72	49	46	40	20	49	67	27		55
	40	58	40	44	38	19		49	24		49
	36	46	27	20		17		32	17		
	20	40	20	19		16		27	13		
	19	36	19			13					
		34									
		20									

dpa: días postalimentación. PM: peso molecular. IM: intestino medio. IP: intestino posterior.

Con base en los resultados obtenidos se observó que los intestinos medios de machos de *M. pallidipennis* en ayuno mostraron 15 componentes entre 131 y 11 kDa, con mayor relevancia en el componente de 46 kDa (Figura 31A). En los intestinos posteriores se presentaron 11 componentes entre 120 y 34 kDa y los de con mayor relevancia fueron los de 46 y 40 kDa (Figura 31A). A los 10 días postalimentación los intestinos medios mostraron 20 componentes entre 212 y 23 kDa con mayor relevancia en 85 y 59 kDa (Figura 31B); el intestino posterior presentó 16 componentes entre 190 y 20 kDa, sin diferencia en la relevancia (Figura 31B).

El intestino medio de hembras en ayuno de *M. pallidipennis* presentó 16 componentes entre 225 y 19 kDa, con un mayor reconocimiento en los componentes de 36 y 34 kDa (Figura 31C); en el intestino posterior se encontraron 14 componentes entre 85 y 19 kDa, con mayor relevancia en componentes de 67 y 58

kDa (Figura 31C). A los 10 días postalimentación, en el intestino medio se presentaron 17 componentes entre 161 y 13 kDa, con mayor relevancia en el componente de 102 kDa (Figura 31D); el intestino posterior presentó 14 componentes entre 129 y 13 kDa, con mayor relevancia en el componente 78 kDa (Figura 31D).

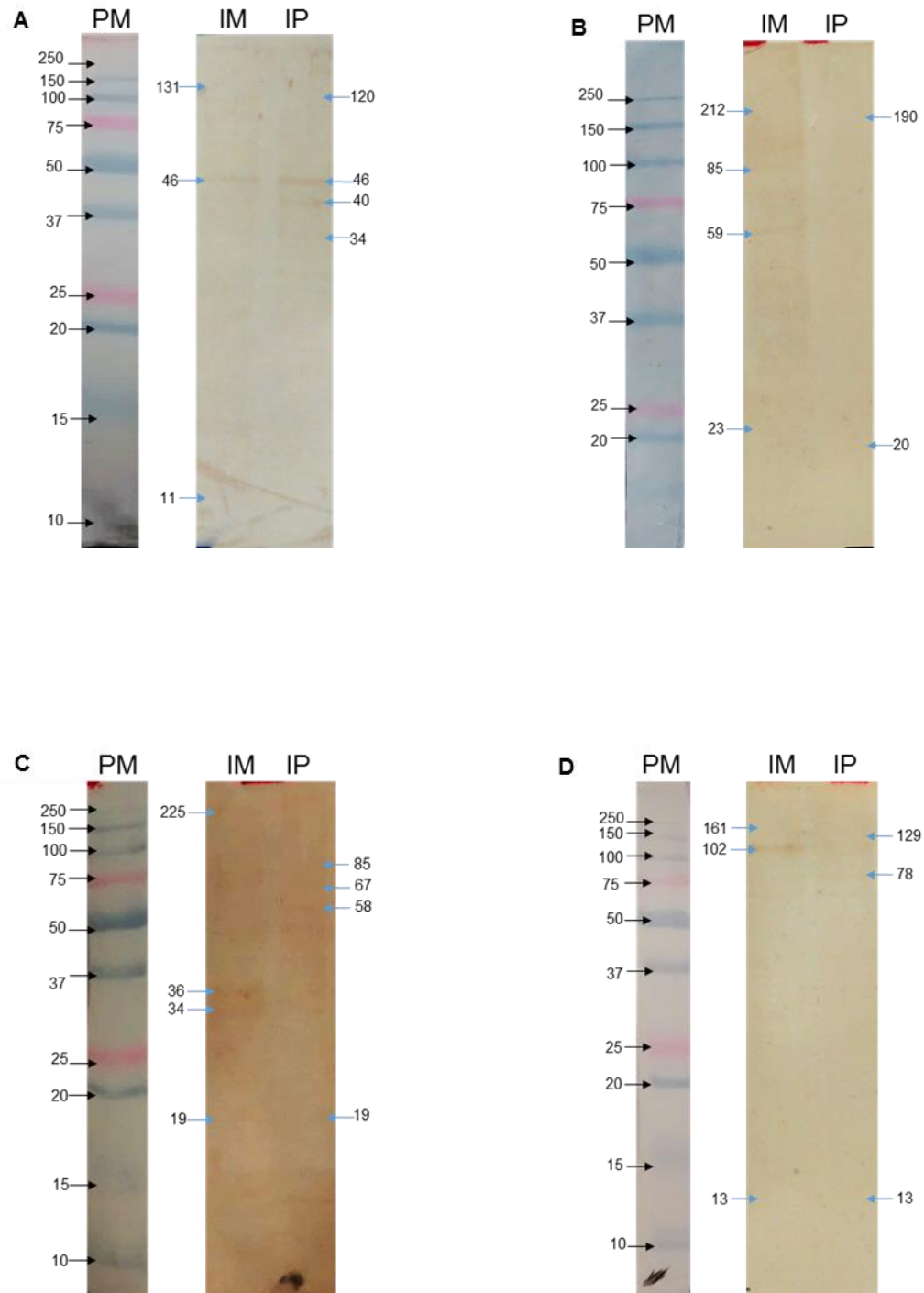


Figura 31. Componentes de mayor relevancia con residuos de N-acetilgalactosamina (PNA) en Western-blot de intestino medio y posterior de machos y hembras de *Meccus pallidipennis* en diferentes condiciones de alimentación. Cada pozo contiene 12 μ g de proteína. **A)** Machos en ayuno, **B)** Machos con 10 dpa, **C)** Hembras en ayuno, **D)** Hembras con 10 dpa. dpa: días postalimentación. PM: peso molecular. IM: intestino medio. IP: intestino posterior.

Por otra parte, en las tablas 15 y 16 se presentan los componentes reconocidos por PNA en las muestras de intestino medio y posterior de machos (Tabla 15) y hembras (Tabla 16) de *Triatoma barberi* en ambas condiciones de alimentación.

Tabla 15. Peso molecular de componentes con residuos de N-acetilgalactosamina reconocidos por la lectina PNA mediante Western-blot en intestino medio y posterior de machos de *Triatoma barberi*. Resultados por triplicado.

<i>Triatoma barberi</i>											
Macho											
Ayuno						10 dpa					
IM			IP			IM			IP		
PM (kDa)			PM(kDa)			PM (kDa)			PM (kDa)		
55	59	64	105	100	105	-	-	-	-	-	-
52	55	59	100	45	57						
47	47		45	39	53	-	-	-	-	-	-
			39		39	-	-	-	-	-	-

dpa: días postalimentación. PM: peso molecular. IM: intestino medio. IP: intestino posterior.

Tabla 16. Peso molecular de componentes con residuos de N-acetilgalactosamina reconocidos por la lectina PNA mediante Western-blot en intestino medio y posterior de machos de *Triatoma barberi*. Resultados por triplicado.

<i>Triatoma barberi</i>											
Hembra											
Ayuno						10 dpa					
IM			IP			IM			IP		
PM (kDa)			PM(kDa)			PM (kDa)			PM (kDa)		
58	95	114	78	114	58	-	-	-	-	-	-
47	67	95	67	90	47	-	-	-	-	-	-
43	58	58	58	67	33	-	-	-	-	-	-
	52	47	49	58	23	-	-	-	-	-	-
		33	40	47	20	-	-	-	-	-	-
		26	27	44	16	-	-	-	-	-	-
		23	20	20	12	-	-	-	-	-	-
		19	19	19		-	-	-	-	-	-
		15				-	-	-	-	-	-
		12				-	-	-	-	-	-

dpa: días postalimentación. PM: peso molecular. IM: intestino medio. IP: intestino posterior.

A partir de los resultados obtenidos, se observó que los intestinos medios de machos en ayuno de *T. barberi* presentó componentes de 64, 59, 55, 52 y 47 kDa, sin diferencias en la relevancia (Figura 31A); en el intestino posterior se identificaron 6 componentes de 105, 100, 57, 53, 45 y 39 kDa, no se identificó diferencias en la relevancia (Figura 31A). A los 10 días postalimentación no se detectó ningún componente con residuos de N-acetilgalactosamina (Figura 31B).

El intestino medio de hembras en ayuno presentó 13 componentes entre 114 y 12 kDa y los de mayor relevancia fueron los de 95, 33 y 23 kDa (Figura 31C); los intestinos posteriores presentaron 15 componentes entre 114 y 12 kDa y los de mayor relevancia fueron los 114, 90 y 33 kDa (Figura 31C). A los 10 días postalimentación no se detectó ningún componente con residuos de N-acetilgalactosamina (Figura 31D).

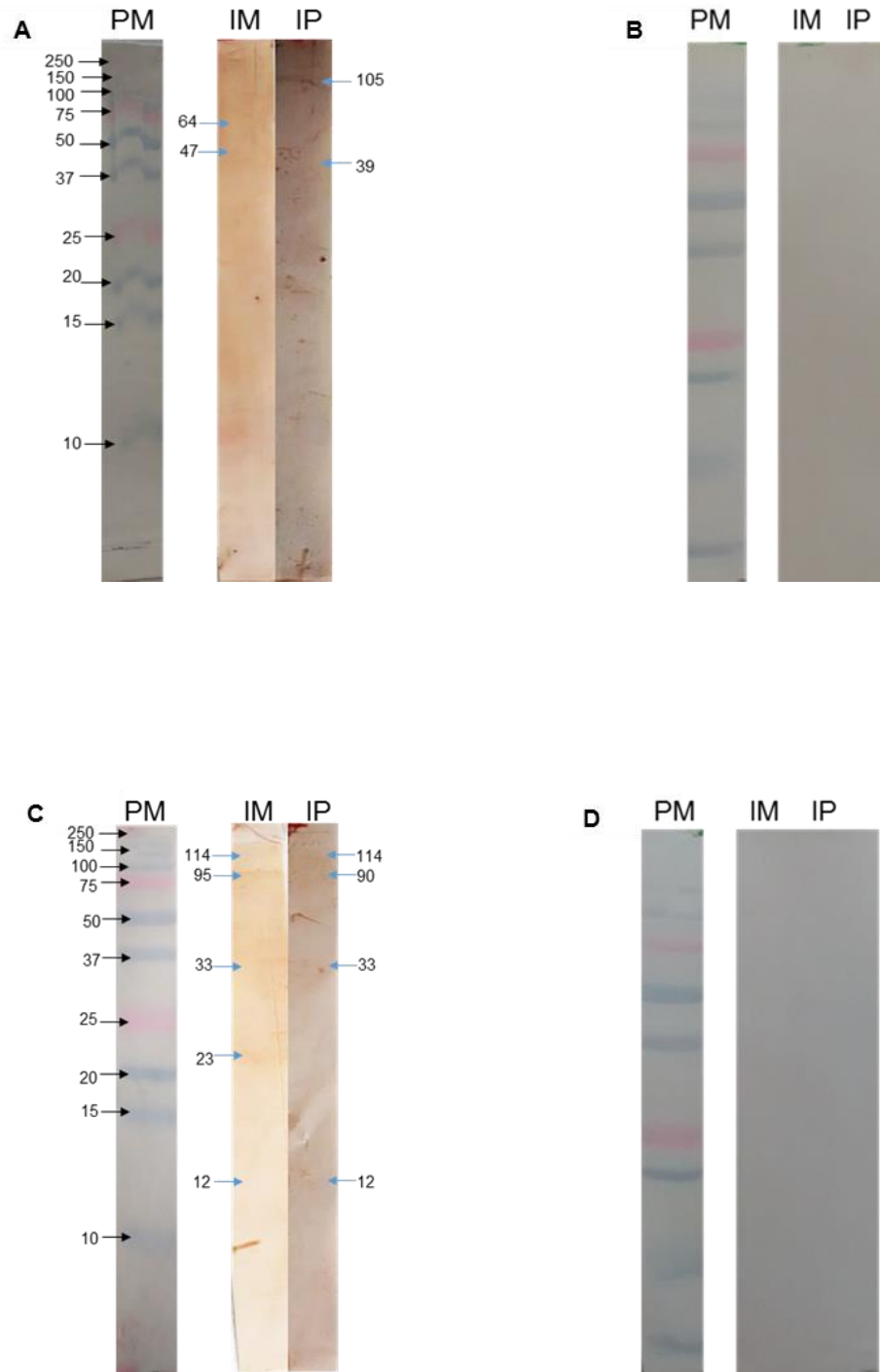


Figura 31. Componentes de mayor relevancia con residuos de N-acetilgalactosamina (PNA) en Western-blot de intestino medio y posterior de machos y hembras de *Triatoma barberi* en diferentes condiciones de alimentación. Cada pozo contiene 12 μ g de proteína. **A)** Machos en ayuno, **B)** Machos con 10 dpa, **C)** Hembras en ayuno, **D)** Hembras con 10 dpa. dpa: días postalimentación. PM: peso molecular. IM: intestino medio. IP: intestino posterior.

7.3.3 Reconocimiento de residuos de α -2,3-ácido siálico con la lectina MAA en Western-blot en intestino medio y posterior de machos y hembras de *Meccus pallidipennis* y *Triatoma barberi* en diferentes condiciones de alimentación.

No se identificó ningún componente con residuos de α -2,3-ácido siálico en ninguna porción del intestino en las diferentes condiciones de alimentación en ambos sexos y ambas especies, como se observa en la figura 32, la ausencia de señal al incubar con dicha lectina el intestino medio y posterior de un macho de *Triatoma barberi* con 10 dpa, el resultado obtenido fue el mismo para todas las otras muestras.



Figura 32. Western-blot de intestino medio y posterior de machos y hembras de *Triatoma barberi* con 10 días postalimentación, para reconocimiento de proteínas con residuos de α -2,3-ácido siálico (MAA) IM: intestino medio. IP: intestino posterior.

8 Discusión de resultados.

8.1 Características histológicas del intestino medio y posterior en diferentes condiciones de alimentación.

El intestino medio anterior de *Meccus pallidipennis* y *Triatoma barberi* de ambos sexos y en ambas condiciones de alimentación presentó epitelio cilíndrico con invaginaciones, a diferencia del intestino posterior que presentó epitelio cúbico y plano simple. En ambas porciones de intestino, las microvellosidades están incluidas en un material PAS positivo, que podría tratarse de la membrana perimicrovellosa, esta morfología coincide con lo observado en machos de *Rhodnius prolixus*, *Triatoma infestans* y *Triatoma vitticeps* (Burgos & Gutiérrez, 1976; Albuquerque et al., 2009; Rocha et al., 2010).

En el intestino medio (anterior y posterior) de machos y hembras de *M. pallidipennis* y *T. barberi* se observó que a los 10 días postalimentación se incrementan las invaginaciones del epitelio, lo que coincide con lo observado en *Triatoma vitticeps*. Este aumento en la cantidad de invaginaciones puede estar relacionado con el aumento de la superficie de absorción de nutrimentos después de la ingesta de alimento (Rocha et al., 2010).

En el intestino medio (anterior y posterior) de machos y hembras de *M. pallidipennis* y *T. barberi*, el epitelio aumentó su tamaño a los 10 días postalimentación en comparación con el ayuno. Rocha en 2010, observó también, aumento del tamaño de las células del intestino a los 20 días postalimentación en *Triatoma vitticeps* (Rocha et al., 2010).

En el intestino medio posterior del macho de *M. pallidipennis* en ayuno, se observaron pliegues en la superficie basal del epitelio, los cuales están relacionados con el transporte de fluidos entre las células de acuerdo a lo observado en *Triatoma infestans* por Burgos en 1976 (Burgos & Gutiérrez, 1976).

En el intestino medio y posterior de machos y hembras de *M. pallidipennis* y *T. barberi* se presentó a los 10 días postalimentación un incremento del glicocálix y de la secreción PAS positiva, sin embargo fue más evidente en el intestino posterior, y

especialmente en la especie *Triatoma barberi*. La tinción PAS positiva de la secreción indica la presencia de carbohidratos como glicoproteínas o glicolípidos, lo que podría tener importancia en la interacción entre el parásito y el intestino de los vectores, de igual forma Albuquerque en 2009, observó incremento de esta secreción en *Rhodnius prolixus* a los 10 dpa y además identificó residuos de α -D-galactosa, manosa, ácido siálico, N-acetil-D-galactosamina y N-acetil-D-glucosamina. Las diferencias en la cantidad de secreción entre las porciones del intestino, especies y condiciones de alimentación pueden relacionarse con el mecanismo de interacción del parásito y el intestino del insecto, ya que éste tiene contacto con la secreción de los bordes del epitelio en el intestino medio, mientras que en el intestino posterior, el flagelo se encuentra insertado en la secreción extracelular. La presencia de mayor cantidad de secreción en el intestino posterior podría darle al parásito las condiciones adecuadas para su anclaje y diferenciación hacia tripomastigote metacíclico (Burgos & Gutiérrez ,1976; Kollien et al., 1998; Albuquerque et al., 2009).

En el intestino medio (anterior y posterior) de hembras de ambas especies se observó a los 10 días postalimentación un incremento en cantidad y tamaño de gránulos PAS positivos; además se observaron gránulos con características de tinción diferente (PAS negativos), los cuales no se observaron en ayuno. En el intestino medio anterior de machos en ambas especies se observó de igual forma el incremento de gránulos PAS positivos (cantidad y tamaño); a diferencia de las hembras no se observan gránulos en el intestino medio posterior ni en ayuno ni a los 10 dpa.

El aumento de la cantidad y diversificación de tamaño de los gránulos PAS positivos y la aparición de algunos con características de tinción diferente, podría relacionarse con el proceso de metabolismo de carbohidratos. El aumento en la cantidad de los gránulos PAS positivos se ha reportado también en *Triatoma vitticeps* y puede relacionarse con la función de almacenamiento y digestión de carbohidratos del intestino medio anterior. Por otra parte, en el intestino medio de *Rhodnius prolixus* se ha descrito la presencia de glucosidasas con mayor actividad entre 10 y 14 dpa,

lo que implicaría una disminución de carbohidratos sin embargo, se observó un incremento de los gránulos PAS positivos en *Triatoma barberi* y *Meccus pallidipennis*. Con relación a la ausencia de gránulos en el intestino medio posterior de machos de ambas especies en condiciones de ayuno y 10 días postalimentación, podría explicarse por la falta de alimento en el lumen del intestino, ya que no se observaron residuos alimenticios y por lo tanto inferimos la ausencia de la digestión y almacenamiento de carbohidratos (Ribeiro & Pereira, 1984; Billingsley, 1990; Rocha et al., 2010).

En intestino posterior se observaron gránulos PAS positivos en la hembra de *T. barberi* en ayuno; en la hembra de *M. pallidipennis* se evidenciaron en la condición de 10 días postalimentación. En los machos de ambas especies y condiciones de alimentación no se identificaron gránulos PAS positivos; Rocha y cols. en 2010 reportaron gránulos PAS positivos en el intestino posterior de adultos de *Triatoma vitticeps* a los 3 y 20 dpa y asume que su función principal es el almacenamiento de glucógeno. La ausencia de dicho tipo de granulación en el intestino posterior podría deberse a que en esta porción se absorben sales y nutrimentos, se digieren proteínas; por lo tanto la digestión de carbohidratos en esta porción es mínima, posiblemente los carbohidratos fueron absorbidos previamente (Wigglesworth, 1942; Houseman & Downe, 1983; Billingsley, 1988; Rocha et al., 2010; Waniek et al., 2012).

En general se observó que cuando los gránulos PAS positivos eran más gruesos se acercaban a la membrana citoplasmática e incluso se logró observarlos adosados a ésta, lo que indicaría que el contenido de los gránulos es secretado a la superficie adluminal. La cantidad de secreción PAS positiva está relacionada directamente con la cantidad de granulación en el intestino medio.

8.2 Determinación del perfil electroforético.

El perfil electroforético obtenido fue muy similar entre hembras y machos de ambas especies y condiciones de alimentación, sin embargo, algunos componentes mostraron diferencias.

Se identificaron un componente de aproximadamente 64 kDa en el intestino medio de machos y hembras de *Triatoma barberi* a los 10 días postalimentación y otro de 61 kDa en el intestino medio de machos y hembras de ambas especies en ayuno, el cual presentó mayor relevancia en las muestras de *T. barberi* que en las de *M. pallidipennis*. Terra en 1988 describe un componente de 64 kDa en el intestino posterior de *Rhodnius prolixus* a los 7 días postalimentación, al cual reporta con actividad de β -glucosidasa; de igual forma describe un componente de 61 kDa que solo manifestó actividad de aminopeptidasa después de ser alimentado el insecto; este componente fue reportado previamente en el intestino de *Triatoma pallidipennis*. Otro componente de 14 kDa aproximadamente se encontró en *M. pallidipennis* en el intestino medio de hembras y machos en ambas condiciones de alimentación y en el intestino posterior de machos y hembras solo en condiciones de ayuno, además en se presentó en el intestino medio de machos y hembras de *Triatoma barberi*; este componente podría corresponder al descrito en el tracto intestinal de ninfas de 5º estadio de *Triatoma infestans* en diferentes condiciones de alimentación y que se le atribuye actividad bacteriolítica, el cual se incrementaba después de la alimentación (Houseman & Downe, 1981; Terra et al., 1988; Meiser et al., 2010).

Se identificaron 24 componentes de mayor relevancia en los ensayos con diversos patrones según las condiciones del ensayo (especie, porción del intestino, sexo y condiciones de alimentación) de los cuales podrán ser candidatos a estudios complementarios con el propósito de tratar de identificar su actividad en el insecto y su relación con el parásito.

La ausencia de algunos componentes en el intestino posterior y su presencia en el medio o viceversa puede deberse a la compartimentalización de las funciones digestivas. En el intestino anterior no se lleva a cabo la digestión de proteínas, la función principal del intestino medio anterior es el almacenamiento de alimento con funciones de digestión de carbohidratos, hemólisis, transporte de iones y procesamiento de lípidos; en el intestino posterior se absorben nutrimentos y se realiza la digestión de proteínas (Houseman & Downe, 1981; Billingsley, 1990).

8.3 Identificación de glicoproteínas.

Es conocido que los insectos en general sintetizan N-glicanos aunque la producción de los N-glicanos complejos aún permanece en controversia (Rendic et al., 2008).

De las tres lectinas utilizadas, la que presentó mayor afinidad fue WGA-*Triticum vulgare*, que reconoce N-acetil-D-glucosamina y ácido siálico; ésta se unió a residuos de azúcar en proteínas de ambas porciones del intestino, especies, sexos y condiciones de alimentación; lo que indicaría la presencia de residuos estos carbohidratos en ambas porciones del intestino de *Meccus pallidipennis* y *Triatoma barberi*; en *Rhodnius prolixus* mediante histoquímica de lectinas se identificaron residuos de ambos carbohidratos en la totalidad del intestino. Se reconoció el componente de 61 kDa en el intestino posterior de machos de ambas especies a los 10 días postalimentación y en el intestino medio de las hembras de ambas especies a los 10 días postalimentación lo que podría sugerir su estrecha relación con la actividad reportada en el intestino de *R. prolixus* después de la alimentación. Otro componente identificado fue el de 64 kDa en el intestino medio en hembras y machos de *T. barberi* en ayuno y 10 días postalimentación, y en el intestino posterior de machos y hembras de *T. barberi* a los 10 días postalimentación, Terra en 1988 describe un componente de 64 kDa en el intestino posterior de *Rhodnius prolixus* a los 7 días postalimentación con actividad de β -glucosidasa (Houseman & Downe, 1981; Albuquerque et al., 2009).

La presencia de esos residuos de carbohidratos en dichas glicoproteínas podría estar relacionada con la unión del parásito al intestino del vector, ya que entre las funciones de las glicoproteínas, se encuentra su participación en procesos de reconocimiento celular. La importancia de los residuos de NAcGlc en las interacciones moleculares entre el intestino del insecto y el parásito ha sido demostrada mediante la inhibición de la unión de epimastigotes a la MPM de *Rhodnius prolixus* mediante la incubación con NAcGlc. En otros vectores, por ejemplo *Aedes aegypti*, transmisor del dengue, se logró inhibir la unión del oocineto *Plasmodium gallinaceum* al intestino del mosquito después de la incubación con GlcNAc, en condiciones de laboratorio, asimismo, mediante microscopía electrónica

se observó la unión marcada a la lectina WGA al tracto digestivo de dicho vector (Zieler et al., 1999 y 2000; Alves et al., 2007).

El aumento del reconocimiento por WGA de algunos componentes del intestino de los vectores a los 10 días postalimentación, podría estar relacionado con el proceso de digestión del alimento, ya que es necesario el aumento de secreción de enzimas para facilitar la obtención de nutrimentos de la sangre ingerida y dicho incremento está claramente estimulado por la alimentación (Wigglesworth, 1942).

Con la aglutinina de *Arachis hypogaea* (cacahuate) o PNA específica para el reconocimiento de galactosa o el oligosacárido N-acetil galactosamina, observamos un reconocimiento muy bajo a proteínas del intestino medio y posterior en machos y hembras de *Meccus pallidipennis* en ayuno y 10 días postalimentación y de igual forma para *Triatoma barberi* en condiciones de ayuno; no hubo reconocimiento a las proteínas de intestino medio y posterior de *T. barberi* en ambos sexos a los 10 días postalimentación.

Un componente reconocido por PNA fue de 46 kDa en intestino medio y posterior de machos en condiciones de ayuno de *M. pallidipennis* y un componente de 45 kDa en intestino posterior de machos de *T. barberi* en condiciones de ayuno; Alves en 2007, reporta un componente de 45.5 kDa identificado en la membrana perimicrovellosa en ninfas de 5^o estadio de *R. prolixus* a los 10 días postalimentación. Albuquerque en 2009 identificó residuos de N-acetilgalactosamina mediante histoquímica de lectinas en intestino medio anterior (superficie epitelial, MPM y gránulos citoplasmáticos) de adultos de *R. prolixus* a 10 días postalimentación. De acuerdo con los hallazgos este componente podría estar involucrado en la interacción parásito-vector y es factible identificar residuos de N-acetilgalactosamina en condiciones de ayuno y postalimentación (Alves et al., 2007; Albuquerque; 2009).

Los estudios sobre la presencia de ácido siálico en los insectos han arrojado resultados contradictorios, concluyendo que las células de los insectos generalmente no producen glicoproteínas con ácido siálico. Un ejemplo de dicha

variación en los resultados es lo observado en el vector del dengue, *Aedes aegypti*, en el que no se detectó la presencia de ácido siálico mediante HPLC (High Performance Liquid Chromatography), sin embargo si se observa la inhibición de la unión de los oocinetos al intestino (Zieler et al., 1999 y 2000; Marchal et al., 2001; Rendic et al., 2008).

Existen diferentes formas de unión del carbono en la posición 2 a las cadenas de azúcares, entre ellas la unión a la posición 3 o 6 de los residuos de galactosa o 6 N-acetilgalactosamina; la lectina MAA utilizada es específica para detectar ácido siálico con unión α -2,3, la cual no presentó reconocimiento de componentes en ninguna de las muestras de intestino, lo que podría sugerir ausencia de ácido siálico con uniones α -2,3 en el intestino medio y posterior de *Meccus pallidipennis* y *Triatoma barberi* o bien su presencia en concentraciones tan bajas que no permitieron detectar el reconocimiento (Varki, 1997; Varki et al., 2009).

9 Conclusiones.

- Se observaron diferencias morfológicas en el intestino medio y posterior de machos y hembras de *Meccus pallidipennis* y *Triatoma barberi* en ayuno y 10 días postalimentación, siendo las más notables la presencia de gránulos y secreción PAS positivos en el intestino posterior de la hembra de *Triatoma barberi* en ayuno.
- Se identificaron dos componentes de 61 y 64 kDa en el patrón electroforético y con residuos N-acetil-D-glucosamina reconocidos por WGA, que en publicaciones previas han sido involucrados en el proceso de digestión del insecto.
- Se identificaron proteínas de 46 y 45 kDa con residuos N-acetil-D-galactosamina reconocidas por PNA, que podrían estar involucrados en la unión del parásito y el intestino del insecto.
- No se identificaron proteínas glicosiladas con α -2,3-ácido siálico en intestino de adultos de *M. pallidipennis* y *T. barberi* en ayuno y 10 días postalimentación.
- Se observaron diferencias morfológicas, en el patrón electroforético y de glicoproteínas en el intestino de adultos de *M. pallidipennis* y *T. barberi*.

10 Perspectivas.

- Realizar un estudio con mayor número de insectos no infectados e incluir insectos infectados con *Trypanosoma cruzi* para identificar diferencias morfológicas y perfiles proteicos y glicoproteicos.
- Continuar con estudios inmunohistoquímicos para identificar la localización de los residuos de carbohidratos en el intestino.

11 Referencias bibliográficas.

- Albuquerque, J. M., Gonzalez, M. S., Garcia, E. S., Mello, C. B., Azambuja, P., Almeida, J. C., de Souza, W., Nogueira, N. F. S. (2009). Cytochemical characterization of microvillar and perimicrovillar membranes in the posterior midgut epithelium of *Rhodnius prolixus*. *Arthropod Structure & Development*, 38, 31–44.
- Alvarez, V. E., Niemirowicz, G. T., Cazzulo, J. J. (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.
- Alves, C. R., Albuquerque-Cunha, J. M., Mello, C. B., Garcia, E. S., Nogueira, N. F., Bourguignon, S. C., de Souza, W., Azambuja, P., Gonzalez, M. S. (2007). *Trypanosoma cruzi*: attachment to perimicrovillar membrane glycoproteins of *Rhodnius prolixus*. *Experimental Parasitology*, 116, 44–52.
- Amino, R., Serrano, A. A., Morita, O. M., Pereira-Chioccola, V. L., Schenkman, S. (1995). A sialidase activity in the midgut of the insect *Triatoma infestans* is responsible for the low levels of sialic acid in *Trypanosoma cruzi* growing in the insect vector. *Glycobiology*, 5, 625–631.
- Azambuja, P. de, Guimarães, J. A., & Garcia, E. S. (1983). Haemolytic factor from the crop of *Rhodnius prolixus*: Evidence and partial characterization. *Journal of Insect Physiology*, 29, 833-837.
- BID, OPS, IDRC, & CNZ. (2010). Programa Regional para el Control de la Enfermedad de Chagas en América Latina. Iniciativa de Bienes Públicos Regionales. Ed.BID: Montevideo, 242 pp.
- Billingsley, P. F. (1988). Morphometric analysis of *Rhodnius prolixus* Stal (Hemiptera:Reduviidae) midgut cells during blood digestion. *Tissue & Cell*, 20, 291–301.

- Billingsley, P. F. (1990). The Midgut Ultrastructure of Hematophagous Insects. *Annual Review of Entomology*, 35, 219–248.
- Brisse, S., Barnabé, C., Bañuls, A. L., Sidibé, I., Noël, S., Tibayrenc, M. (1998). A phylogenetic analysis of the *Trypanosoma cruzi* genome project CL Brener reference strain by multilocus enzyme electrophoresis and multiprimer random amplified polymorphic DNA fingerprinting. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 92, 253-263.
- Brutus, L., Schneider, D., Postigo, J., Delgado, W., Mollinedo, S., Chippaux, J. P. (2007). Evidence of congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* in a vector-free area of Bolivia. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 101, 1159–1160.
- Burgos, M. H., & Gutiérrez, L. S. (1976). The intestine of *Triatoma infestans*. I. Cytology of the midgut. *Journal of Ultrastructure Research*, 57, 1–9.
- Burgos, J. M., Diez, M., Vigliano, C., Bisio, M., Risso, M., Duffy, T., Cura C., Brusses, B., Favaloro, L., Leguizamon, M. S., Lucero, R. H., Laguens, R., Levin, M. J., Favaloro, R., Schijman, A. G. (2010). Molecular identification of *Trypanosoma cruzi* discrete typing units in end-stage chronic Chagas heart disease and reactivation after heart transplantation. *Clinical Infectious Diseases*, 51, 485–495.
- Cabrera M., Bucio T. M.I., Rojo J., Bonifaz R., Guevara Y., Salazar P.M. (2004). Detection of antibodies against *Trypanosoma cruzi* in blood donors in the General Hospital of Mexico City. *Revista de Patología Tropical (BR)*; 33: 71-80.
- Canavoso, L. E., Frede, S., Rubiolo, E. R. (2004) Metabolic pathways for dietary lipids in the midgut of hematophagous *Panstrongylus megistus* (Hemiptera: Reduviidae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 34, 845–854.
- Caradonna, K. L., & Burleigh, B. A. (2011). Mechanisms of host cell invasion by *trypanosoma cruzi*. *Advances in Parasitology*, 76, 33–61.

- Castillo, D., & Wolff, M. (2000). Aspectos del comportamiento de los triatominos (Hemiptera : Reduviidae), vectores de la enfermedad de Chagas. *Biomédica*, 20, 59–64.
- CDC. (2006). Chagas Disease After Organ Transplantation — Los Angeles, California, 2006. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 55, 798–800.
- Chagas, C. (1909). Nova tripanozomíaze humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 1, 159-218.
- Cole, C. R., & Smith, C. A. (1989). Glycoprotein biochemistry (Structure and function)- A vehicle for teaching many aspects of biochemistry and molecular biology. *Biochemical Education*, 17, 179–189.
- Cook, G. C., & Zumla, A. I. (2009). *Manson's Tropical Diseases*. 22nd edition, Elsevier, London, p. 1800.
- Cruz Reyes, A., & Pickering López, J. M. (2006). Chagas disease in Mexico: an analysis of geographical distribution during the past 76 years-a review. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 101, 345–354.
- De Souza, W. (1999). A short review on the morphology of *Trypanosoma cruzi*: from 1909 to 1999. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 94, 17–36.
- De Souza, W., de Carvalho, T. M. U., Barrias, E. S. (2010). Review on *Trypanosoma cruzi*: Host Cell Interaction. *International Journal of Cell Biology*, 2010, 295394.
- Dinglasan, R. R., Valenzuela, J. G., Azad, A. F. (2005). Sugar epitopes as potential universal disease transmission blocking targets. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 35, 1–10.
- Dumonteil, E. (1999). Update on Chaga's disease in Mexico. *Salud Publica de México*, 41, 322-327.

- Frasch, A. C. C. (2000). Functional diversity in the trans-sialidase and mucin families in *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology Today*, 16, 282-86.
- Galvão, C. (2003). A sistemática dos triatomíneos. *Entomología y Vectores*, 10, 511-530.
- Garcia, E. S., Vieira, E., Lima, J. E., Goncalves, A. (1984). Molecular biology of the *T. cruzi* invertebrate host interaction. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 79, 33–37.
- Gonzalez, M. S., Hamed, A., Albuquerque-Cunha, J. M., Nogueira N. F. S., De Souza, W., Ratcliffe, N. A., Azambuja, P., Garcia, E. S., Mello, C. B. (2006). Antiserum against perimicrovillar membranes and midgut tissue reduces the development of *Trypanosoma cruzi* in the insect vector, *Rhodnius prolixus*. *Experimental Parasitology*, 114, 297–304.
- Guzman, E., Jimenez, M., Puerto, M., Ortega, A., Acosta, K. Y. (2012). Influence of *Triatoma dimidiata* in Modulating the Virulence of *Trypanosoma cruzi* Mexican Strains. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*, 2012, 328091.
- Houseman, J. G., & Downe, A. E. R. (1981). Exoproteinase activity in the posterior midgut of *Rhodnius prolixus* STAL (Hemiptera: Reduviidae). *Insect Biochemistry*, 11, 579–582.
- Houseman, J. G., & Downe, A. E. R. (1983). Cathepsin D-like activity in the posterior midgut of hemipteran insects. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry & Molecular Biology*, 75, 509–512.
- Jurberg, J., & Galvao, C. (2006). Biology, ecology, and systematics of Triatominae (Heteroptera , Reduviidae), vectors of Chagas disease, and implications for human health. *Festschrift zum 70. Geburtstag von Ernst Heiss. Denisia* 19, zugleich Katalogue der OÖ. Landesmuseen Neue Serie 50. 19, 1095-1116.

- Kierszenbaum, F. (2007). Mechanisms of pathogenesis in Chagas disease. *Acta Parasitologica*, 52, 1–12.
- Kirchhoff, L. V. (2011). Epidemiology of American trypanosomiasis (Chagas disease). *Advances in Parasitology*, 75, 1–18.
- Kollien, A. H., & Schaub, G. A. (2000). The development of *Trypanosoma cruzi* in triatominae. *Parasitology Today Personal*, 16, 381–387.
- Kollien, A. H., Schmidt, J., Schaub, G. A. (1998). Modes of association of *Trypanosoma cruzi* with the intestinal tract of the vector *Triatoma infestans*. *Acta Tropica*, 70, 127–141.
- Kowalska, A., Kowalski, P., Torres, M. Á. T. (2011). Chagas disease - American trypanosomiasis. *Polish Annals of Medicine*, 18, 156-167.
- Lammel, E. L., Müller, L. A., Isola, E. L., González Cappa, S. M. (1985). Effect of vector on infectivity of *Trypanosoma cruzi*. *Acta Tropica*, 42, 149–155.
- Lehane, M. J. (2005). *The Biology of Blood-Sucking in Insects*. Second edition. Cambridge University Press, USA, p. 321.
- 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, 123–520.
- Levine, N. D., Corliss, J. O., Cox, F. E., Deroux, G., Grain, J., Honigberg, B. M., Leedale G. F., Loeblich, A. R. 3rd., Lom, J., Lynn, D., Merinfeld, E. G., Poljansky, G., Sprague, V., Vavra, J., Wallace, F. G. (1980). A newly revised classification of the protozoa. *The Journal of Protozoology*, 27, 37–58.
- Maeda, F. Y., Cortez, C., Yoshida, N. (2012). Cell signaling during *Trypanosoma cruzi* invasion. *Frontiers in Immunology*, 3, 361.

- Magalhães, J., Andrade, S., Sherlock, I. (1996). *Trypanosoma cruzi* strains behavior after passage into autochthonous or foreign species of triatominae (Biological and biochemical patterns). *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 38, 23–28.
- Marchal, I., Jarvis, D. L., Cacan, R., Verbert, A. (2001). Glycoproteins from insect cells: sialylated or not? *Biological Chemistry*, 382, 151–159.
- Marín-Neto JA, Cunha-Neto E, Maciel BC, Simões MV. Pathogenesis of chronic Chagas heart disease. *Circulation*. 2007, 115, 1109-1123.
- Martinez, J. A., & Novelo, M. (2004). Blood meals to molt, feeding time and postfeeding defecation delay of *Meccus pallidipennis* (Stal, 1872) (Hemiptera: Reduviidae) under laboratory conditions. *Folia Entomologica Mexicana*, 43, 313–319.
- Mazzotti, L. (1939). Infección natural por *Trypanosoma cruzi* en otras especies de triatomas. *Revista del Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales*, 1, 73–78.
- Mazzotti, L. (1940). Dos casos de enfermedad de Chagas en el estado de Oaxaca. *Gaceta Médica de México*, 70, 417-420.
- Meiser, C. K., Piechura, H., Werner, T., Dittmeyer-Schäfer, S., Meyer, H. E., Warscheid, B., Schaub, G.A., Balczun, C. (2010). Kazal-type inhibitors in the stomach of *Panstrongylus megistus* (Triatominae, Reduviidae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 40, 345–353.
- Monteón Padilla, V. M., Hernández Becerril, N., Guzmán Bracho, C., Rosales Encina, J. L., & Reyes López, P. A. (1999). American trypanosomiasis (Chagas' disease) and blood banking in Mexico City: Seroprevalence and its potential transfusional transmission risk. *Archives of Medical Research*, 30, 393–398.

- Noguera-Torres, B., Alejandre-Aguilar, R., Isita-Tornelli, L., & Camacho, A. (2000). Defaecation Pattern in Seven Species of Triatomines (Insecta, Reduviidae) Present in México. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 42, 145–148.
- NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio.
- Novelo B. A., Benítez, G., Peña, A., Galván, J., Morales, A. (2010). Detección de *Trypanosoma cruzi* en donadores de sangre. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*, 48, 139–144.
- OMS. (2007) Reporte sobre la enfermedad de Chagas. Buenos Aires-Argentina; 2007.
- OMS. (2013). La enfermedad de Chagas (tripanosomiasis americana).
- Ortega Barria, E., & Pereira, M. E. A. (1991). A novel *T. cruzi* heparin-binding protein promotes fibroblast adhesion and penetration of engineered bacteria and trypanosomes into mammalian cells. *Cell*, 67, 411–421.
- Osorio, L., Ríos, I., Gutiérrez, B., González, J. (2012). Virulence factors of *Trypanosoma cruzi*: who is who? *Microbes and Infection / Institut Pasteur*, 14, 1390–1402.
- Perlowagora Szumlewicz, A., & Moreira, C. J. de C. (1994). In vivo differentiation of *Trypanosoma cruzi* - 1. Experimental evidence of the influence of vector species on metacyclogenesis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*.
- Ramsey, J. M., Alvear, A. L., Ordoñez, R., Muñoz, G., Garcia, A., Lopez, R., Leyva, R. (2005). Risk factors associated with house infestation by the Chagas disease vector *Triatoma pallidipennis* in Cuernavaca metropolitan area, Mexico. *Medical and Veterinary Entomology*, 19, 219–228.
- Rassi, A., & Marin-Neto, J. A. (2010). Chagas disease. *Lancet*, 375, 1388–1402.

- Rassi A Jr, Rassi A, M. de R. J. (2012). American Trypanosomiasis(Chagas Disease). *Infectious Disease Clinics of North America*, 26, 275–291.
- Rehm, H. (2006). *Protein Biochemistry and Proteomics*. 1st edition. Elsevier Inc. USA, p. 256.
- Rendic, D., Wilson, I. B. H., Paschinger, K. (2008). The Glycosylation Capacity of Insect Cells. *Croatica Chemica Acta*, 81, 7–21.
- Ribeiro, J. M. C., & Pereira, M. E. A. (1984). Midgut glycosidases of *Rhodnius prolixus*. *Insect Biochemistry*, 14, 103–108.
- Rocha, L. L. V, Neves, C. A., Zanuncio, J. C., Serrao, J. E. (2010). Digestive cells in the midgut of *Triatoma vitticeps* (Stal, 1859) in different starvation periods. *Comptes Rendus - Biologies*, 333, 405–415.
- Ross, M, Wojciech P (2008). *Histología: texto y atlas color con biología celular y molecular*. 5ª edición. Editorial Panamericana. Buenos Aires, p. 952.
- Salas, N. A., Cot, M., Schneider, D., Mendoza, B., Santalla, J. A., Postigo, C., Chippaux, J.P., Brutus, L. (2007). Risk factors and consequences of congenital Chagas disease in Yacuiba, south Bolivia. *Tropical Medicine & International Health*, 12, 1498–1505.
- Salazar PM, Castejón J, Rodríguez H, Tay J. Miocarditis chagásica crónica en México. Tercer caso comprobado por exámenes parasitológicos. *Prensa Médica Mexicana*. 1979, 44, 115-120.
- Salazar,P., Bucio M., Cabrera M., Bautista J. (1997). First case of natural infection in pigs. Review of *Trypanosoma cruzi* reservoirs in Mexico. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 92, 499-502.
- Salazar P. M., Tay J., Bucio M. I., Haro I., Anzures M. E., Flores A. S. (1984) Primer caso de megaesófago con serología positiva a *Trypanosoma cruzi*. *Revista de Investigación en Salud Pública de México*, 26, 452-455.

- Salazar, P. M., De Haro, I., Cabrera, M. (2005). Tres especies de triatomíneos y su importancia como vectores de *Trypanosoma cruzi* en México. *Medicina (Buenos Aires)*, 65, 63–69.
- Salazar, P. M., Rojas, G. E., Cabrera, M., Bucio, M. I., Martínez, J. A., Monroy, M. C., Rodas, A., Guevara, Y., Vences, M., Ruiz, A., Torres, E. (2010). Triatomíneos (Hemiptera: Reduviidae) vectores de Chagas disease in Mexico Revisión de 13 especies de la familia Triatomíneos (Hemiptera: Reduviidae) vectores. *Journal of the Selva Andina Research Society*, 1, 57–80.
- Schaub, G. A., Kleffmann, T., Kollien, A. H., Schmidt, J. (1999). Hydrophobic Attachment of *Trypanosoma cruzi* to the Rectal Cuticle of *Triatoma infestans* and its Influence on Metacyclogenesis - A Review. *Journal of experimental & Clinical Medicine*, 23, 321–327.
- Schaub, G. A., Meiser, C. K., Balczun, C. (2011). Interactions of *Trypanosoma cruzi* and Triatomíneos. In *Progress in Parasitology*, 2, 155–178.
- Schofield, C. J., & Galvão, C. (2009). Classification, evolution, and species groups within the Triatomíneos. *Acta Tropica*, 110, 88–100.
- Silva, C. P., Silva, J. R., Vasconcelos, F. F., Petretski, M. D. A., DaMatta, R. A., Ribeiro, A. F., Terra, W. R. (2004). Occurrence of midgut perimicrovillar membranes in paraneopteran insect orders with comments on their function and evolutionary significance. *Arthropod Structure and Development*, 33, 139–148.
- Tay J, Salazar P. M., Ontiveros A., Jiménez J., Haro I. de, García Y., Gutiérrez Q. M. (1986). Epidemiologic study of Chagas' disease in a town in Oaxaca, Mexico. *PAHO Bulletin*; 20, 358-365.
- Tay, J., Salazar Schetino, P. M., Ontiveros, D. (1969). El comportamiento en el ratón blanco de una cepa de *Trypanosoma cruzi* mediante pases sucesivos en diferentes especies de triatomas. *Revista Latinoamericana de Microbiología Y Parasitología*, 11, 79–89.

- Teixeira, A. R. L., Hecht, M. M., Guimaro, M. C., Sousa, A. O., Nitz, N. (2011). Pathogenesis of chagas' disease: parasite persistence and autoimmunity. *Clinical Microbiology Reviews*, 24, 592–630.
- Teixeira, A. R. L., Nascimento, R. J., Sturm, N. R. (2006). Evolution and pathology in chagas disease-a review. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 101, 463–491.
- Terra, W. R., Ferreira, C., Garcia, E. S. (1988). Origin, distribution, properties and functions of the major *Rhodnius prolixus* midgut hydrolases. *Insect Biochemistry*, 18, 423–434.
- Torrico, F., Alonso, C., Suarez, E., Rodriguez, P., Torrico, M. C., Dramaix, M., Truyens, C., Carlier, Y. (2004). Maternal *Trypanosoma cruzi* infection, pregnancy outcome, morbidity, and mortality of congenitally infected and non-infected newborns in Bolivia. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 70, 201–209.
- Tyler, K. M., & Engman, D. M. (2001). The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. In *International Journal for Parasitology*, 31, 472–481.
- UNAM, F. de M., OPS, OMS. (2006). *Manual para el Diagnostico de la Infección por Trypanosoma cruzi*. OPS/OMS, México, p. 45.
- Varki, A. (1993). Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. *Glycobiology*, 3, 97–130.
- Varki, A. (1997). Sialic acids as ligands in recognition phenomena. *The FASEB Journal*, 11, 248–255.
- Varki, A., D Cummings, R., D Esko, H., Freeze, H., Stanley, P., Bertozzi, C. R., Hart, G. W., Etzler, M. E. (2009). *Essentials of Glycobiology, 2nd edition*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, p. 784.

- Velasco Castrejón, O., Valdespino, J. L., Tapia Conyer, R., Salvatierra, B., Guzmán Bracho, C., Magos, C., Llausás, A., Gutiérrez, G., Sepúlveda, J. (1992). Seroepidemiología de la enfermedad de Chagas en México. *Salud Publica de Mexico*, 34, 186–196.
- Waniek, P. J., Pacheco, J. E., Jansen, A. M., Costa, J., Araújo, C. A. C. (2012). Cathepsin L of *Triatoma brasiliensis* (Reduviidae, Triatominae): Sequence characterization, expression pattern and zymography. *Journal of Insect Physiology*, 58, 178–187.
- WHO. (2010). Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases First WHO report on neglected tropical diseases. *World Health*, 86, 186.
- Wigglesworth, V. B. (1942). *The principles of insect physiology*. Second edition. Methuen & Co. LTD, London, p. 439.
- Wilkins, S., & Billingsley, P. F. (2001). Partial characterization of oligosaccharides expressed on midgut microvillar glycoproteins of the mosquito, *Anopheles stephensi* Liston. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 31, 937–948.
- Yoshida, N. (2006). Molecular basis of mammalian cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *Anais Da Academia Brasileira de Ciências*, 78, 87-111.
- Zarate, L. G., & Zarate, R. J. (1985). A checklist of the triatominae (Hemiptera:Reduviidae) of Mexico. *International Journal of Entomology*, 27, 102–127.
- Zieler, H., Garon, C. F., Fischer, E. R., Shahabuddin, M. (2000). A tubular network associated with the brush-border surface of the *Aedes aegypti* midgut: implications for pathogen transmission by mosquitoes. *The Journal of Experimental Biology*, 203, 1599–1611.
- Zieler, H., Nawrocki, J. P., Shahabuddin, M. (1999). *Plasmodium gallinaceum* ookinetes adhere specifically to the midgut epithelium of *Aedes aegypti* by

interaction with a carbohydrate ligand. *The Journal of Experimental Biology*, 202, 485–495.

Zingales B., Andrade S. G., Briones M. R. S., Campbell D. A., Chiari E., Fernandes O, Guhl, F., Macedo, A.M., Machado, C. R., Miles, M. A., Romanha, A. J., Sturn, A. J., Tybayrenc, M., Schijman, A. G. (2009). A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz.*; 104, 1051-1054.